

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS QUÍMICOS

**MODELAGEM CINÉTICA DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR
DE HIDROLISADO ENZIMÁTICO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR
CONCENTRADO COM MELAÇO CONSIDERANDO RECICLO DE CÉLULAS**

Autor: Rafael Ramos de Andrade

Orientador: Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa

Co-orientadores: Prof. Dr. Rubens Maciel Filho

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como requisito para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Campinas, Fevereiro de 2012.

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

An24m Andrade, Rafael Ramos de
Modelagem cinética do processo de produção de
etanol a partir de hidrolisado enzimático de bagaço de
cana-de-açúcar concentrado com melaço considerando
reciclo de células / Rafael Ramos de Andrade. --
Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientadores: Aline Carvalho da Costa, Rubens
Maciel Filho e Francisco Maugeri Filho.
Tese de Doutorado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Bioetanol. 2. Modelagem matemática. 3. Cinética
química. 4. Hidrolisados. 5. Fermentação alcoólica. I.
Costa, Aline Carvalho da. II. Maciel Filho, Rubens/
Maugeri Filho, Francisco. III. Maugeri Filho, Francisco.
IV. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Química. VI. Título.

Título em Inglês: Kinetic modeling of ethanol production process from enzymatic
hydrolysates of sugarcane bagasse concentrated with molasses
considering cell recycle

Palavras-chave em Inglês: Bioethanol, Mathematical modeling, Kinetics, Hydrolysates,
Alcoholic fermentation

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos

Titulação: Doutor em Engenharia Química

Banca examinadora: Vera Lúcia Reis de Gouvêia, Antônio Maria Francisco Luiz José
Bonomi, Maria Isabel Berto, Charles Dayan Farias de Jesus

Data da defesa: 24/02/2012

Programa de Pós Graduação: Doutorado em Engenharia Química

Tese de Doutorado defendida por Rafael Ramos de Andrade e aprovada em 24 de fevereiro de 2012 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa – Orientadora



Dra. Vera Lucia Reis de Gouveia



Dr. Antonio Maria Francisco Luiz José Bonomi – CTBE



Dra. Maria Isabel Berto – ITAL

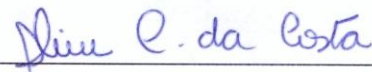


Dr. Charles Dayan Farias de Jesus – CTBE

Rafael Ramos de Andrade

Modelagem cinética do processo de produção de etanol a partir de hidrolisado enzimático de bagaço de cana-de-açúcar concentrado com melaço considerando reciclo de células

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química.



Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa – Orientadora

**Dedico esse trabalho em memória de
minha mãe Irani e avó Dorothéa por
sempre me incentivar, cuidar e ensinar
valores importantes da vida.**

AGRADECIMENTOS

- A Deus por tudo que alcancei na vida.
- Especialmente a minha orientadora Prof. Dra. Aline Carvalho da Costa e co-orientadores Prof. Dr. Rubens Maciel Filho e Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho pela amizade, atenção, confiança, incentivo e excelente orientação. Sem eles, a realização desse trabalho não seria possível, aos quais tenho eterna gratidão!
- Ao Tiago Martins pelas sugestões, críticas construtivas, apoio e por me aturar nos momentos difíceis!
- Ao amigo e colaborador Adriano Cruz.
- À Dra. Sarita Rabelo pela valiosa colaboração na etapa de hidrólise.
- A todos os colaboradores e parceiros que se dedicaram à elaboração de artigos.
- À Dra. Fátima Costa pela valiosa colaboração na etapa experimental.
- Aos meus pais, tios e outros familiares pelo apoio e paciência.
- Ao CNPq e FAPESP/ Bioen pelo apoio financeiro.
- Aos amigos do LEPFE, LEB/FEA e LOPCA pela ajuda no trabalho experimental, especialmente ao Remi Zautsen, Daniele e Cristiane.

SUMÁRIO

NOMENCLATURA.....	XV
RESUMO	XVII
ABSTRACT	XIX
ORGANIZAÇÃO DA TESE DE DOUTORADO	XXI
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Introdução Geral e Objetivos	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Fermentação alcoólica.....	13
2.2 Matéria-prima para produção de etanol	13
2.3 Etapas de processamento do bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol	15
2.4 Modos de operação para produção de etanol celulósico	16
2.4.1 Pré-tratamento	16
2.4.1.1 Pré-tratamento por explosão com dióxido de carbono supercrítico	17
2.4.1.2 Pré-tratamento por explosão a vapor	19
2.4.1.3 Pré-tratamento hidrotérmico	20
2.4.1.4 Pré-tratamento por mistura de ácidos diluídos	20
2.4.1.5 Pré-tratamento por solventes orgânicos.....	21
2.4.1.6 Pré-tratamento biológico por fungos	22
2.4.1.7 Pré-tratamento físico.....	22
2.4.1.8 Pré-tratamento alcalino	23

2.4.2	Sacarificação e fermentação simultâneas (SSF)	26
2.4.3	Sacarificação e fermentação separadas (SHF).....	27
2.4.4	Hidrólise Enzimática	28
2.5	Formação de compostos inibidores	31
2.5.1	Impacto de inibidores na etapa de fermentação.....	31
2.5.2	Furfural e Hidroximetilfurfural.....	33
2.5.3	Ácido acético	34
2.5.4	Inibição por etanol na <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37
2.6	Efeito da temperatura na fermentação alcoólica	37
2.7	Reciclo de células.....	39
2.7.1	Efeitos do reciclo de células na fermentabilidade e cinética	40
2.7.2	Produtividade e viabilidade em fermentações com reciclo de células	40
2.8	Cinética do Processo de Fermentação Alcoólica	42
2.8.1	Modelagem matemática da cinética de processos biotecnológicos	44
2.8.1.1	Modelos para crescimento específico microbiano	45
2.8.1.2	Modelos não estruturados para inibição pelo produto no crescimento microbiano	49
2.8.1.3	Modelos matemáticos para formação de produto	51
2.8.1.4	Outros modelos matemáticos	51
2.9	Determinação de parâmetros por métodos gráficos.	55
2.10	Ajuste dos parâmetros do modelo cinético.....	56
2.11	Metodologia de Plackett-Burman (PB) para a seleção dos parâmetros mais relevantes do modelo.....	58
3	CAPÍTULO DE LIVRO: DEVELOPMENT OF EXTRACTIVE PROCESSES AND ROBUST MATHEMATICAL MODEL FOR BIOETHANOL PRODUCTION	61

4	ARTIGO: STUDY OF KINETIC PARAMETERS IN A MECHANISTIC MODEL FOR BIOETHANOL PRODUCTION THROUGH A SCREENING TECHNIQUE AND OPTIMIZATION.....	83
5	ARTIGO: EVALUATION OF THE ALCOHOLIC FERMENTATION KINETICS OF ENZYMATIC HYDROLYSATES FROM SUGARCANE BAGASSE PRETREATED WITH ALKALINE HYDROGEN PEROXIDE.	97
6	DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA COM ALTA DENSIDADE CELULAR EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA USANDO MELAÇO PARA CONCENTRAR HIDROLISADO ENZIMÁTICO DE BAGAÇO DE CANA	131
6.1	Materiais e métodos.....	131
6.1.1	Preparo do caldo hidrolisado.....	131
6.1.1.1	Bagaço de cana	131
6.1.1.2	Pré-tratamento do bagaço com peróxido de hidrogênio alcalino	132
6.1.1.3	Hidrólise enzimática do bagaço.....	132
6.1.1.4	Esterilização.....	132
6.1.2	Microrganismo	133
6.1.3	Ativação do Microrganismo.....	133
6.1.4	Crescimento do Microrganismo	134
6.1.5	Meio de fermentação.....	135
6.1.6	Fermentação	135
6.1.6.1	Detalhes do fermentador.....	135
6.1.6.2	Bateladas sucessivas com reciclo de células	136
6.1.7	Métodos Analíticos	137
6.1.7.1	Concentração de Células Totais.....	137
6.1.7.2	Viabilidade.....	137
6.1.7.3	Concentração de açúcares redutores totais, furfural, hidroximetilfurfural, etanol e glicerol.	138

6.2	Resultados e discussões	138
6.3	Ajuste dos parâmetros cinéticos da fermentação alcoólica da mistura melaço e hidrolisado, sem reciclo de células	164
6.4	Simulação do modelo matemático da cinética para a mistura de hidrolisado e melaço, sem reciclo de células	177
6.5	Ajuste dos parâmetros cinéticos da fermentação alcoólica da mistura melaço e hidrolisado, com reciclo de células.....	181
6.6	Simulação do modelo matemático da cinética para a mistura de hidrolisado e melaço, com reciclo de células	184
6.7	Desvios do modelo cinético em relação aos dados experimentais, sem e com reciclo de células.....	195
6.8	Análise de sensibilidade paramétrica do modelo aplicando a metodologia de Plackett-Burman	198
6.9	Avaliação do rendimento em etanol baseado no substrato ($Y_{p/s}$), e produtividade para fermentações com reciclos de células	210
7	CONCLUSÃO	213
	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	215
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	217
	APÊNDICE I.....	235
	ANEXO A.....	247

NOMENCLATURA

$A_{c_{máx}}$	concentração de ácido acético na qual cessa o crescimento microbiano (kg/m^3).
ART	açúcares redutores totais (kg/m^3)
K_i	constante de inibição pelo substrato (m^3/kg)
K_{dp}	coeficiente de morte pelo etanol (m^3/kg)
K_s	constante de saturação (kg/m^3)
K_{dT}	coeficiente de morte pela alta temperatura (h^{-1})
m	parâmetro para descrição da inibição celular
m_p	produção de etanol associada ao crescimento ($\text{kg}/[\text{kg}\cdot\text{h}]$)
m_x	parâmetro de manutenção ($\text{kg}/[\text{kg}\cdot\text{h}]$)
n	parâmetro para inibição por produto
nn	parâmetro de inibição por ácido acético
P	concentração de produto no reator (kg/m^3)
$P_{\max}$	concentração de produto quando o crescimento cessa (kg/m^3)
r_d	taxa cinética de morte ($\text{kg}/[\text{m}^3\cdot\text{h}]$)
r_p	taxa cinética de formação de produto ($\text{kg}/[\text{m}^3\cdot\text{h}]$)
r_s	taxa cinética de consumo de substrato ($\text{kg}/[\text{m}^3\cdot\text{h}]$)
r_x	taxa cinética de crescimento microbiano ($\text{kg}/[\text{m}^3\cdot\text{h}]$)
S	concentração de substrato no reator (kg/m^3)
S_0	concentração de substrato na alimentação do reator (kg/m^3)
t	tempo de processo (h)
T	temperatura do meio de fermentação ($^{\circ}\text{C}$)
V	volume do sistema reacional (m^3)

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

Letras Gregas

μ_x	velocidade específica de crescimento celular (h^{-1})
μ_p	velocidade específica de formação de produto (h^{-1})
μ_s	velocidade específica de consumo de substrato (h^{-1})
$\mu_{\max}$	velocidade máxima específica de crescimento celular (h^{-1})

RESUMO

O objetivo deste trabalho é modelar um processo de produção de etanol a partir da fermentação de hidrolisado enzimático de bagaço concentrado com melaço de cana-de-açúcar. Para este propósito, foram realizadas 23 fermentações em batelada com e sem reciclo de células em várias temperaturas: 30, 32, 34, 36 e 38 °C. O reciclo visa avaliar a influência da exposição da levedura *S. cerevisiae* ao hidrolisado contendo inibidores (especialmente ácido acético) por longos períodos de tempo, e com altas concentrações celulares. Para cada temperatura a primeira fermentação foi realizada com inóculo fresco e realizaram-se no mínimo 4 reciclos.

Inicialmente avaliou-se um modelo desenvolvido em trabalho anterior (ANDRADE, 2007) para fermentação de melaço de cana. Este modelo não foi capaz de descrever novas fermentações na presença de alterações da matéria-prima, nem mesmo quando o substrato era melaço de uma safra diferente. Devido ao grande número de parâmetros (11) no modelo, desenvolveu-se uma metodologia de re-estimação, na qual os parâmetros mais sensíveis eram reajustados, e os menos sensíveis mantidos fixos, tornando a re-estimação mais simples. Para isso fez-se uma análise de sensibilidade paramétrica através de planejamentos de Plackett-Burman usando o software STATISTICA, variando os parâmetros cinéticos e calculando seus efeitos nos perfis de concentração de células, substrato e etanol. Os parâmetros mais relevantes nos perfis foram $\mu_{máx}$, $P_{máx}$, Y_x e $Y_{p/x}$, os quais foram escolhidos para serem reajustados quando se alterava o substrato. Com o reajuste desses 4 parâmetros, foi possível descrever os dados experimentais da fermentação de melaço de nova safra com precisão.

O mesmo algoritmo de re-estimação foi utilizado para ajuste dos parâmetros do modelo de fermentações de caldo hidrolisado concentrado com melaço. Além dos 4 parâmetros definidos como mais importantes ($\mu_{máx}$, $P_{máx}$, Y_x , $Y_{p/x}$), re-estimou-se também o parâmetro $X_{máx}$, já que no desenvolvimento do modelo original não foi considerado reciclo de células, havendo baixa concentração de biomassa. Acrescentou-se, ainda, ao modelo original, um termo para levar em conta a inibição por ácido acético, logo estimaram-se também os parâmetros relacionados. Após re-estimação dos parâmetros usando um algoritmo de otimização quasi-Newton desenvolvido em COMPAQ VISUAL FORTRAN, realizou-se nova análise de sensibilidade para verificar se os parâmetros mais sensíveis continuavam sendo os mesmos. Neste caso, o $\mu_{máx}$ deixou de ser

relevante se a análise fosse feita no tempo final de fermentação, porém realizando análise de sensibilidade em diferentes tempos, mostra-se que $\mu_{m\acute{a}x}$ tem efeito nos perfis do modelo no início da fermentação.

Foi possível desenvolver um modelo preciso que descreveu as fermentações em batelada com e sem reciclo de células em função da temperatura mantendo 11 dos 13 parâmetros (ajustados a partir de dados de fermentação de hidrolisado concentrado com melaço) fixos. Apenas os parâmetros Y_x e $Y_{p/x}$ tiveram valores diferentes para as fermentações com reciclo.

Palavras-chave: Bioetanol, melaço, hidrolisado, modelagem, cinética química, fermentação alcoólica.

ABSTRACT

The objective of this paper is to model a process of ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate concentrated with molasses. For this purpose, experimental data were obtained from 23 batch fermentations with and without cells recycle in different temperatures: 30, 32, 34, 36 e 38 °C. The recycle aims to evaluate the influence of exposing the yeast *S. cerevisiae* to the hydrolysate inhibitors (specifically acetic acid) for long time periods, and under high cell concentrations. For each temperature the first fermentation was performed with fresh inoculum and at least 4 recycles were carried out.

Initially a model developed in a previous work (ANDRADE, 2007) for sugarcane molasses fermentation was evaluated. This model was not able to describe new fermentations in the presence of changes of raw material, not even when the substrate was molasses from a different harvest. Due to the large number of parameters (11) in the model, a re-estimation methodology was proposed, in which the most sensitive parameters were adjusted and the less sensitive were kept fixed, making the re-estimation easier. A parametric sensitivity analysis through Plackett-Burman designs was performed, using the software STATISTICA, by varying the kinetic parameters and calculating their influence on the profiles of cell, substrate and ethanol concentrations. The most relevant parameters in the profiles were μ_{max} , P_{max} , Y_x and $Y_{p/x}$, which were chosen to be re-estimated when there was change in the substrate. With the re-estimation of these four parameters, it was possible to describe the experimental data from fermentation of molasses from a new harvest accurately.

The same re-estimation algorithm was used to adjust the parameters of the fermentation of hydrolysate concentrated with sugarcane molasses. In addition to the 4 parameters defined as most important (μ_{max} , P_{max} , Y_x , $Y_{p/x}$), X_{max} was also re-estimated, since the development of the original model did not consider recycling of cells, which resulted in a low biomass concentration. A term to account for the inhibition by acetic acid was added to the original model, so the related parameters were also estimated.

After the parameters re-estimation using a quasi-Newton optimization algorithm developed in COMPAQ VISUAL FORTRAN, a new sensitivity analysis was carried out to verify if the most sensitive parameters remained the same. In this case, μ_{max} had no influence if

the analysis was performed at the end of the fermentation, but by performing the sensitivity analysis at different times, μ_{max} was shown to influence the model profiles at the beginning of fermentation.

It was possible to develop an accurate model that described the batch fermentations with and without cells recycle as a function of temperature keeping 11 of the 13 parameters (adjusted from data of fermentation of hydrolyzate concentrated with molasses) fixed. Only the parameters Y_x and $Y_{p/x}$ had different values for the fermentation with recycle.

Keywords: Bioethanol, molasses, hydrolisates, modeling, kinetics, alcoholic fermentation.

ORGANIZAÇÃO DA TESE DE DOUTORADO

O capítulo 1 apresenta justificativas e motivações para realização deste trabalho, aspectos positivos referentes ao uso do etanol como combustível, e formas de tornar este combustível mais competitivo utilizando modos de fermentação mais atuais, como modo contínuo extrativo, e necessidade de se utilizar matérias-primas alternativas ao melaço e caldo de cana, como hidrolisado enzimático de bagaço, e as limitações a serem enfrentadas.

Ainda, é explicada a necessidade de se avaliar e desenvolver modelos matemáticos confiáveis que descrevam a cinética de fermentação alcoólica com essa nova matéria-prima.

No capítulo 2 será feita uma revisão geral dos assuntos pertinentes a este trabalho, como conceitos envolvendo a produção de etanol de segunda geração, fermentação alcoólica, matérias-primas utilizadas no futuro para produção de etanol, metodologias de pré-tratamentos mais utilizadas, hidrólise de bagaço de cana, formação de inibidores durante o processo de pré-tratamento e seus impactos na cinética de fermentação alcoólica. Ainda é abordada uma metodologia para obtenção de nova cinética a partir de hidrolisado, assim como a modelagem matemática do processo de primeira e segunda geração.

No Capítulo 3, será apresentado um capítulo publicado no livro “Bioethanol: Production, Benefits and Economics”, o qual trata de uma revisão considerando apenas o processo de produção de etanol de primeira geração, enfocando a existência de problemas e limitações, tais como grande geração de vinhaça e consumo excessivo de água. Assim, várias alternativas de processos extrativos são comentadas como forma de superar esses problemas, e ao mesmo tempo, resolver a inibição por etanol na cinética do processo, alcançando maior produtividade. Dá-se então enfoque na modelagem deste tipo de processo, e é comentada a importância de se utilizar modelos confiáveis e de qualidade para procedimentos de otimização.

No capítulo 4 será apresentado um artigo publicado na revista “Bioprocess and Biosystems Engineering” que descreve o uso da metodologia de Placket-Burman para determinação dos parâmetros cinéticos mais importantes de um modelo matemático desenvolvido para produção de etanol a partir de melaço. Neste artigo os parâmetros foram re-estimados para o processo de primeira geração quando ocorriam flutuações na qualidade da matéria-prima. A

mesma metodologia de re-estimação será aplicada para re-estimar os parâmetros mais significativos quando o melaço de cana misturado ao hidrolisado for usado como matéria-prima nos próximos capítulos.

O capítulo 5 mostrará um artigo desenvolvido, a ser submetido para publicação em periódico internacional. Este trabalho trata do levantamento experimental da cinética de fermentação alcoólica a partir de uma mistura de hidrolisado de cana-de-açúcar e melaço. A partir dos dados colhidos, são ajustados os parâmetros cinéticos do modelo, e estes são comparados com valores obtidos para fermentação a partir de melaço diluído, mostrando as diferenças, e reforçando ainda a necessidade de se desenvolver um novo modelo (considerando novo termo de inibição por componentes do hidrolisado no crescimento microbiano) para fermentação a partir de hidrolisado de bagaço de cana, sendo que os modelos cinéticos de fermentação desenvolvidos para representar a produção de etanol de primeira geração não são adequados para segunda geração.

No capítulo 6 serão apresentados os dados experimentais coletados de fermentações em batelada sucessivas, realizadas para mistura de melaço e hidrolisado, a partir dos quais um modelo matemático é ajustado e validado. Os perfis de concentração de células viáveis, açúcares redutores totais, ácido acético e etanol são apresentados em função do tempo para temperaturas na faixa de 30 – 38 °C, sem e com reciclo de células. Com esses dados, é realizado o ajuste dos parâmetros cinéticos do modelo utilizando uma rotina BCONF, baseada no método de quasi-Newton, desenvolvida em COMPAQ VISUAL FORTRAN, versão 6.6. Os parâmetros obtidos são modelados em função da temperatura de fermentação para os dados de batelada sem reciclo de células. Para as demais fermentações, utilizando reciclo, foram ajustados os parâmetros cinéticos, e avaliados o comportamento dos parâmetros Y_x e $Y_{p/x}$ com a temperatura. Com o modelo ajustado e validado, foi realizada análise de sensibilidade dos parâmetros cinéticos para a determinação dos mais relevantes do modelo, aplicando a metodologia de Plackett-Burman em função do tempo de fermentação.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1 Introdução Geral e Objetivos

Ultimamente, muita atenção tem sido dirigida à utilização de biomassa para a produção de energia por conta da redução de reservas de combustíveis fósseis e aquecimento global. O etanol tem sido citado como uma boa alternativa para resolver problemas ambientais e de energia. Nos Estados Unidos, apesar do etanol corresponder, em base energética, a somente 5,4 % da gasolina consumida, esse tem sido o biocombustível alternativo mais atrativo (WANG *et al.*, 2011), por ser produzido em larga escala, e ainda pela possibilidade de mistura com gasolina (BOTERO *et al.*, 2006; MACEDO *et al.*, 2008).

Segundo (GOLDEMBERG *et al.*, 2008), o uso do etanol como combustível tem se destacado em vários aspectos em relação aos combustíveis fósseis, como a redução de emissão de gases do efeito estufa, e por ser uma fonte renovável de energia. Somente os implementos agrícolas, defensivos, insumos industriais, caminhões e uso de fertilizantes ainda são dependentes de combustíveis fósseis na cadeia de produção de etanol. Ainda, no Centro-Sul do Brasil, o uso do etanol evitou a emissão de CO₂ correspondente a 2,6 t CO₂ eq m⁻³ de etanol anidro, e 1,7 para hidratado (MACEDO *et al.*, 2008), sendo que esse panorama ainda pode ser mudado com as legislações restritivas à queima de cana. De acordo com uma estimativa realizada pela “International Energy Agency” (IEA), para no ano de 2002, para cada gWh de energia gerado, emitiu-se 579 t de CO₂ eq, porém a previsão para 2030 é que esse fator caia para 535 t CO₂ eq (gWh)⁻¹ (MACEDO *et al.*, 2008). Ainda, segundo o mesmo autor, a tendência de emissões não relacionadas ao uso de combustíveis fósseis é cair até 2020. Comparando 2006 com projeções para 2020, haverá redução da emissão de metano devido à queima de resíduos, passando-se de 5,4 kg CO₂ eq/ tonelada de cana para zero; de NO₂ de 1,8 kg CO₂ eq/ tonelada de cana para zero; e NO₂ devido ao uso de fertilizantes, de 8,9 para 8,6 kg CO₂ eq/ tonelada de cana. Essas reduções estão ligadas principalmente ao fim das queimas de palha e redução na utilização de minerais como fertilizantes na lavoura.

A geração de CO₂ tem ainda sido reduzida devido ao ganho de eficiência em caldeiras industriais e à mecanização gradativa da colheita com a eliminação das queimadas (MIRANDA *et al.*, 1994). Em um trabalho recente (FEHR *et al.*, 2011) é comentado que para cada tonelada de cana-de-açúcar madura, 454 kg de CO₂ são consumidos para a produção de fibras e açúcares. Para cada tonelada de cana processada, a geração de CO₂ liberado na fermentação e queima do etanol, e subprodutos como bagaço e fibras, soma-se 387 kg. Porém, é importante ressaltar que há também emissões de gases do efeito estufa devido à queima de combustíveis fósseis no processo, transporte de cana e vinhaça, produção de fertilizantes, herbicidas, inseticidas e produtos químicos utilizados na planta industrial (MACEDO *et al.*, 2008). Assim, as análises de emissões variam bastante para cada processo em particular e deve ser realizada de forma bastante cuidadosa, considerando não somente o impacto global, porém local. Mais detalhes sobre o assunto podem ser encontrados em Macedo *et al.* (2008), Wang *et al.* (2011), Kaliyan *et al.* (2011) e Goldemberg *et al.* (2008).

Apesar do grande número de efeitos positivos relacionados ao consumo do etanol, existem muitas críticas em relação à possível expansão excessiva do cultivo de cana para fim de produção de combustível no Brasil. No entanto, segundo Goldemberg *et al.* (2008), as áreas adequadas para o plantio de cana no país estão limitadas às condições de solo, precipitação pluviométrica e logística, sendo que regiões como o nordeste requerem altos investimentos em irrigação. O mesmo autor cita também que ao longo dos anos não se observou decréscimo das áreas agriculturáveis para a produção de alimentos no país, mesmo com o aumento do cultivo de cana. É importante ressaltar que muitas áreas possíveis para expansão são terras degradadas ou de pasto, o que não ameaça a produção de alimentos nem áreas da Floresta Amazônica. A rotação de cultura no cultivo da cana de açúcar permite ainda que 20 % de sua área seja utilizada para alimentos.

Com a escassez de combustíveis fósseis e advento de veículos bicomcombustíveis no Brasil, o aumento na produção de etanol combustível torna-se uma necessidade para atender o mercado interno.

Em relação à geração de empregos, o setor sucroalcooleiro em 2011 foi responsável pela criação de 63,2 % dos novos empregos no Estado de São Paulo no mês de abril devido à

colheita e moagem de cana (AGÊNCIA-ESTADO, 2011). Apesar disso, comparando com os anos anteriores, a expansão no setor e geração de empregos foi menor e apresenta tendência de queda nos anos seguintes, principalmente devido à mecanização. De acordo com o Procana (2011), o setor sucroenergético foi responsável por movimentar 60 bilhões de Reais na safra de 2010/11, e gerou 4,5 milhões de empregos de forma direta e indireta, o que demonstra a importância do setor na economia do país.

Pode-se ainda acrescentar que o setor sucroalcooleiro apresenta maior relação entre geração de empregos por quantidade de investimento quando comparado com outros setores industriais (20 vezes mais que no setor petroquímico), segundo (GOLDEMBERG, 2002).

O Brasil ainda tem boas perspectivas para a produção de etanol, já que os preços dos combustíveis fósseis têm crescido drasticamente, o que torna o combustível verde mais competitivo. O setor agroindustrial tem ganhado eficiência, o que leva o preço do etanol a tornar-se menor que o da gasolina. No entanto, em 2011, mesmo no período de safra, o preço do etanol não sofreu queda, como aconteceu nos anos anteriores, e poderá ser mantido alto, com a finalidade de reduzir a oferta pelo biocombustível e permitir estoque do mesmo para ser utilizado em períodos de entressafra, evitando assim a falta do produto no mercado (VALLE, 2012). Vale ressaltar que a produção de etanol hidratado no Brasil até janeiro de 2012 foi reduzida em 29,30 % em relação à safra anterior, e foram importados 790,38 milhões de litros de etanol anidro, pela região Centro-Sul para ofertar ao mercado interno. A queda da produção de cana no Brasil é citada como uma consequência de forte estiagem e geadas ocorridas (MORENO, 2011). Além disso, outros fatores têm contribuído para a redução na produção de etanol, como o endividamento dos usineiros, o que os levou a moer mais cana para a produção de açúcar devido ao seu maior preço (SANTOS, 2011), e a falta na reforma dos canaviais, o que levou à queda de produtividade em cana-de-açúcar (CONAB E MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2012).

Algumas melhorias têm sido propostas ultimamente visando aumentar a produtividade de processos fermentativos, como a utilização de um sistema contínuo com retirada do produto do meio fermentativo a vácuo, e conseqüentemente reduzindo a inibição pelo produto, resultando em melhor desempenho que em processos industriais convencionais e incrementando produtividade (ATALA, 2004; MARIANO *et al.*, 2010). Além disso, o desenvolvimento de

estratégias de controle eficientes têm reduzido custos de produção e impactos ambientais por possibilitar a manutenção do processo em condições definidas como ótimas (COSTA *et al.*, 2002). Grande parte da queda nos custos de produção deve-se a trabalhos desenvolvidos para redução do uso de vapor e otimização energética.

O processo contínuo extrativo tem despertado bastante interesse industrial devido à redução de custos fixos e de manutenção ligado ao fato da não necessidade de trocadores de calor no processo, com a instalação do tanque flash. Além disso, o flash possibilita a alimentação de alta concentração de açúcares, levando a maior produtividade em etanol e menor geração de vinhaça (ATALA, 2004).

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

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

Ainda, segundo Godoy *et al.* (2008), o baixo custo de instalação de processos contínuos pode ser apreciado devido à redução nas dimensões dos fermentadores e menor necessidade de trocadores de calor se comparados com os modos em batelada. Brethauer e Wyman (2010) comentam que os processos contínuos para produção de etanol desenvolvidos na década de 70 enfrentaram diversos problemas, dentre eles baixa produtividade e rendimentos, o que inviabilizou a aplicação deste modo de operação em larga escala. Já na atualidade, com o conhecimento de modelos cinéticos e aplicação de ferramentas de otimização, pode-se obter processos mais estáveis, flexíveis, com alto rendimento e produtividade.

O Brasil está em posição de destaque na produção de etanol via processos fermentativos no mundo, e o estudo do processo desperta grande interesse industrial e econômico.

Segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2011), a quantidade de cana-de-açúcar moída na safra de 2010/2011 foi de 623.905,1 mil toneladas e está prevista para a próxima safra de 2011/2012 aumentar para 641.982 mil toneladas. Do total de cana moída para a próxima safra, 333.101,8 mil toneladas serão usadas para produção de etanol, rendendo aproximadamente 27.090.915,6 mil litros deste biocombustível.

Uma forma de se aumentar a competitividade do etanol é a utilização total da cana-de-açúcar, o que inclui bagaço e palha, através da tecnologia de hidrólise, na qual os polissacarídeos contidos na cana-de-açúcar são transformados em açúcares fermentescíveis (MARTÍN *et al.*, 2007), e posteriormente em etanol combustível. Essa tecnologia ainda não está madura, porém apresenta grande potencial de aumento de produtividade de etanol por área plantada, reduzindo o impasse entre produção de biocombustíveis e alimentos.

Pesquisadores do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) acreditam na opção de integração do processo de produção de etanol de segunda geração com a tecnologia de primeira geração. Para isso, desenvolveram um projeto no qual o caldo hidrolisado será misturado na etapa de fermentação ao caldo de cana. A idéia de acoplar a planta de hidrólise a um processo de primeira geração, segundo eles, permite o aproveitamento da estrutura já instalada no Brasil, o que provavelmente facilitará sua implementação. O início da operação da planta desenvolvida pelo CTC está previsto para 2013 (CIÊNCIA, 2011).

Uma grande vantagem de se misturar caldo hidrolisado com caldo de cana, ou melaço, é a obtenção de um meio de fermentação com maior concentração de açúcares fermentescíveis em relação ao hidrolisado puro (quando a hidrólise é realizada com baixa concentração de sólidos); o que resultaria em maior concentração de etanol final no reator. Altas concentrações do álcool levam conseqüentemente a menor gasto de energia na etapa de destilação, como comentado por Hoyer *et al.* (2010). É importante lembrar que a baixa

concentração de etanol obtida pela fermentação de hidrolisado puro obtido a partir de hidrólise com baixa concentração de sólidos, exigiria fermentadores com dimensões gigantescas, tornando muito alto o custo de instalação dos processos, e resultando em grande quantidade de vinhaça gerada.

Outra opção para obter caldo hidrolisado com altas concentrações de açúcares seria realizar a hidrólise com altas concentrações de sólidos. Em um trabalho recente (CARLI, 2011), foram realizadas hidrólises enzimáticas com até 20 % de sólidos, obtendo um caldo concentrado em glicose, porém com conversão baixa de celulose em glicose.

Assim, em geral, processos de hidrólise com alta carga de sólido ainda levam a baixa conversão na hidrólise, além de levarem a outros problemas, como dificuldades da transferência de calor, aumento do gasto energético para agitação, entre outros. Sendo assim, o trabalho com baixas concentrações de sólidos na hidrólise e posterior concentração do caldo com melaço para aumento de concentração de etanol obtido no final da fermentação é uma opção. No entanto, deve-se levar em consideração que esta solução não poderá ser a única. O melaço é um subproduto da produção de açúcar e nem todas as plantas de segunda geração estarão integradas a usinas de produção açúcar, mesmo que a opção venha a ser integrá-las sempre com a produção de etanol de primeira geração.

É importante comentar que segundo Brethauer e Wyman (2010), o melaço na etapa de fermentação serve como fonte de minerais e nutrientes necessários para o crescimento microbiano. Assim, a adição de melaço ao hidrolisado, além de todas as vantagens comentadas, serve como uma suplementação do caldo hidrolisado usado para produção de etanol. Bernardo Neto (2009) realizou estudos de integração de tecnologias de obtenção de etanol de primeira e segunda geração e comenta que esta possibilita grandes ganhos de eficiência energética, na ordem de 25 %, com a utilização de 100 % de bagaço e 50 % de palha. O autor ainda comenta que o ganho de eficiência energética integrando plantas de primeira e segunda geração é muito superior ao obtido por uma planta de primeira geração, mesmo operando com caldeiras em condições otimizadas para o segundo caso.

Dentre as técnicas existentes para hidrólise, tem-se a via ácida e enzimática. A primeira é mais rápida e usa reagentes mais baratos, porém requer equipamentos caros, resistentes à corrosão (ZHENG; ZHANG, 2009), e apresenta grande formação de produtos inibidores da etapa de fermentação (RIVERA *et al.*, 2010), o que requer processos adicionais para prévia detoxificação do caldo hidrolisado para aumento de sua fermentabilidade, o que é indesejável economicamente (MARTÍN *et al.*, 2007). Já na hidrólise enzimática, têm-se os altos custos das enzimas envolvidas no processo, porém a formação de inibidores de fermentação é menor devido às condições mais suaves usadas, o que resulta em maior rendimento em açúcares fermentescíveis (RABELO, 2010) e, conseqüentemente, etanol produzido.

Segundo Wyman (1996), existem diversas opções para se produzir etanol a partir de matéria-prima lignocelulósica, variando desde o uso de diversos microrganismos a tipos de processos. Apesar da gama de possibilidades, este autor comenta que a *S. cerevisiae* ainda é o microrganismo mais comum usado para produção de etanol a partir de amido e biomassa celulósica, sendo também o mais comum quando a matéria-prima é caldo ou melaço de cana. Dentre os tipos de processos, dois principais se destacam: Sacarificação e fermentação simultâneas (“simultaneous saccharification and fermentation” - SSF) e Hidrólise e fermentação separadas (“separated hydrolysis and fermentation” - SHF). A tecnologia de SSF consiste em realizar a sacarificação e fermentação em uma única etapa, o que reduz o custo de instalação de tanques, porém seu gargalo está na grande diferença entre temperatura ótima de sacarificação (45-50 °C) e fermentação (30 °C), o que torna difícil trabalhar em condições mais apropriadas. A tecnologia de SHF permite explorar os pontos ótimos de cada etapa, podendo alcançar 100 % da conversão da celulose presente no material pré-tratado, e obter rendimentos em etanol na fermentação próximos ao estequiométrico (RABELO, 2010). Ainda, o modo SHF, utilizado neste trabalho, possibilita integrar o processo de hidrólise à estrutura já instalada no parque industrial brasileiro. Mais detalhes serão mostrados no capítulo 2.

Uma rota alternativa atualmente estudada para produção de etanol é a CBP (“consolidated bioprocessing”). Essa consiste no uso de microrganismos para cumprir etapas de produção de enzimas, hidrólise e fermentação em um único reator, envolvendo desde a produção de celulase para hidrólise da celulose, até a fermentação das hexoses e pentoses que resultam

desta etapa a etanol ou outros bioprodutos (SENDICH *et al.*, 2008), possibilitando baixos custos de produção se comparado com técnicas que envolvem as etapas separadamente (XU *et al.*, 2009). Uma empresa de pesquisas em biocombustíveis, a Mascoma Corp., propôs um processo CBP. Dentre as limitações desta abordagem está desenvolver e lidar com microrganismos geneticamente modificados, que pode vir a ser de difícil operacionalização na indústria sucroalcooleira, por poder sofrer variações não previstas, além de necessitar de estudos do impacto ambiental desses.

Os principais componentes inibidores gerados na hidrólise de material lignocelulósico são ácidos fracos (principalmente ácido acético), furfural e hidroximetilfurfural, e compostos fenólicos (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Estes compostos presentes no caldo hidrolisado afetam de forma bastante significativa o desempenho das principais linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas no meio industrial (MODIG *et al.*, 2008), levando à modificações na cinética de produção de etanol.

Trabalhos como o de Finguerut *et al.* (2008) citam que as fermentações de hidrolisados não detoxificados geralmente são caracterizadas por apresentar cinética lenta, o que leva à baixa produtividade em etanol e rendimentos limitados devido à diferença na cinética da fermentação alcoólica a partir de hidrolisado, comparando com processos tradicionais que utilizam melaço de cana-de-açúcar, caldo de cana ou mistura de ambos como matéria-prima. Assim, novos estudos cinéticos são necessários para a obtenção de modelos matemáticos confiáveis e adequados que descrevam a etapa de fermentação. Esses modelos são importantes para se alcançar uma eficiente produção de etanol em escala industrial a partir de biomassa celulósica através de otimização, visando obter configurações ótimas e viáveis do processo (MORALES-RODRIGUEZ *et al.*, 2011), estudo do seu comportamento dinâmico e desenvolvimento de estratégias de controle.

Apesar da importância do conhecimento da cinética da fermentação no desenvolvimento do processo de produção de etanol a partir de matéria-prima lignocelulósica, muitos trabalhos tratam da otimização da etapa de hidrólise e há poucos estudos sobre desenvolvimento de modelos que descrevem a cinética da fermentação a partir de hidrolisados.

É importante ressaltar que em uma recente publicação, Sanda *et al.* (2011) comentam que existem diversos trabalhos na literatura que tratam de fermentações em bateladas sequenciais (sendo uma prática bastante comum na indústria brasileira) a partir de substratos de cana-de-açúcar, amido e xilose, porém somente recentemente no seu trabalho foi investigada a fermentabilidade de material lignocelulósico para produção de etanol envolvendo reciclo. Até este momento, não foram encontrados trabalhos na literatura de estudo da fermentabilidade e modelagem da cinética de hidrolisado integrado com melaço, por levedura não geneticamente modificada, realizando sucessivas bateladas.

Levando em conta as tendências comentadas para o setor de produção de bioetanol, este trabalho tem como objetivo geral desenvolver um modelo matemático que descreva a cinética de fermentação alcoólica a partir de uma mistura de hidrolisado enzimático e melaço, envolvendo a prática de reciclo celular de forma a analisar a influência dos inibidores contidos no hidrolisado na cinética da fermentação. Para se alcançar esses objetivos, os seguintes passos foram cumpridos:

- i. **Análise de sensibilidade paramétrica para produção de etanol de primeira geração.** Utilizando o modelo cinético ajustado para descrever a fermentação alcoólica a partir do melaço diluído (produção de etanol de primeira geração), foi realizada a análise de sensibilidade dos parâmetros cinético deste modelo através da metodologia de Plackett-Burman. Assim, de acordo com uma matriz de planejamento desenvolvida, variavam-se os parâmetros, e observava-se o efeito destes nas respostas das simulações, tais como concentração de etanol e células obtidos, e tempo de fermentação necessário para consumo total de substrato. Desenvolveu-se uma rotina de re-estimação dos parâmetros mais sensíveis do modelo, mantendo os demais fixos, e avaliou se a eficácia de aplicação desta para descrever a cinética de fermentação com melaço obtido a partir de cana-de-açúcar de safra diferente.

- ii. **Levantamento dos dados cinéticos da fermentação de uma mistura caldo hidrolisado e melaço.** Na etapa de preparação do caldo hidrolisado, amostras de bagaço seco foram submetidas a um processo de pré-tratamento por peróxido de hidrogênio alcalino (RABELO, 2010) seguido de hidrólise enzimática para obtenção de 30 L de caldo hidrolisado a ser utilizado como meio fermentativo. Foram realizados diversos experimentos em modo batelada para obtenção dos perfis cinéticos da produção de etanol, consumo de substrato e crescimento microbiano de uma linhagem de levedura *S. cerevisiae*. Após a primeira fermentação, retirou-se o caldo fermentado de forma asséptica, transferindo o mesmo para tubos de centrifuga previamente esterilizados. Após etapa de centrifugação o precipitado contendo células concentradas foi diluído e inoculado para início de uma nova fermentação com mistura de melaço e hidrolisado, como realizado no primeiro ciclo. Esse reciclo foi repetido para outras bateladas para avaliação da cinética por longos tempos de exposição ao caldo hidrolisado.
- iii. **Modelagem da cinética de fermentação alcoólica de melaço e hidrolisado.** Utilizando um modelo matemático existente, foram estimados os parâmetros cinéticos com dados de fermentação utilizando uma mistura de hidrolisado e melaço, e adicionado um termo de inibição por ácido acético no modelo. Para ajuste do modelo, utilizou-se uma subrotina de otimização desenvolvida em Compaq Visual Fortran, versão 6.6. Foram analisadas as diferenças da cinética microbiana para meios contendo melaço com ou sem adição de hidrolisado. Avaliou-se também o impacto do reciclo de células nos parâmetros cinéticos, bem como o rendimento em etanol e produtividade. O estudo e prática do reciclo de células é interessante do ponto de vista industrial devido à redução de tempo e custos envolvidos na preparação do inóculo (SANDA *et al.*, 2011), e possibilidade de adaptação das células ao processo fermentativo (SLININGER *et al.*, 2011).
- iv. **Análise de sensibilidade paramétrica para o processo em batelada.** Através do uso do software Statistica e metodologia de análise de sensibilidade por Plackett-Burman, foi avaliada a influência dos parâmetros (do total de 13) do modelo

desenvolvido para fermentação de hidrolisado, através do impacto destes no tempo de fermentação, concentração celular e etanol finais. Assim, determinaram-se os parâmetros que devem ser variados, e os fixados em procedimentos de re-estimação, com mudança de qualidade de matéria-prima.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fermentação alcoólica

O processo de fermentação alcoólica vem sendo bastante estudado nas últimas décadas, sendo que atualmente a etapa de fermentação tem alcançado rendimentos fermentativos bastante altos, em torno de 91 %, nos últimos 30 anos, e pouco se tem a ganhar com melhorias neste sentido (FINGUERUT *et al.*, 2008). Por outro lado, os processos industriais de fermentação no Brasil operam tradicionalmente em modo batelada alimentada, sendo que melhorias ainda podem ser feitas em relação ao modo de operação, e principalmente diversificação no uso, e redução de custos das matérias-primas utilizadas para obtenção de etanol via fermentativa.

2.2 Matéria-prima para produção de etanol

Existe uma ampla variedade de matérias-primas disponíveis no mundo para produção de energia, variando deste a cana-de-açúcar no Brasil até milho nos Estados Unidos, arroz na China, entre outros. Ahmann e Dorgam (2007) comentam que a tendência mundial é substituir as matérias-primas que possuem potencial alimentício como o milho e cana-de-açúcar por outras fontes, como por exemplo, os resíduos agrícolas, entre eles o bagaço e a palha de cana, casca de arroz, rama de mandioca, palha e sabugo de milho e restos de cultura de soja (CORTEZ *et al.*, 2008a). A cana está em primeiro lugar na produção mundial dentre as matérias-primas disponíveis para produção de energia, porém em geração de resíduos, o resíduo do milho produzido nos Estados Unidos equivale a aproximadamente ao triplo do bagaço da cana no mundo, o qual equivale a um terço da cana, sendo que outra terça parte é formada por palha. É importante lembrar que em algumas culturas como milho e soja, a quantidade de resíduos gerados é superior à matéria-prima propriamente dita. Assim, tecnologias novas para produção de energia a partir de resíduos devem ser desenvolvidas, visando aumento de produtividade de energia por

área plantada. Dados de produção de matéria-prima e resíduos potencialmente utilizados na produção e energia são mostrados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Matérias-primas disponíveis para produção de energia e quantidade de resíduos gerados, no mundo (CORTEZ *et al.*, 2008a)

Matéria-prima e resíduos gerados	Produção da matéria-prima (Mt)	Produção de respectivos resíduos*
Cana (bagaço)	1.318.178.070	395.453.421
Arroz (casca)	608.496.284	172.934.643,9
Milho (palha e sabugo)	705.293.226	934.442.995,1
Soja (restos de cultura)	206.409.525	320.966.811,4

* valores calculados baseando-se na informação de que 30 % da massa de cana processada torna-se resíduo após a extração do caldo, que equivaleria a 70 % da massa.

Um forte argumento para a utilização de material lignocelulósico para produção de combustíveis é a sua grande abundância na natureza a baixíssimos custos (WYMAN, 1996). No Brasil, a matéria-prima disponível para produção de etanol é a cana-de-açúcar, sendo que de 24 a 30 % (em peso) da mesma é constituída por bagaço (CORTEZ *et al.*, 2008b), o que mostra o grande potencial de aumento de produção de etanol utilizando este resíduo, sem necessidade de incrementos na área de plantio. Rocha *et al.* (2012) comentam que no Brasil, com o ganho de eficiência e melhorias técnicas implementadas em caldeiras, atualmente, metade do bagaço produzido é suficiente para suprir todas as necessidades energéticas das plantas industriais, sendo que existe ainda um excedente de 50 % em resíduos disponível para diversas aplicações no setor. Apesar da grande disponibilidade de bagaço no setor industrial, a sua utilização para produção de etanol ainda enfrenta barreiras tecnológicas e econômicas que devem ser rompidas com novas pesquisas, entre elas na área de hidrólise. A palha representa até 30 % da quantidade de energia contida na cana, e por isso deve ser aproveitada para produção de biocombustível com a eliminação das queimadas, que resultam em perda energética no setor (BRAUNBECK; CORTEZ, 2005), e causam impactos ambientais.

Dentre os impactos estão os danos ao solo devido à seca causada pela queima, aumento dos riscos de erosão, e emissões de gases que podem ser nocivos aos seres humanos, tais como CO, CH₄, compostos orgânicos, materiais particulados, e aumento da concentração de ozônio na troposfera (GOLDEMBERG *et al.*, 2008). Uma porção da palha deve ser deixada no solo para protegê-lo contra erosões, servir como herbicida natural, e por esta possuir metade da necessidade nutricional da cana (PINHEIRO, 2007). A fração de palha que poderá ser usada nas caldeiras seria de 50 a 80 % do total deixado no campo, com o fim das queimadas, o que ainda poderia gerar mais de 100 kWh de excedente em energia por tonelada de cana. A quantidade de palha deixada no campo é de 8 a 30 t.ha⁻¹.ano⁻¹, formando uma camada de 10 a 12 cm de espessura, a qual ajuda a manutenção da umidade no solo (RONQUIM, 2010).

2.3 Etapas de processamento do bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol

O bagaço de cana-de-açúcar apresenta estrutura bastante complexa, constituída por unidades divididas em celulose, hemicelulose e lignina (RABELO, 2010). A celulose é um polímero linear e cristalino formado por unidades de β-D- glicose, apresentando-se como uma estrutura rígida e bastante difícil de quebrar. Já a hemicelulose é formada por heteropolímeros lineares e ramificados de L-arabinose, D-galactose, D-glicose, D-manose e D-xilose, e se apresenta de forma não cristalina, sendo, portanto, mais fácil de ser hidrolisada (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996). Para produção de etanol a partir de material lignocelulósico, é requerida a etapa de hidrólise, onde frações celulósicas e hemicelulósicas são transformadas em açúcares mais simples, essencialmente monômeros (hexoses e pentoses). O caldo hidrolisado obtido então, rico em monômeros, pode ser enviado para a etapa de fermentação. Essas etapas são mostradas no fluxograma apresentado na Figura 2.1. Antes da hidrólise é necessária uma etapa de pré-tratamento (pré-hidrólise na figura), que está descrita em detalhes na próxima sessão.

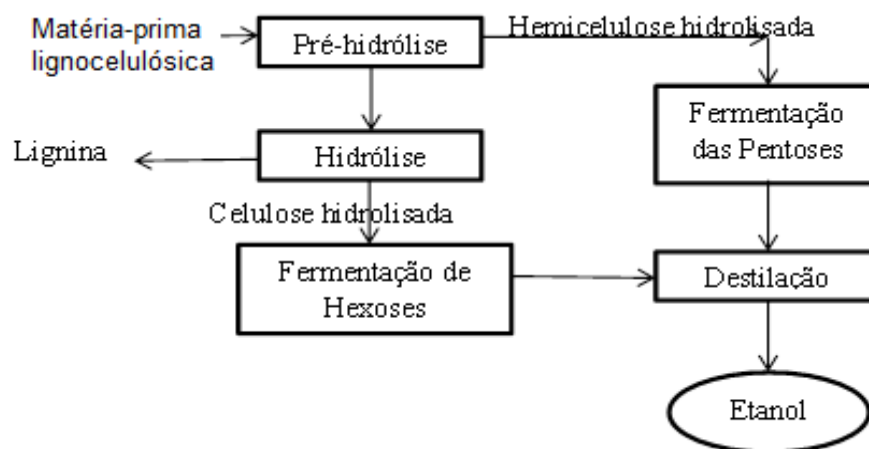


Figura 2.1 – Fluxograma geral da produção de etanol a partir de matéria-prima lignocelulósica (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996)

Um dos problemas do processo de transformação da matéria-prima lignocelulósica em pentoses e hexoses é a formação de compostos adicionais aos açúcares na etapa de pré-tratamento da matéria-prima. Estes compostos em geral apresentam efeito inibitório no crescimento microbiano e fermentação, sendo um agravante no processo (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996), reduzindo a produtividade e rendimento do mesmo.

2.4 Modos de operação para produção de etanol celulósico

2.4.1 Pré-tratamento

O pré-tratamento é uma etapa necessária no processo, previamente à hidrólise, pois a biomassa existente na natureza é bastante resistente à ação das celulasas. Isso ocorre devido à alta cristalinidade do material celulósico, presença de lignina e hemicelulose na estrutura, as quais fazem proteção da celulose, acetilação de hemicelulose e área superficial não acessível (WYMAN, 1996). A função dos pré-tratamentos é mudar a estrutura da matéria-prima lignocelulósica de forma a torná-la mais permeável à ação de agentes enzimáticos, para obtenção de altos rendimentos em açúcares que posteriormente são transformados em bioprodutos

(SANTOS *et al.*, 2011). A escolha do pré-tratamento é uma tarefa bastante complexa, pois cada tipo apresenta efeitos distintos nas frações de lignina, celulose e hemicelulose presentes na matéria-prima. Assim, as condições ótimas operacionais utilizadas nesta etapa, bem como tipo de pré-tratamento escolhido, são particulares para cada processo de hidrólise e fermentações subsequentes (ALVIRA *et al.*, 2010), não existindo uma metodologia de pré-tratamento universal.

Alizadeh *et al.* (2005) citam que o rendimento em açúcares após hidrólise enzimática de material não pré-tratado fica abaixo de 20 %, porém com a etapa de pré-tratamento seguida de hidrólise enzimática pode-se chegar a rendimentos superiores a 90 %.

A modificação na estrutura de matérias-primas lignocelulósicas pode ser realizada de forma física ou química. Santos *et al.* (2011) citam que os pré-tratamentos mecânicos, os quais consistem em reduzir o tamanho de partículas da matéria-prima para obtenção de maior área superficial, são métodos que demandam grandes quantidades de energia, o que os torna bastante caros. Já nos pré-tratamentos térmicos geralmente é aplicada alta temperatura (150, 180 °C ou mais) sobre a matéria-prima, o que pode levar a formação de compostos resultantes da degradação de hemicelulose e lignina. Esses compostos são extremamente desinteressantes para a etapa de fermentação devido à toxicidade que exercem em microrganismos. Existem na literatura diversos métodos de pré-tratamento, alguns dos quais serão descritos a seguir.

2.4.1.1 Pré-tratamento por explosão com dióxido de carbono supercrítico

O uso do dióxido de carbono na etapa de pré-tratamento de material lignocelulósico consiste na penetração deste fluido em condições supercríticas na estrutura do material e posterior descompressão brusca do ambiente, causando ruptura na estrutura cristalina da celulose e do selo formado pela lignina, levando à maior exposição do substrato à ação das enzimas. Através deste método pode-se obter maior rendimento em glicose no meio após a etapa de hidrólise (ZHENG *et al.*, 1998) se comparado com a matéria-prima não tratada.

Dentre as vantagens desta técnica de pré-tratamento está a possibilidade de se trabalhar a baixas temperaturas, o que evita a degradação e consequentemente perda dos

substratos presentes na matéria-prima. Vale lembrar que o CO₂ quando presente em soluções aquosas forma ácido carbônico, que associado a altas temperaturas leva à decomposição de monossacarídeos, e, conseqüentemente, perda dos compostos fermentescíveis e com potencial para produção de etanol. O CO₂ em condições supercríticas (temperatura e pressão superiores a 31,1 °C e 73 atm, respectivamente) difunde-se facilmente pela estrutura celulósica, penetra de forma mais fácil e profunda que fluidos subcríticos e causa maior rompimento de estruturas. Outras características favoráveis ao uso de CO₂ supercríticos estão no seu baixo custo, não toxicidade, grande disponibilidade no setor sucroalcooleiro (ZHENG *et al.*, 1998) e a possibilidade de sua reutilização (SANTOS *et al.*, 2011). A eficácia deste tipo de pré-tratamento depende bastante das particularidades de cada material aplicado, sendo que segundo Santos *et al.* (2011), este funciona melhor geralmente em materiais lignocelulósicos úmidos e bastante rígidos, sendo que o mesmo não apresenta bons resultados para matérias flexíveis.

O aumento da digestibilidade obtido com pré-tratamento de explosão por CO₂ é bastante significativo, ficando em torno de 50 a 70 % quando se trabalha a altas pressões (ZHENG *et al.*, 1998), podendo alcançar valores limites de 94,5 %, quando associado a baixas concentrações de 1-butanol, mesmo utilizando baixas pressões (PASQUINI *et al.*, 2005). É importante observar que as condições do pré-tratamento e rendimentos obtidos em glicose são bastante variados dependendo do tipo de matéria-prima com a qual se trabalha. Zheng *et al.* (1998) alcançaram rendimentos máximos em glicose em torno de 80 % (w/w) utilizando matéria-prima Avicel (um produto comercial de celulose pura), aplicando pressão de 4000 psi e temperatura de 35 °C. Já para bagaço de cana-de-açúcar, o rendimento máximo obtido foi bastante inferior, em torno de 45 %, aplicando pressão de 3000 psi e temperatura de 80 °C. Outros autores, como Narayanaswamy *et al.* (2011), em um trabalho recente, aplicaram pré-tratamento com explosão por CO₂ supercrítico em condições mais drásticas de temperatura (150 °C) e obtiveram rendimentos em glicose de apenas 30 %. Estes resultados de rendimentos bastante diversificados mostram que a escolha e sucesso do método de pré-tratamento está bastante ligado à matéria-prima.

2.4.1.2 Pré-tratamento por explosão a vapor

Esta metodologia já foi bastante investigada e aplicada no meio científico e por centros de pesquisa, em escala laboratorial e piloto. Tal técnica consiste em compressão do material lignocelulósico à altas temperaturas (160 – 260 °C), seguida de descompressão abrupta. O grande gargalo neste processo é a decomposição dos açúcares presentes na matéria-prima devido ao efeito da temperatura (TAHERZADEH; KARIMI, 2008). Estes mesmo autores citam que em alguns casos, aplicando esta metodologia, pode-se obter grande perda de xilose, na ordem de 75 a 90 %. Já Hsu (1996) comenta que este tipo de pré-tratamento é questionável para produção de etanol, pois resulta em baixos rendimentos em xilose, abaixo de 65 % do valor teórico. Apesar deste método não utilizar ácidos, durante esta etapa ocorre a formação de ácidos, devido à liberação de grupos funcionais da própria matéria-prima, que associados à umidade e alta temperatura, fazem uma reação denominada autohidrólise.

Rocha *et al.* (2012) utilizaram o pré-tratamento por explosão a vapor, seguido de deslignificação alcalina por NaOH, obtendo bons resultados para diversos tipos de bagaços de cana-de-açúcar de origens distintas. Os autores obtiveram alta solubilização, de 82,7 % de hemicelulose, e alcançaram hidrólise de 11,8 % da celulose após etapa de pré-tratamento, provavelmente referente à porção amorfa da celulose. Após a deslignificação, foi alcançada remoção superior a 90 % da hemicelulose e lignina, e hidrólise de 31,1 % da celulose. Esse processo já está sendo desenvolvido em escala piloto no Brasil.

Men *et al.* (2012) aplicaram pré-tratamento por explosão a vapor em palha de milho, seguido de hidrólise enzimática, e obtiveram caldo hidrolisado com alta concentração de glicose (120 g/L) sem necessitar de lavagem do material para detoxificação previamente à hidrólise. O caldo hidrolisado, apesar da alta concentração de ácido acético (8,73 g/L) e furfural (0,39 g/L), pôde ser fermentado a etanol utilizando linhagens de recombinantes de *Pichia stipitis* e *Saccharomyces cerevisiae*, altamente resistentes a inibidores. A conversão de glicose a etanol na etapa de fermentação foi acima de 95,9 %. Uma grande vantagem do pré-tratamento por explosão

a vapor está no curto tempo gasto na etapa, podendo chegar a 7 minutos, seguido de 1 h para deslignificação (SANTOS *et al.*, 2012).

2.4.1.3 Pré-tratamento hidrotérmico

Este tipo de pré-tratamento conhecido como LHW (do inglês, “liquid hot water”) é um método que se baseia no tratamento da matéria-prima lignocelulósica, no qual se associa efeito da umidade e alta temperatura. Como os demais processos térmicos, neste ocorre a solubilização de hemicelulose e posteriormente a lignina, em temperaturas a partir de 150- 180 °C (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Segundos os mesmos autores, a solubilização destes compostos a altas temperaturas, principalmente em meios ácidos, pode resultar em formação de compostos fenólicos e compostos heterocíclicos, tal como vanilina, furfural e hidroximetilfurfural, que apresentam efeito tóxico sobre microrganismos. Outro agravante deste tipo de processo é a possibilidade de após a solubilização destes compostos, ocorrer a sua precipitação sobre a matéria-prima, se não removidos. Laser *et al.* (2002) observou que trabalhando com concentração de sólidos no meio reacional acima de 3 %, com temperaturas superiores a 220 °C, mesmo em curto tempo de reação, esta metodologia de pré-tratamento térmico tornava o caldo hidrolisado obtido muito tóxico, o que inviabilizava a produção de etanol a partir do mesmo.

O pré-tratamento por água quente (LHW) vem como uma alternativa para o pré-tratamento por vapor, pois promove a solubilização da hemicelulose e evita a formação de compostos inibidores quando se trabalha com faixa de pH de 4 a 7 (MOSIER *et al.*, 2005). Ainda, o uso de quantidade maior de água no pré-tratamento LHW resulta na solubilização e menor concentração dos compostos inibidores que no pré-tratamento por vapor.

2.4.1.4 Pré-tratamento por mistura de ácidos diluídos

Uma opção de pré-tratamento bastante difundida na literatura é a com utilização de ácidos diluídos. O ácido sulfúrico é o reagente mais comum, seguido de outros, tal como

hidroclórico, nítrico e fosfórico (ROCHA *et al.*, 2012). Esses autores citam também uma opção de utilização do ácido acético combinado com peróxido de hidrogênio para deslignificação da matéria-prima, anteriormente à hidrólise.

Rocha *et al.* (2012) investigaram a eficácia do pré-tratamento constituído por mistura de ácido acético e sulfúrico 1 % (w/v) e bagaço de cana-de-açúcar à temperatura de 190 °C e alcançaram alta solubilização de hemicelulose, e conversão de celulose após a etapa de hidrólise em torno de 76 %, contra 6 % de conversão para bagaço sem pré-tratamento, após 72 h de reação. A grande vantagem deste processo está no curto tempo de residência (10 minutos), grande fração de hemicelulose removida (90 %), e baixa degradação de celulose. Ainda, a baixa concentração de compostos inibidores (2,21 g/L de ácido acético, 0,05 g/L de furfural e 0,01 g/L de HMF) presentes na fração líquida após pré-tratamento sugere sua boa fermentabilidade.

2.4.1.5 Pré-tratamento por solventes orgânicos

Esta metodologia de pré-tratamento pode ser utilizada para remoção ou decomposição de lignina e uma fração de hemicelulose, o que aumenta a digestibilidade da celulose, presente em fase sólida. A reação é realizada através de uma mistura de um solvente orgânico e água, podendo até serem utilizados catalisadores para aumento de desempenho na deslignificação (TAHERZADEH; KARIMI, 2008). Vários solventes estão disponíveis para este fim, sendo que a escolha do ideal depende do custo do mesmo, facilidade de separação e recuperação. Geralmente, esses solventes exercem alto poder inibitório nas etapas de hidrólise e fermentação, necessitando assim de etapa de remoção após pré-tratamento (SUN; CHENG, 2002).

Um solvente bastante promissor devido à sua disponibilidade e baixo peso molecular é o etanol. A grande limitação do seu uso é o poder inibitório exercido sobre as enzimas hidrolíticas (WYMAN, 1996) e na etapa de fermentação, necessitando de operação adicional para sua remoção. Solventes orgânicos com baixo peso molecular, e, por conseguinte, baixo ponto de ebulição são fáceis e economicamente viáveis para serem recuperados por evaporação e condensação. Ainda, alguns autores (SUN; CHENG, 2002) citam que o uso de solventes

orgânicos para pré-tratamento resultam em pequenas frações de lignina de baixo peso molecular que podem ser recuperadas para fins de geração de eletricidade, produção de adesivos e outros fins (PAN *et al.*, 2005).

2.4.1.6 Pré-tratamento biológico por fungos

Este tipo de pré-tratamento baseia-se na idéia de que algumas espécies de fungos e bactérias na natureza, devido à suas enzimas, tem capacidade de degradar lignina e hemicelulose, com pouco efeito sobre a estrutura da celulose (SÁNCHEZ, 2009). Dentre as enzimas envolvidas no processo de degradação da lignina estão as peroxidases e lacases (KUMAR; WYMAN, 2009; ALVIRA *et al.*, 2010). Segundo Alvira *et al.*(2010), apesar de algumas vantagens dos pré-tratamentos biológicos, tais como o baixo custo de equipamento, baixo consumo de energia, não uso de reagentes, e trabalho em condições brandas, o que levaria a menor degradação e consequentemente reduzida geração de componentes inibidores de fermentação, o motivo que torna o processo ainda inviável é a baixa taxa de reação obtida (tempo de reação na ordem de 10 dias), comparando com outros métodos concorrentes, o que requer pesquisas intensas na busca de microrganismos mais eficientes.

2.4.1.7 Pré-tratamento físico

Dois tipos de pré-tratamentos físicos são mais comuns, a redução mecânica e a extrusão. A redução mecânica é um método a priori bastante simples, que consiste na ação mecânica por moinhos sobre o material, visando à redução de grau de polimerização e cristalinidade da matéria-prima, o que resulta em aumento da superfície de contato e exposição do material. O grande limitante na redução mecânica é o gasto excessivo de energia, principalmente porque se trabalha com tamanho de partículas muito pequenos, na ordem de 0,2 mm (ALVIRA *et al.*, 2010), o que pode tornar este tipo de metodologia inviável em grandes escalas (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

A extrusão é uma tecnologia bastante recente que consiste na passagem da matéria-prima por uma extrusora, onde ocorre aquecimento, mistura e alta tensão de cisalhamento, levando a modificações físicas e químicas na matéria-prima lignocelulósica, tais como o rompimento da parede celular e aumento da área superficial. Este método ainda não foi muito investigado para tal fim (ALVIRA *et al.*, 2010), porém apresenta algumas vantagens como trabalho com alta concentração de sólidos, não gerar grandes quantidades de efluentes e perda de açúcares, e possibilidade de ser combinado com outros métodos de pré-tratamento (ZHANG *et al.*, 2012).

Zhang *et al.* (2012) otimizaram a rotação da rosca (80 rpm) para maximização do rendimento em glicose e xilose e alcançaram valores de 48,79 e 24,98 %, para palha de milho pré-tratada, correspondendo a um aumento de 2,2 e 6,6 vezes no rendimento destes açúcares após hidrólise, se comparado com digestibilidade da matéria-prima não pré-tratada.

2.4.1.8 Pré-tratamento alcalino

Os pré-tratamentos alcalinos são bastante efetivos, e promovem a solubilização da lignina, ao mesmo tempo com mínima solubilização de celulose e hemicelulose, se comparado com pré-tratamentos ácidos ou hidrotérmicos (CARVALHEIRO *et al.*, 2008). As soluções mais utilizadas nesse tipo de pré-tratamento para remoção de lignina são hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2), ou amônia (NH_3), e apresentam bons resultados para resíduos agrícolas (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

O papel da lignina é promover uma ligação entre a celulose e hemicelulose, formando uma estrutura rígida e bastante resistente à ação das enzimas. Assim, a solubilização da lignina torna a celulose mais acessível, e aumenta a taxa de reação da hidrólise (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

Uma das técnicas de pré-tratamento bastante explorada consiste no aumento da digestibilidade da celulose através da deslignificação do material através de uma combinação de hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio (GOULD, 1984, 1985). A metodologia do peróxido de hidrogênio alcalino consiste em submergir matéria-prima lignocelulósica em uma solução de

NaOH, com pH na faixa de 11 a 12, contendo peróxido de hidrogênio à temperatura ambiente (RABELO, 2007; TAHERZADEH; KARIMI, 2008). Segundo Taherzadeh e Karimi (2008), existem trabalhos que utilizaram este método para pré-tratamento de palha de trigo, obtendo elevados rendimentos em açúcares fermentescíveis, em torno de 97 % após a etapa de hidrólise enzimática. Ainda, o mesmo pré-tratamento, aplicando peróxido de hidrogênio diluído, mostrou-se bastante eficaz para casca de arroz no trabalho de Saha e Cotta (2007), sendo que se obteve conversão de 97 %, com concentrações muito baixas de inibidores de fermentação alcoólica, tais como furfural e hidroximetilfurfural. É importante ressaltar que a quantidade desses inibidores formados é mais alta quando se utiliza pré-tratamentos ácidos. Assim, os pré-tratamentos alcalinos apresentam grande potencial para serem usados quando se deseja obter caldo hidrolisado com boa fermentabilidade.

O Laboratório de Engenharia de Processos Fermentativos e Enzimáticos (LEPFE) vem trabalhando com o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino desde 2005. O trabalho de (RABELO, 2007) deu origem a um pedido de patente relacionado a este pré-tratamento (“Processo de Pré-Tratamento e Hidrólise de Biomassa Vegetal Lignocelulósica e Produto para a Produção Industrial de Alcoóis”, S.C. Rabelo, R. Maciel Filho e A.C. Costa, PI0802559-2). Desde então a tese de Garcia (2009) e Rabelo (2010) propuseram melhoras no processo.

Rabelo (2010) comenta que o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino promove a solubilização da lignina, e parcial degradação da hemicelulose, porém sem ocorrer degradações da fração celulósica da matéria-prima, sendo que nesta última, algumas modificações são observadas, como aumento de porosidade do material devido ao seu inchaço, redução do grau de polimerização e cristalinidade.

Rabelo (2010) cita que a combinação de peróxido de hidrogênio e hidróxido de sódio para pré-tratamento de resíduos aumenta a solubilização da lignina e hemicelulose de forma bastante significativa, mantendo 95 % ou mais da fração celulósica praticamente intacta. Segundo o mesmo autor, existe uma grande dependência entre pH do meio de pré-tratamento e conversão de celulose em glicose na etapa de hidrólise enzimática. Gould (1984) trabalhou com pré-tratamento em palha de trigo, e concluiu que a deslignificação deste material ocorre em pH a

partir de 10,5; e a quantidade máxima de lignina e hemicelulose solubilizadas, resultando em 100 % de conversão de celulose (obtida na fase insolúvel do material pré-tratado) em glicose, foi alcançada em pH acima de 11,5. Para valores de pH baixos, na faixa de 6,8; a quantidade de lignina solubilizada ficava em 15 % no máximo, resultando em uma baixa digestibilidade da matéria-prima.

Outro efeito observado por Gould (1985) na palha de trigo quando pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino é o aumento da absorção de água pela estrutura celulósica em quase 300 %, o que sugere a redução da cristalinidade dessa fração, resultando em maior facilidade e rapidez na digestibilidade da celulose na etapa de hidrólise enzimática. A grande limitação na metodologia usada por Gould (1985) foi o tempo reacional de 18 a 24 h, a 25 °C. Nos trabalhos realizados no LEPFE (RABELO, 2007; GARCIA, 2009; RABELO, 2010), o tempo de pré-tratamento foi reduzido para 1h, porém a quantidade de peróxido hidrogênio é bastante alta. Trabalhos em andamento visam diminuir a quantidade de peróxido usada sem perdas para o rendimento da hidrólise posterior.

Um argumento para a escolha e utilização do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino é a sua decomposição em oxigênio e água, evitando a necessidade de tratamento de resíduos, redução da cristalinidade da fração celulósica e, principalmente, a não geração de compostos como furfural e 5-hidroximetilfurfural. Este último fator pode ser determinante na escolha do pré-tratamento por peróxido, já que na grande maioria dos outros pré-tratamentos, esses inibidores são formados (RABELO, 2010). No entanto, este agente de pré-tratamento é caro, podendo tornar o processo de produção de etanol celulósico inviável economicamente.

Em um trabalho de otimização da etapa de pré-tratamento por peróxido, Rabelo (2007) investigou o efeito do tempo de reação, temperatura e concentração de peróxido de hidrogênio que maximizavam o rendimento global de glicose, e alcançou 0,362 g de glicose/ g de bagaço, correspondente a um rendimento global de 83,4 %, ponto que coincidia com o de máxima deslignificação (%). O tempo mostrou não ser estatisticamente significativo nesse pré-tratamento, e foi fixo em 1 h, e as condições ótimas de temperatura e concentração de H₂O₂ foram de 25 °C e 7,36 %, respectivamente, a pH de 11,5. Posteriormente, Rabelo *et al.* (2011)

otimizou a carga enzimática na etapa de hidrólise, chegando a rendimento global de 95,6 % usando 3,5 FPU/g bagaço de celulase e 25 CBU/g bagaço de β -glicosidase.

Devido à alta concentração e rendimento de glicose obtidos, ao curto tempo de reação requerido (1h), à possibilidade de se trabalhar em temperatura ambiente e à facilidade de lavagem do bagaço após pré-tratamento (RABELO *et al.*, 2011), a metodologia de pré-tratamento com peróxido de hidrogênio, nas condições ótimas desenvolvidas por Rabelo (2010) foi a escolhida neste estudo para a produção de caldo hidrolisado e posterior avaliação de sua cinética de fermentação para produção de etanol. Vale ainda lembrar que a glicose é o substrato de maior interesse na produção de etanol, já que os processos existentes de primeira geração utilizam linhagens de *S. cerevisiae*, as quais metabolizam somente hexoses. Segundo Rivera *et al.* (2010), o pré-tratamento com peróxido permite a conversão de quase que total de celulose em glicose após a etapa de hidrólise enzimática.

2.4.2 Sacarificação e fermentação simultâneas (SSF)

Uma das técnicas bastante promissoras e pesquisadas para produção de etanol de segunda geração é a sacarificação e fermentação simultâneas, do inglês, “simultaneous saccharification and fermentation” (SSF). Neste método os processos de hidrólise e fermentação são realizados de forma simultânea, no mesmo tanque, e pode requerer menor gasto de enzimas hidrolíticas se comparado com a hidrólise separada (GOLIAS *et al.*, 2002; GUPTA *et al.*, 2009). A idéia do método SSF é metabolizar a glicose por um microrganismo à medida que a mesma é formada (fermentando-a a etanol), reduzindo assim a inibição da enzima β -glicosidase na etapa de hidrólise. Assim, os processos de SSF alcançam taxas e rendimentos de hidrólise superiores aos métodos que aplicam hidrólise separada da fermentação (PARK *et al.*, 2010), porém estão suscetíveis a inibição dos microrganismos e da celulose devido à presença de etanol e compostos inibidores provenientes da etapa de pré-tratamento (SZCZODRAK; FIEDUREK, 1996; RABELO, 2007).

Uma grande limitação da metodologia de SSF é o fato do ponto ótimo de atividade das enzimas celulolíticas ocorrer em temperatura mais alta (50 °C) que a de fermentação (30-35 °C). Esta diferença pode ser superada com a utilização de diversas estratégias que visam elevar o rendimento global em etanol, como uso de microrganismos termotolerantes, os quais tem a capacidade de crescer em temperaturas mais altas (PARK *et al.*, 2010), ou variações de temperatura ao longo do tempo reacional, visando encontrar valores ótimos que favoreçam ora a reação de hidrólise, ora a fermentação (CHUN *et al.*, 2011).

A alta resistência à transferência de massa é um dos gargalos adicionais na SSF, o que limita a quantidade de sólidos insolúveis adicionados no meio reacional. Alguns autores tais quais Linde *et al.* (2007) e Sassner *et al.* (2006) alcançaram rendimentos máximos em etanol trabalhando com 5 % de sólidos insolúveis em água, sendo que valores mais altos levavam a rendimentos menores devido à alta viscosidade do meio, levando a limitações pela transferência de massa. Uma solução atualmente encontrada é realizar SSF em modo batelada alimentada, ou seja, alimentando o sólido de forma contínua para que as fibras sejam degradadas à medida que são adicionadas no tanque, reduzindo a viscosidade do meio se comparado a SSF em modo batelada. Este modo em batelada alimentada ainda promove a diluição de inibidores de fermentação à medida que são produzidos (HOYER *et al.*, 2010). Chun *et al.* (2011), utilizando diferentes estratégias de batelada alimentada para SSF, na qual era iniciado o processo com 10 % (w/v) de sólidos, e alimentando adicionais 3 % no tempo de 8 e 16 h, e levado o experimento até 24 h, obteve-se etanol na concentração máxima de 37,9 g/L, comparando com 33 g/L em batelada.

Park *et al.* (2010), trabalhando com SSF com carga de 25 % (w/v) de sólidos insolúveis em água, alcançaram concentrações superiores a 8,4 % (v/v) em etanol, utilizando 140 FPU de celulase/g substrato, a 50 °C, pH inicial de 4,8 e uma linhagem de *S. cerevisiae* KNU 5377, a qual apresenta termotolerância.

2.4.3 Sacarificação e fermentação separadas (SHF)

No método SHF, do inglês “separated hydrolysis and fermentation”, a hidrólise é realizada para conversão de celulose em glicose, e posteriormente, a glicose é fermentada a

etanol, ocorrendo duas etapas distintas. A grande vantagem desse tipo de processo é a possibilidade de se trabalhar com cada etapa em temperaturas ótimas, sendo de 45 a 50 °C para a hidrólise enzimática e 30 °C para fermentação (WYMAN, 1996). A desvantagem da SHF é a inibição da enzima β -glicosidade pela glicose liberada no meio reacional na etapa de hidrólise e grande quantidade de enzimas utilizadas, o que torna o processo caro. Alguns estudos recentes visam otimizar a etapa de hidrólise enzimática em relação à quantidade de glicose liberada, minimizando o uso de enzimas, como apresentados na secção posterior.

2.4.4 Hidrólise Enzimática

Alguns tipos de técnicas estão disponíveis para obtenção de açúcares diretamente fermentescíveis a partir de matéria-prima lignocelulósica, entre elas a hidrólise ácida (com ácidos diluídos ou concentrados) e a hidrólise enzimática (RABELO, 2007). A grande vantagem da hidrólise enzimática é a obtenção de altos rendimentos em açúcares fermentescíveis, devido à menor formação de subprodutos, pois o processo é realizado em condições mais brandas (RABELO, 2007). Já na hidrólise ácida, a hemicelulose passa por solubilização antes da celulose, levando à formação de furfural a partir da xilose produzida, reduzindo o rendimento em açúcar e inibindo a fermentação (GARCIA, 2009). Segundo este mesmo autor, a hidrólise enzimática leva a rendimentos próximos ao estequiométrico sem formação de inibidores. É importante lembrar que este tipo de processo utiliza condições mais brandas de temperatura e pressão e gera menos poluentes que a opção ácida, o que o torna interessante do ponto de vista ambiental.

As enzimas mais comuns nos processos de hidrólise são as celulasas, as quais formam um complexo enzimático que atua de forma sinérgica, constituído por três enzimas principais, as endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidade (celobiase). As reações ocorrem na seguinte sequência (ZHENG *et al.*, 2009):

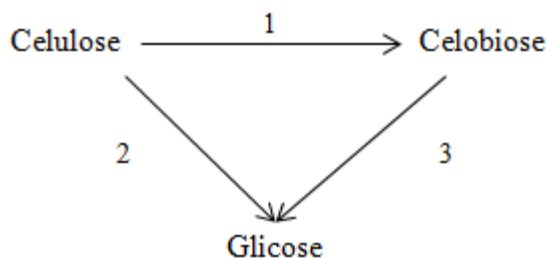


Figura 2.2 – Representação esquemática das reações de hidrólise enzimática de material lignocelulósico (Adaptado de Zheng *et al.*(2009))

Segundo Zheng *et al.* (2009), as reações de hidrólise acontecem em 3 etapas básicas, como apresentado na Figura 2.2. Na etapa 1, ocorre uma reação heterogênea de conversão de celulose em celobiose pela ação das enzimas endoglucanase e celobiohidrolases I e II; a reação 2 consiste em uma reação heterogênea catalisada pelas celobiohidrolases I e II, para produção de glicose a partir de celulose, e a 3 é uma reação homogênea de transformação de celobiose em glicose pela ação da enzima β -glicosidase (MOREIRA NETO, 2011).

As endoglucanases agem no meio da estrutura cristalina (formadas por muitas ligações de hidrogênio) da celulose, atuando sobre as bandas β (1-4), transformando a estrutura em regiões amorfas, formando cadeias de menor peso molecular. Já as exoglucanases agem sobre as extremidades das cadeias, sobre as áreas expostas após ação das endoglucanases, liberando a celobiose. Em outra etapa, ocorre a ação da β -glicosidase sobre a celobiose, formando a desejada glicose. Conforme acontece a reação, ocorre a formação de celobiose e glicose no meio, as quais inibem a ação da exoglucanase e β -glicosidase, reduzindo assim o rendimento do processo (GARCIA, 2009). A Figura 2.3 mostra a ação das enzimas atuando sobre a estrutura da celulose, formada por uma porção amorfa e cristalina (C), esta última é bastante ordenada. As enzimas CBHI (1,4- β -D-glucana-celobiohidrolase I) e CBHII (1,4- β -glucana-celobiohidrolase II) atuam nos terminais redutores e não redutores, respectivamente (GARCIA, 2009), e as exoglucanases atacam a porção desordenada da celulose.

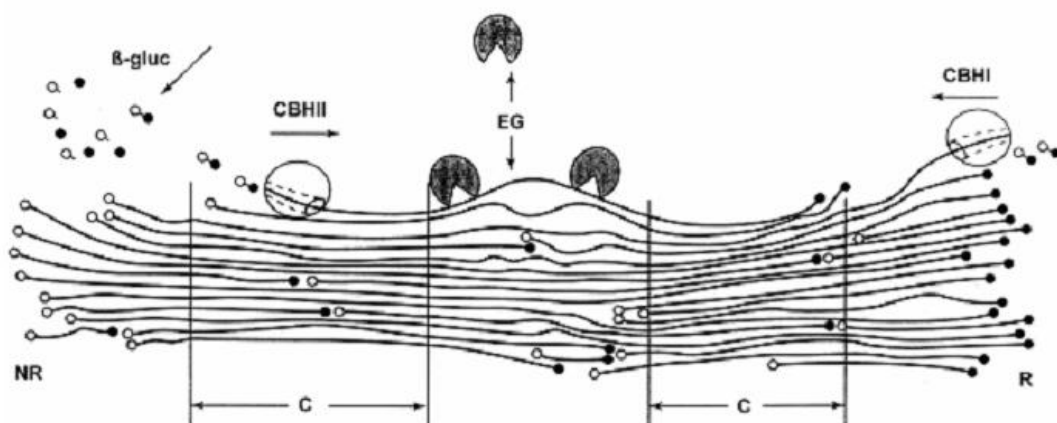


Figura 2.3 – Esquema da ação enzimática sobre a estrutura da celulose. *NR* denota os terminais não redutores; *R*, os terminais redutores; *C*, a região cristalina; β -*gluc*, a enzima β -glicosidase; *CBHI* e *CBHII*, as exoglucanases; *EG*, a endoglucanase. (Adaptado de Teeri (1997))

Uma metodologia de hidrólise enzimática para produção de hidrolisado a partir de bagaço de cana-de-açúcar consiste em utilizar bagaço pré-tratado por peróxido de hidrogênio alcalino e realizar hidrólise em condições definidas como ótimas em Rabelo (2010). Este autor iniciou a hidrólise com concentração de substrato de 3,0 % (w/w) em “erlenmeyers” encubados em “shaker”, com agitação de 100 rpm a 50 °C. O meio reacional consistia em uma solução tampão de citrato de sódio 0,05 mol/L, com pH ajustado para 4,8. A reação foi realizada utilizando as enzimas celulase de *T. reesei* (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) na concentração correspondente a 3,5 FPU/g de sólidos insolúveis em água, e β -glucosidase de *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) na concentração correspondente a 25 UI/g sólidos insolúveis em água (RABELO *et al.*, 2011). Nessas condições, Rabelo (2010), para o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio, aplicando a carga enzimática descrita, alcançou conversão de 100 % da celulose presente no material pré-tratado durante a hidrólise. Ainda, o hidrolisado obtido apresentou rendimento em etanol em relação à glicose próximo ao estequiométrico após etapa de fermentação. Esta metodologia de hidrólise associada ao pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino foi aplicada nesta tese para a produção de caldo hidrolisado.

A carga de sólidos de 3 % foi confirmada como a ideal por Garcia (2009) e Garzón Fuentes (2009), os quais observaram que nesta faixa a hidrólise não sofria prejuízo devido ao acúmulo de celobiose no meio reacional e nem limitações de transferência de massa, o que reduziria o rendimento em glicose. Esta análise, no entanto, não considerou aspectos econômicos e nem otimização do processo global (pré-tratamento + hidrólise + fermentação + destilação), que pode levar à conclusões bastante diferentes.

2.5 Formação de compostos inibidores

Um dos grandes problemas da etapa de pré-tratamento é a formação de inibidores que interferem nas etapas de sacarificação e fermentação. Estes inibidores geralmente são ácidos, compostos fenólicos ou produtos de degradação dos carboidratos presentes na matéria-prima ou lignina (MIKULÁŠOVÁ *et al.*, 1990). Uma das formas de reduzir o impacto desses na etapa de fermentação é minimizá-los, ou aplicar um método posterior de detoxificação do caldo hidrolisado previamente à fermentação.

2.5.1 Impacto de inibidores na etapa de fermentação

Olsson e Hahn-Hagerdal (1996) citam que existem hidrolisados contendo mais de 60 componentes, porém os que apresentam maiores impactos inibidores no crescimento microbiano são ácido acético e produtos resultantes da degradação da lignina. Taherzadeh e Karimi (2007) comentam que a inibição da etapa de fermentação ocorre devido à combinação de diversas substâncias presentes no hidrolisado, mesmo em baixas concentrações. Assim, a fermentabilidade de um meio sintético preparado com os principais componentes inibidores muitas vezes difere bastante da cinética obtida para um caldo hidrolisado real. Devido a essa observação, neste trabalho utilizou-se caldo hidrolisado real. A Tabela 2.2 mostra os principais inibidores, suas origens, faixa de concentração testada e porcentagem de inibição no crescimento microbiano ou fermentação. Os furaldeídos constituem um grupo importante de inibidores presentes no hidrolisado. São representados principalmente pelo 2-furaldeído (furfural) e 5-hidroximetil-2-furaldeído (HMF), formados a partir da desidratação ácida de açúcares, representados pelas pentoses (xilose) e hexoses (glicose), respectivamente (ALMEIDA *et al.*, 2009).

Tabela 2.2 – Principais grupos de inibidores e seus efeitos na etapa de fermentação por *S. cerevisiae* e *P. stipitis* (Adaptado de Olsson e Hahn-Hagerdal (1996))

Origem do grupo	Inibidor	Concentração (g/L)	Microrganismo	% de inibição na fermentação
Compostos liberados no pré-tratamento e hidrólise	Ácido acético	1,4	<i>S. cerevisiae</i>	50 %, pH 4,5
	Ácido acético	4,3	<i>S. cerevisiae</i>	50 %, pH 5,5
	Ácido acético	8,0	<i>Pichia stipitis</i>	98 %, pH 5,1
	Ácido acético	8,0	<i>Pichia stipitis</i>	25 %, pH 6,5
Produtos de degradação de açúcares	Furfural	1,0	<i>Pichia stipitis</i>	71 %
	5-hidroximetilfurfural	3,0	<i>Pichia stipitis</i>	90 %
	Acido fórmico	2,7	<i>S. cerevisiae</i>	80 %
				crescimento
Outros compostos presentes no meio	Acetaldeído	5,0	<i>S. cerevisiae</i>	80 %
				crescimento
	Etanol	120	<i>S. cerevisiae</i>	100 %
				crescimento
Produtos de degradação da lignina	Acido láctico	38	<i>S. cerevisiae</i>	80 %
				crescimento
	Cinamaldeído	1,0	<i>S. cerevisiae</i>	100 %
	p-hidroxibenzaldeido	1,0	<i>S. cerevisiae</i>	48 %
	Seringaldeído	0,22	<i>Pichia stipitis</i>	72 %
				fermentação

A Tabela 2.2 mostra as diferentes origens de componentes inibitórios. Pode-se observar que geralmente, os produtos de degradação da lignina apresentam maior impacto no crescimento ou fermentação por *S. cerevisiae* ou *P. stipitis*, mesmo a baixas concentrações (0,22 ou 1,0 g/L). A maioria dos métodos de pré-tratamento na literatura realizam a lavagem da

matéria-prima após o processo de deslignificação (RABELO, 2010), o que provavelmente remove esses componentes, evitando problemas mais graves na fermentabilidade.

2.5.2 Furfural e Hidroximetilfurfural

Os compostos furfural e hidroximetilfurfural são mostrados na Tabela 2.2 como bastante tóxicos para o crescimento da *P. stipitis*, sendo que o primeiro reduz a fermentabilidade mesmo a concentrações de 1,0 g/L. É importante ressaltar que o efeito desses componentes variam para cada linhagem de microrganismo. A *S. cerevisiae*, por exemplo, apesar de sofrer efeito inibidor pelo furfural, tem a capacidade de metabolizá-lo, transformando-o em álcoois menos tóxicos, como o furfural-álcool, e o efeito indesejável desaparece com o tempo (BOYER *et al.*, 1992).

Taherzadeh *et al.* (2000) citam os impactos do furfural na fermentação por *S. cerevisiae*, tais como queda do crescimento específico e redução da viabilidade. Esses autores monitoraram a taxa de produção de dióxido de carbono por *S. cerevisiae* após adição de furfural no meio. Inicialmente essa taxa caía bruscamente em 73 %, seguida por uma recuperação lenta, indicando uma retomada da atividade microbiana, porém após adição deste inibidor não se observou grande crescimento microbiano, mostrando a alta toxicidade, mesmo com a conversão de 85 % do furfural em furfural-álcool, o qual foi convertido parcialmente a ácido furóico. Experimentalmente ainda foi investigado e calculado o valor da velocidade de crescimento microbiana. Antes da adição de furfural a 4 g/L, obteve-se um μ de 0,4 h⁻¹, porém, após, o valor decaiu para 0,03, ficando neste valor até que o furfural fosse totalmente convertido a furfural-álcool, que também apresenta um efeito tóxico, chegando finalmente a μ de 0,13 h⁻¹. Assim, após a exposição ao furfural e mesmo a conversão deste, não foi totalmente recuperada a velocidade específica de crescimento microbiano.

Outros efeitos do furfural em microrganismos foram observados por diversos autores (BRANDBERG *et al.*, 2004; HEER; SAUER, 2008), tais como perda de viabilidade e aumento da fase *lag*. Este último pode ser amenizado com a utilização de inóculos em grandes concentrações.

2.5.3 Ácido acético

Dentre os ácidos comumente encontrados em hidrolisados de material lignocelulósico estão o fórmico, levulínico e acético. A formação deste último deve-se à de-acetilação da fração hemicelulósica (ALMEIDA *et al.*, 2007), e apresenta maior impacto na atividade microbiana. Os outros ácidos são derivados de quebras da molécula de HMF (DUNLOP, 1948).

Geralmente o efeito inibitório do ácido acético nas leveduras aparece como um menor crescimento microbiano e rendimento em etanol (LARSSON *et al.*, 1999). O ácido acético não dissociado presente no meio de cultivo atravessa a membrana celular, e ao entrar no citoplasma com pH mais alto, ocorre a dissociação do mesmo, reduzindo o pH do meio. Assim, ocorre gasto de ATP para bombeamento dos prótons para fora da célula, e menos ATP fica disponível para o crescimento celular (VERDUYN *et al.*, 1992), ou seja, ocorre um aumento da energia gasta para manutenção celular (MAIORELLA *et al.*, 1983).

Vale lembrar que a forma dissociada do ácido acético não apresenta grande impacto nos microrganismos, porém o mesmo quando não dissociado (o que ocorre quando o pH do meio fermentativo é baixo) apresenta grande efeito inibidor, pois tem a capacidade de penetrar na membrana celular de forma passiva, devido a sua alta solubilidade, e ao encontrar pH mais alto, ocorre a dissociação no interior da célula. A forma dissociada em anaerobiose torna-se então impermeável à membrana (NARENDRANATH *et al.*, 2001). Este mecanismo de transporte pela membrana e dissociação é mostrado na Figura 2.4.

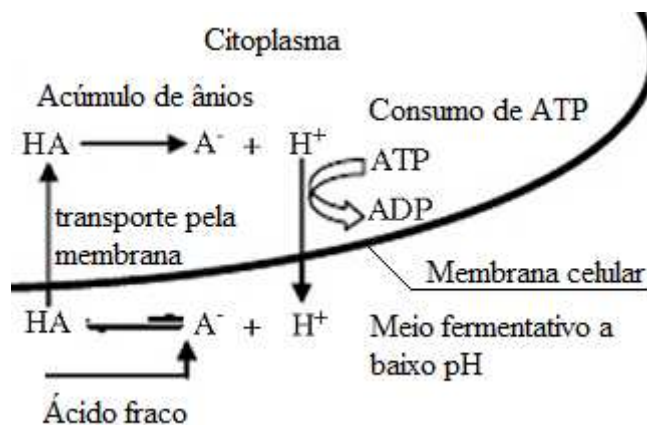


Figura 2.4 – Mecanismo de transporte do ácido acético pela membrana celular (Adaptado de Almeida *et al.* (2007))

A inibição por ácido acético é potencializada por baixo pH do meio de fermentação. Assim, a forma predominante do ácido no meio é não dissociada, e, portanto, permeável à célula. Este efeito fica bem claro nos resultados apresentados na Tabela 2.2, onde a pH de 5,5, a concentração de ácido considerada inibitória de 50 % na fermentação por *S. cerevisiae* foi de 4,3. Quando se reduziu o pH para 4,5, a concentrações de 1,4 o ácido já apresentou o mesmo efeito inibitório.

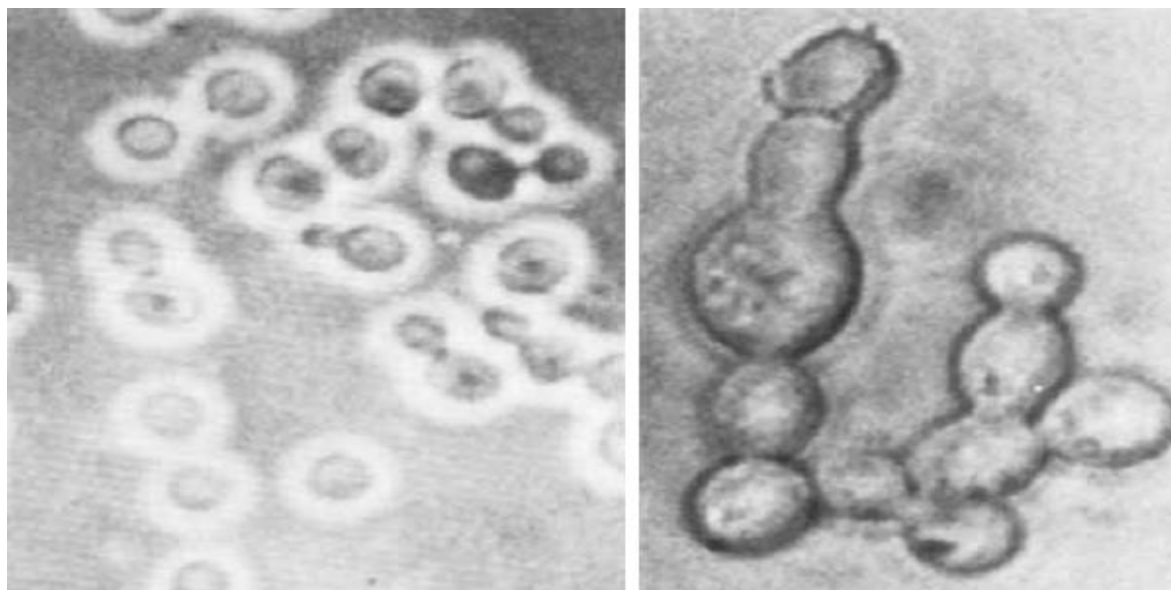
Almeida *et al.* (2007) citam que concentrações baixas de ácidos no meio fermentativo estimulam a produção de etanol, pois em condições anaeróbicas a formação de ATP é alcançada com a formação deste produto. Porém, em concentrações altas de ácidos, o gasto de ATP não é suficiente para evitar a queda excessiva do pH dentro da célula, ocorrendo inibição.

Narendranath *et al.* (2001) analisaram o comportamento da levedura *S. cerevisiae* quando exposta a meio contendo ácido acético e observaram redução na velocidade específica de crescimento microbiano, de produção de etanol e de consumo de substrato, de forma exponencial, quando se aumentava a concentração do ácido no meio. Observou-se também um aumento na fase *lag*, porém a glicose presente no meio era totalmente consumida no final da fermentação. Estes autores ainda concluíram que o efeito inibidor do ácido acético é potencializado em meios contendo ácido lático (sinergismo), ou seja, a contaminação por bactérias lácticas no setor

industrial leva a baixos rendimentos em biomassa, mesmo a concentrações muito pequenas de ácido acético no reator.

Outros efeitos da alta concentração de ácido acético em *S. cerevisiae*, observados por Ludovico *et al.* (2001), são a perda de viabilidade e morte celular programada (apoptose). Com exposição de uma linhagem de *S. cerevisiae* em solução contendo ácido acético na faixa de 20 a 200 mM, com pH 3,0, observou-se morte celular.

Maiorella *et al.* (1983) observaram mudanças morfológicas em *S. cerevisiae* quando cultivada em meio contendo ácido acético na concentração de 0,5 a 9 g/L. As células neste caso tornaram-se mais alongadas e disformes devido ao ataque do ácido quando em baixas concentrações, apresentando a forma mostrada na Figura 2.5. Foi notado também que o rendimento em etanol em relação ao celular aumentava, pois a produção de etanol é necessária para produção adicional de ATP requerido devido ao incremento na energia de manutenção.



(a)

(b)

Figura 2.5 – Microscopia de levedura *S. cerevisiae* cultivadas em meio sem exposição (a), e com presença de ácido acético (b) (MAIORELLA *et al.*, 1983)

2.5.4 Inibição por etanol na *Saccharomyces cerevisiae*

O etanol é um dos principais componentes tóxicos para fermentação alcoólica. Este age como um inibidor não-competitivo de rota metabólica. Como resultado deste tipo de inibição, tem-se uma queda proporcional entre o crescimento celular e produção de etanol, conforme a concentração do inibidor aumenta (MAIORELLA *et al.*, 1983). Este autor comenta que o etanol torna-se tóxico à *S. cerevisiae* na concentração de 25 g/L, e inibe totalmente o crescimento a 95 g/L, porém na literatura, faixas distintas de inibição são encontradas. Vale a pena comentar que a diferença de toxicidade por etanol varia com a linhagem da levedura, temperatura, composição do meio fermentativo, aeração e outros (ATALA, 2004). Outros autores encontraram diferentes concentrações de etanol na qual cessa o crescimento microbiano. Para Andrade (2007), estes valores ficaram entre 75 e 129,91 g/L, decrescendo com o aumento da temperatura. Já Atala (2000), trabalhando com a mesma linhagem de *S. cerevisiae*, mudando a procedência do melaço e época de cultivo da cana-de-açúcar, encontrou os valores de P_{max} na faixa de 70 - 113,5 g/L, o que mostra a diferença entre a inibição por etanol que ocorre em meios com composições distintas.

Stanley *et al.* (2010) citam que dentre os principais efeitos da alta concentração de etanol em *S. cerevisiae* estão inibição de multiplicação celular e redução no tamanho das células, queda na velocidade específica de crescimento, aumento de morte celular, mudanças em estruturas celulares, afetando integridade da membrana e outras organelas, queda de viabilidade e outros. Isso resulta em menor produtividade em etanol.

Assim, entre as formas de superar as limitações devido à ação tóxica de produtos finais de fermentação alcoólica e aumentar a produtividade dos processos está a utilização de mecanismos de remoção desses produtos do sistema. Vários trabalhos recentes têm direcionado atenção neste sentido.

2.6 Efeito da temperatura na fermentação alcoólica

Diversos trabalhos na literatura citam que a temperatura possui grande influência na cinética microbiana e fermentabilidade. Até certo ponto, o crescimento microbiano aumenta com

aumento de temperatura, e as velocidades das reações enzimáticas praticamente dobram com aumento de 10 °C (REDDY; REDDY, 2011).

O efeito tóxico do etanol aumenta com o crescimento da temperatura, devido ao aumento da fluidez da membrana celular (REDDY; REDDY, 2011), e especificamente para *Saccharomyces cerevisiae*, na faixa de 12 a 28 °C, o efeito tóxico permanece constante, sendo que acima de 28 °C, o mesmo aumenta (JIMENEZ; VAN UDEN, 1985).

Segundo Torija *et al.* (2003), acima de 20 °C, conforme aumenta a temperatura, ocorre perda bastante rápida da viabilidade celular em processos de produção de vinho.

Reddy e Reddy (2011) realizaram experimentos de fermentação para produção de vinho a partir de suco de manga, e chegaram a várias conclusões interessantes sobre a influência da temperatura no crescimento microbiano, tempo de fermentação e taxas cinéticas. A investigação foi realizada em uma faixa de 15 a 35 °C. Comparando as temperaturas de 30 e 35 °C, a primeira gastava menos tempo para fermentação (6 dias), e todo o açúcar era metabolizado, enquanto a 35 °C, esse tempo de fermentação subia para 10 dias e adicionalmente sobravam açúcares no reator. Na temperatura de 30 °C também era alcançada a máxima concentração microbiana e máxima taxa de produção de etanol (41,3 g/L.dia), sendo que essas caíam conforme se afastava do ponto ótimo. Essa redução de taxa de fermentação, aumentando a temperatura de 30 para 35 °C, provavelmente ocorreu devido a maior queda de viabilidade que ocorre em temperaturas mais altas, nos momentos finais da fermentação. Para temperatura de 15 °C, levou-se de 6 a 8 dias para se alcançar a concentração máxima microbiana, sendo que para 35 °C, esse tempo caiu para 2 dias, porém para altas temperaturas, a viabilidade cai mais rapidamente, levando a redução na taxa de produção de etanol.

De forma similar, Sanchez *et al.* (2004) explicam a relação entre velocidade máxima de crescimento microbiano e temperatura como uma superposição entre energia de ativação de crescimento e morte, representando uma relação entre os parâmetros cinéticos com temperatura em uma função do tipo Arrhenius. O mesmo encontrou que para 32 °C, alcançava-se a máxima velocidade específica de crescimento microbiano, e a mesma começava a cair muito rapidamente, para temperaturas maiores, o que não ocorria de forma tão drástica para temperaturas menores.

Para outros autores, tais como Phisalaphong *et al.* (2006), a máxima produção de etanol e biomassa ocorriam a 33 °C, conforme se aumentava a temperatura, mas quando se passava de 33 para 35 °C, ocorria queda de ambas. Esses autores comentam que a maior inibição do crescimento microbiano ocorre em temperaturas mais altas devido à influência desta no transporte de substâncias tóxicas pela membrana celular, o que levaria a um maior acúmulo de etanol no interior da célula em altas temperaturas, e ainda esta resultaria na desnaturação de enzimas celulares.

Abdel-Banat *et al.* (2010) afirmam que a temperatura ótima para produção de etanol combustível está na faixa de 30 a 35 °C, devido à equivalência da faixa máxima de crescimento microbiano da *Saccharomyces cerevisiae*.

2.7 Reciclo de células

A técnica de reciclo de células por bateladas alimentadas sucessivas tem sido bastante aplicada no Brasil para produção de etanol por aproximadamente 70 a 80 % das destilarias (BRETHAUER; WYMAN, 2010). Dentre as vantagens do reciclo de células estão a redução de tempo requerido e custos resultantes do uso de nutrientes empregados na etapa de preparação do inóculo (SANDA *et al.*, 2011). Brethauer e Wyman (2010) ainda comentam que as bateladas sucessivas podem ser realizadas por aproximadamente 200 vezes, levando à redução do consumo de carbono para crescimento celular, e ao mesmo tempo, aumentando a produtividade em etanol.

Outros autores tais como Basso *et al.* (2008) comentam que a prática de reciclo de células no setor industrial brasileiro leva à menores tempos de fermentação, na ordem de 6 a 11 horas, devido à alta concentração de células dentro dos fermentadores (em torno de 10-17 % w/v, em base úmida). Observou-se que em altas densidades celulares, altas concentrações de etanol e reciclagem de células levam à redução no crescimento microbiano, levando a um aumento do rendimento de açúcar em etanol, em torno de 90 – 92 % do valor teórico.

É importante ressaltar também que a prática de reciclo leva a uma seleção das leveduras selvagens mais resistentes às condições estressantes do meio industrial, tais como alta concentração de etanol, altas temperaturas, estresse osmótico devido à presença de sais e

açúcares, contaminações microbianas, acidez e outros (MIRANDA JÚNIOR *et al.*, 2009). Slininger *et al.* (2011) citam que o reciclo de células tem como contribuição a possibilidade de adaptação e condicionamento do microrganismo ao processo. Assim, o reciclo de células pode servir como uma estratégia imposta ao processo com fim de obter altos desempenhos (porém a maioria das linhagens mais resistentes não possuem características desejáveis para processos fermentativos, tais como consumo total de substrato, não formação de espuma e flocos; e alta produção de etanol).

2.7.1 Efeitos do reciclo de células na fermentabilidade e cinética

Sanda *et al.* (2011) estudaram o efeito de bateladas sucessivas com reciclo de células, utilizando hidrolisado lignocelulósico para diversas linhagens de *S. cerevisiae* modificadas geneticamente para consumo de xilose. Algumas linhagens recombinantes estudadas, após 5 fermentações em batelada, em um meio contendo xilose, glicose e frutose, apresentavam total consumo de xilose. Outras linhagens apresentavam redução no consumo de xilose, o que resultava em perda de produção de etanol, conforme se realizava cada reciclo, após um total de 120 horas de fermentação. A estabilidade de algumas linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes foi associada à capacidade das mesmas de expressar genes que as tornava mais resistentes a ácidos fracos.

2.7.2 Produtividade e viabilidade em fermentações com reciclo de células

Pereira *et al.* (2012) estudaram o comportamento cinético de uma linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 submetida a bateladas sucessivas (15) para produção de etanol em ambientes industriais severos, com alta concentração de açúcares no meio, na ordem de 350 g/L e etanol. Para concentrações iniciais de inóculo de 85 e 167 mg/mL, realizando reciclos, a produtividade em CO₂ decrescia no terceiro reciclo em relação à primeira batelada, em 21 e 66 %, respectivamente. Esta queda de produtividade era acompanhada da redução de viabilidade

conforme eram feitas as bateladas sequenciais com reciclo total de células. Os autores ainda associaram a perda de viabilidade em cada reciclo, com a ausência de crescimento microbiano conforme as células eram recicladas (o que aumentaria a proporção de células inviáveis), e concentração de etanol na ordem de 15, 16 % (v/v). Assim, com reciclo total de células, a tendência observada foi queda constante de produtividade e viabilidade devido às condições drásticas do meio.

Vale a pena lembrar que nos processos industriais brasileiros, os reciclos de células são mantidos por aproximadamente 8 meses, durante toda a safra (BASSO *et al.*, 2008). Uma estratégia usada por Pereira *et al.* (2012) para manutenção de alta viabilidade e produtividade foi o monitoramento de viabilidade e quando essa alcançasse valores baixos (50 %), realizava-se novo inóculo com concentração de 11 a 89 mg/mL, resultando em recuperação da produtividade. Assim, foram realizadas 15 bateladas sucessivas com produtividade em etanol na faixa de 3,45 a 4,59 g/L.h.

Choi *et al.* (2009) investigaram o comportamento da produtividade em etanol em 10 bateladas sucessivas, fermentando amido obtido de mandioca, aplicando uma levedura *S. cerevisiae* híbrida CHFY0321. A concentração inicial de açúcares no início de cada batelada era em torno de 160 a 180 g/L. Realizando reciclos de células equivalentes a 20 % do volume reacional, após diversas bateladas sucessivas, ocorria um acúmulo de células de até 41,2 g/L no reator, e consequente redução de produtividade volumétrica em etanol (2,81 g/L.h se comparado com 3,32 g/L.h para reciclos de 5 % em volume). Isso mostra que a produtividade alcançada varia também com a forma com que os reciclos são realizados.

Zhao *et al.* (2010) investigaram a produção de ácido láctico por *Sporolactobacillus* *sp.*, realizando bateladas sucessivas, utilizando 10 % (v/v) da fermentação anterior como inóculo da seguinte. Conforme se realizavam reciclos, a concentração celular nas bateladas era aumentada. A taxa de consumo de glicose era mantida praticamente constante até a terceira batelada, sendo que na quarta, a mesma foi reduzida, levando a uma ligeira redução na produção do ácido. Para a produção utilizando 2 reatores ligados em série, o rendimento em produto caía de 0,97 na terceira batelada para 0,86 na sexta, e posteriormente o mesmo voltava a se recuperar, alcançando valores em torno de 0,9, até a batelada 11. Uma observação importante realizada por

esses autores foi que na primeira batelada, a produção de ácido láctico era bastante relacionada à manutenção. Conforme eram feitos os ciclos, para a linhagem utilizada, a formação de ácido tornava-se mais relacionada ao crescimento microbiano, para até a quarta batelada. Da quarta até a batelada 11, o parâmetro $Y_{p/x}$ (parâmetro que indica a formação de produto associada ao crescimento microbiano), reduzia ligeiramente.

A manutenção da produtividade em processos com ciclo celular está muito ligada à forma com que os mesmos são conduzidos e a cada linhagem utilizada em particular.

2.8 Cinética do Processo de Fermentação Alcoólica

Segundo Hiss (2001), para se determinar a cinética de um processo fermentativo em batelada é importante analisar o comportamento dos componentes em relação ao tempo de fermentação. Esses componentes podem ser substrato, concentração de biomassa ou microrganismo e produtos de metabolismo. Com base em dados experimentais de concentração em função de tempo, pode-se ajustar curvas a partir das quais são obtidos os parâmetros de transformação. Estes parâmetros por sua vez podem ser divididos em velocidades instantâneas de transformação (r_x , r_s e r_p), velocidades específicas de transformação (μ_x , μ_s e μ_p) e fatores de conversão ($Y_{x/s}$, $Y_{x/p}$ e $Y_{p/s}$).

As velocidades instantâneas de formação são dadas pelas Equações (2.1) a (2.3), para cada valor de tempo t :

$$r_x = \frac{dX}{dt} \text{ (velocidade instantânea de crescimento microbiano)} \quad (2.1)$$

$$-r_s = \frac{dS}{dt} \text{ (velocidade instantânea de consumo de substrato)} \quad (2.2)$$

$$r_p = \frac{dP}{dt} \text{ (velocidade instantânea de formação de produto)} \quad (2.3)$$

Estas velocidades são calculadas a partir da inclinação (cálculo da tangente) das curvas de X , S e P em função do tempo.

Segundo Hiss (2001), em processos fermentativos em batelada, a concentração de microrganismos aumenta com o tempo de cultivo, levando assim a um incremento na quantidade de enzimas utilizadas na transformação de substrato em produto. Por este motivo, é lógica a representação das velocidades instantâneas de transformação de forma específica, com relação à concentração microbiana existente no tempo t . Assim, surgem essas novas definições:

$$\mu_x = \frac{1}{X} \left(\frac{dX}{dt} \right) \quad (2.4)$$

$$\mu_s = \frac{1}{X} \left(-\frac{dS}{dt} \right) \quad (2.5)$$

$$\mu_p = \frac{1}{X} \left(\frac{dP}{dt} \right) \quad (2.6)$$

As concentrações de X , S e P podem ser relacionadas através de fatores de conversão, como apresentados nas Equações (2.7) a (2.9).

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (2.7)$$

$$Y_{X/P} = \frac{X - X_0}{P - P_0} \quad (2.8)$$

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (2.9)$$

Geralmente esses fatores não são constantes em todo o tempo de fermentação e, quando isso acontece, devem-se calcular seus valores instantâneos, substituindo as Equações de (2.7) a (2.9) por (2.10) a (2.12):

$$Y_{X/S} = \frac{r_X}{r_S} = \frac{\mu_X}{\mu_S} \quad (2.10)$$

$$Y_{P/S} = \frac{r_P}{r_S} = \frac{\mu_P}{\mu_S} \quad (2.11)$$

$$Y_{X/P} = \frac{r_X}{r_P} = \frac{\mu_X}{\mu_P} \quad (2.12)$$

Esses valores de conversão geralmente não são constantes para um mesmo microrganismo, já que o crescimento microbiano em relação a um substrato depende também de outros componentes presentes no meio fermentativo, transferência de oxigênio no meio, dentre outros.

2.8.1 Modelagem matemática da cinética de processos biotecnológicos

Entender a cinética de crescimento microbiano, bem como os fatores físicos e químicos que a influenciam é de extrema importância para o projeto e operação adequada de sistemas fermentativos. Para isso, diversos modelos matemáticos com diferentes graus de complexidade foram desenvolvidos ao longo da história. Modelos de crescimento podem levar em conta uma mistura de células heterogêneas, com diferentes idades, com mudanças constantes de características físicas e químicas, porém estes são difíceis de trabalhar e nem sempre os parâmetros são mensuráveis, o que muitas vezes leva a desusos dos mesmos (DUTTA, 2008).

No desenvolvimento de modelos, várias abordagens podem ser dadas com relação à população microbiana e composição celular. A população microbiana pode ser abordada de forma segregada ou não segregada (distribuída), e para composição celular, os modelos podem ter abordagem estruturada ou não estruturada.

Numa situação de cultivo microbiano denominado de crescimento balanceado, todas as atividades de síntese celular são coordenadas de forma que a composição celular média não é afetada pela proliferação da população. Neste caso, modelos que ignoram a natureza multicomponente das células são adequados (não estruturados). Modelos segregados e

estruturados oferecem melhor descrição do comportamento cinético, porém com um grande esforço computacional e maior complexidade de lidar com dados experimentais.

A abordagem mais simples consiste na não estruturada e não segregada, a qual é baseada nas seguintes simplificações (BAILEY; OLLIS, 1986; DUTTA, 2008):

- as células são consideradas como componentes únicos, podendo ser representadas por uma única variável, como número de células, massa celular, concentração protéica e outros (não estruturada);
- a massa celular é igualmente distribuída ao longo da cultura, sendo que a natureza heterogênea da cultura pode ser desconsiderada (não segregada).

Nesta tese, os modelos apresentados possuem abordagem não segregada e não estruturada.

De acordo com Phisalaphong *et al.* (2006), a modelagem matemática de processos estabelece uma relação entre parâmetros cinéticos e ambientais, e esta geralmente é representada por um modelo tipo Monod (1950) modificado. Este modelo deve representar a inibição por substrato e produto, já que em linhagens utilizadas em processos industriais, estas apresentam grande efeito no crescimento celular.

2.8.1.1 Modelos para crescimento específico microbiano

Vários fatores afetam o crescimento microbiano, entre eles o pH do meio, temperatura, entre outros. Apesar de importantes, esses fatores podem ser facilmente controlados nos fermentadores. Geralmente os meios de cultivos são preparados de forma que um único componente é o limitante da taxa de reação, de forma que os demais estejam em excesso. Assim, o componente limitante passa a influenciar de forma bastante significativa a taxa de crescimento celular e é importante que o mesmo seja incluído em modelos (DUTTA, 2008). Uma das

expressões mais conhecidas que descreve a influência do substrato na taxa específica de crescimento microbiano é o modelo de Monod, mostrado na Equação (2.13).

$$\mu_x = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \quad (2.13)$$

Sendo que (μ) μ_x é a velocidade específica de crescimento; $\mu_{\max}$ é a velocidade máxima específica de crescimento microbiano; S a concentração de substrato limitante no crescimento e K_s é um parâmetro que denota a concentração de substrato S na qual a velocidade específica de crescimento é a metade da máxima ($\mu_{\max}$). O comportamento da velocidade específica de crescimento em relação à concentração de substrato limitante de acordo com a Equação de Monod (2.13) é mostrado na Figura 2.6.

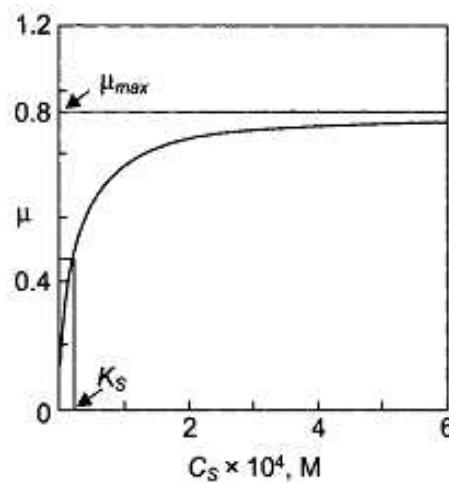


Figura 2.6 – Comportamento da velocidade específica de crescimento em função de concentração de substrato limitante para a Equação de Monod (DUTTA, 2008)

Na Figura 2.6 nota-se que conforme se aumenta a concentração de substrato, o valor de μ atinge um máximo. Na prática, nem sempre o comportamento é similar. Em uma faixa alta de concentração de substrato, a velocidade específica de crescimento pode ser reduzida, e por isso, algumas adaptações da expressão de Monod foram realizadas.

Vale a pena comentar que o modelo de Monod (1950) não leva em conta o efeito da inibição do crescimento por substrato, mas apenas o mesmo como limitante.

Outros modelos que levam em conta a inibição do crescimento microbiano em função do substrato são apresentados na Tabela 2.3.

De acordo com Hiss (2001), em processos em batelada devido às altas concentrações de açúcares usadas nos processos industriais e ao acúmulo de produtos, os termos de inibição devem ser considerados no modelo. É importante ressaltar que nesses tipos de processos, a alta concentração de substrato é requerida para atingir viabilidade econômica.

O modelo de Hiss (2001) considera um parâmetro para inibição por substrato, porém para fermentação alcoólica a utilização do termo que leva em conta a inibição por produto é importante ser considerado, e será apresentado a seguir. Na expressão deste mesmo autor, para valores de K_{IS} muito maiores que concentração de substrato, S , a inibição por substrato torna-se nula.

Tabela 2.3 – Modelos cinéticos de crescimento microbiano em função de substrato

Modelo cinético	Equação	Referência
$\mu_x = \mu_{\max} \left(1 - e^{-\frac{S}{K_s}} \right)$	(2.14)	Teissier (Citado por Hiss (2001))
$\mu_x = \mu_{\max} \frac{S}{K_s \cdot X + S}$	(2.15)	Contois e Fugimoto (Citado por Moser (1985))
$\mu_x = \mu_{\max} \frac{S}{(K_s + K_D) + S}$	(2.16)	Powell (Citado por Moser (1985))
$\mu_x = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \cdot \frac{K_{IS}}{K_{IS} + S}$	(2.17)	Hiss (2001)
$\mu_x = \frac{\mu_a \cdot S}{K_s + S + \frac{S}{K_i}}$	(2.18)	Andrews (1968)
$\mu_x = \mu_{\max} \frac{S^n}{K_s^n + S^n}$	(2.19)	Moser (1958)
$\mu_x = \frac{\mu_{\max_1} S_1}{K_{S1} + S_1} + \frac{\mu_{\max_2} S_2}{K_{S2} + S_2 + \frac{S_1^2}{K_i}}$	(2.20)	Dunn <i>et al.</i> (1992)
$\mu_x = \frac{\mu_{\max} S_1 S_2}{(K_{S1} + S_1)(K_{S2} + S_2)}$	(2.21)	Megee <i>et al.</i> (1972)
$\mu_x = \left(\mu_0 + \frac{\mu_1 S_1}{K_{S1} + S_1} + \frac{\mu_2 S_2}{K_{S2} + S_2} \right) \left(\frac{S_3}{K_{S3} + S_3} \right)$	(2.22)	Tsao e Hanson (1975)

Os modelos de Moser (1958) e Contois e Fugimoto (Citado por Hiss (2001)) consideram a velocidade específica de crescimento em função de um substrato limitante, S , porém existem outras equações que consideram crescimento devido à múltiplos substratos limitantes, como as de Dunn *et al.* (1992), Megee *et al.* (1972) e Tsao e Hanson (1975). O modelo de Andrews (1968) considera o substrato como componente limitante de crescimento e inibidor ao mesmo tempo.

2.8.1.2 Modelos não estruturados para inibição pelo produto no crescimento microbiano

Segundo Blanck e Clark (1997), o produto leva à inibição do crescimento microbiano devido a vários mecanismos, o que acaba reduzindo a taxa de formação dos próprios produtos. Dentre os principais inibidores não competitivos estão os álcoois (etanol, butanol, propanol e isopropanol) que atuam na região hidrofóbica da membrana plasmática das células. Os álcoois reduzem o potencial da membrana, bem como a saída de prótons da célula, o que diminui o potencial de prótons. Além disso, a inibição pode ocorrer sobre as enzimas presentes nas células, reduzindo então o metabolismo microbiano, o transporte de açúcares e aminoácidos.

Alguns modelos de inibição pelo produto, citados por Blanch e Clark (1997), Moser (1958) e Dagley, citado por Han e Levenspiel (1988), são apresentados na Tabela 2.4:

Na Tabela 2.4, as equações de Blanch e Clark (1997) e Levenspiel (1980) que utilizam parâmetro P_{max} consideram baixa inibição do crescimento microbiano a baixas concentrações de inibidor, porém quando alcançado o valor de P_{max} , a velocidade específica de crescimento torna-se nula.

O modelo de Dagley, citado por Han e Levenspiel (1988), considera que com o aumento na concentração de etanol ocorre redução da velocidade específica de crescimento, sendo que não ocorre a interrupção total do mesmo em concentração definida.

Tabela 2.4 – Modelos matemáticos de crescimento microbiano considerando inibição por produto

Modelo cinético	Equação	Referência
$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S} \cdot \frac{K_P}{K_P + P}$	(2.23)	Blanch e Clark (1997)
$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S} \cdot e^{-K_P P}$	(2.24)	Blanch e Clark (1997)
$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S} \cdot \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)$	(2.25)	Blanch e Clark (1997)
$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S} \cdot \left(1 - \left(\frac{P}{P_{\max}}\right)^\gamma\right)$	(2.26)	Blanch e Clark (1997)
$\mu_x = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \cdot \frac{K_{IP}}{K_{IP} + P}$	(2.27)	Moser (1958)
$\mu = \mu_{\max} \cdot \left(\frac{S}{K_S + S}\right) (1 - K \cdot P)$	(2.28)	Dagley (citado por Han e Levenspiel (1988)
$\mu = \mu_{\max} \cdot \left(\frac{S}{K_S + S}\right) \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)^n$	(2.29)	Levenspiel (1980)

2.8.1.3 Modelos matemáticos para formação de produto

Segundo Bailey e Ollis (1986), em alguns casos pode-se relacionar a formação de produto com crescimento microbiano ou consumo de substrato. Assim, foram propostas expressões para formação de produto em função de parâmetros de rendimentos, $Y_{p/x}$ ou $Y_{p/s}$:

$$r_p = Y_{p/x} r_x \quad (2.30)$$

$$r_p = Y_{p/s} r_s \quad (2.31)$$

Outra expressão proposta por Leudeking-Piret (1959) associa dois termos para representação da taxa de formação de produto, no qual o primeiro relaciona a taxa de formação de produto com a taxa de crescimento microbiano, e o segundo, com a concentração microbiana existente. De acordo com Bailey e Ollis (1986), para fermentações alcoólicas, a produção de etanol dá-se de forma relacionada ao crescimento, na fase exponencial. Assim, o primeiro termo possui maior contribuição na expressão de Leudeking-Piret (1959).

$$r_p = Y_{p/x} r_x + m_p X \quad (2.32)$$

2.8.1.4 Outros modelos matemáticos

Algumas equações combinadas para representar taxa de crescimento microbiano, de formação de produto e consumo de substrato, encontradas na literatura são mostradas na Tabela 2.5.

A equação proposta por Pirt (1966) considera que o consumo de substrato dá-se devido ao crescimento microbiano (μ_x) e gasto de energia para manutenção das células, representado pelo parâmetro m_x .

A expressão de Aiba e Shoda (1969) leva em conta o substrato como limitante no crescimento e produção de produto e o produto como inibidor. Já a expressão de Sevely (1980), citado por Dourado *et al.* (1987), descreve o crescimento específico do microrganismo em função

do substrato limitante e produto. O termo α representa a produção de produto associada ao crescimento celular, e β associada à massa celular presente. K_s e K_p são parâmetros cinéticos, e $Y_{p/s}$ é um parâmetro de rendimento de produto em relação ao substrato consumido.

Outros modelos como Lee *et al.* (1983) ainda consideram a inibição do crescimento devido à concentração celular. Esses são interessantes do ponto de vista industrial para ser usados em processos com reciclo de células.

Tabela 2.5 – Outros modelos matemáticos combinados para descrever cinética microbiana

Modelo cinético	Equação	Referência
$\mu_s = \frac{1}{Y_{x/s}} \cdot \mu_x + m_x$ (consumo de substrato)	(2.33)	Pirt (1966)
$\mu_x = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_s + S} \cdot \frac{K_p}{K_p + P}$ (crescimento microbiano)	(2.34)	Aiba e Shoda (1969)
$\mu_p = \frac{\mu'_{\max} \cdot S}{K_s + S} \cdot \frac{K_p}{K_p + P}$ (formação de produto)	(2.35)	
$\mu_x = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_s + S} \cdot e^{-K_p \cdot P}$	(2.36)	Aiba <i>et al.</i> (1968)
$\mu_p = \frac{\mu'_{\max} \cdot S}{K'_s + S} \cdot e^{-K'_p \cdot P}$	(2.37)	
$\mu_x = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_s + S} \cdot \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)$	(2.38)	Ghose e Tyagi (1979)

Tabela 2.5 – Outros modelos matemáticos combinados para descrever cinética microbiana
(continuação)

$$\mu_p = \frac{\mu'_{\max} \cdot S}{K'_S + S} \cdot \left(1 - \frac{P}{P'_{\max}}\right) \quad (2.39)$$

$$\mu_x = \mu_{\max} \cdot \left(\frac{S}{K_S + S}\right) \left(\frac{K_P}{K_P + P}\right) \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right) \quad (2.40)$$

Sevely (1980), citado
por Dourado *et al.* (1987)

$$\mu_S = -\frac{\mu_P}{Y_{p/s}} - \frac{\mu_x}{Y_x} \quad (2.41)$$

$$(2.42)$$

$$\mu_P = Y_{p/x} \cdot \mu_x + m_P$$

$$\mu_x = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_S + S}\right) \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)^n \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right)^m \quad (2.43)$$

Lee *et al.* (1983)

$$\mu_S = -\frac{\mu_x}{Y_{x/s}} \quad (2.44)$$

$$\mu_P = \frac{\mu_x}{Y_{x/p}} \quad (2.45)$$

Modelagem matemática de fermentação alcoólica

A Equação (2.46) para taxa de crescimento microbiano baseia-se na proposta por Levenspiel (1980), na qual foi adicionado o termo de inibição por produto, e foi utilizada por Alves (1996), Carvalho (1996), Andrietta (1994), Atala *et al.* (2001), Andrade (2007) e, de Andrade *et al.* (2007). Essa considera a concentração de substrato como inibidor exponencial e

componente limitante de crescimento, inibição hiperbólica por produto e concentração de biomassa.

$$r_x = \mu_{\max} \cdot \exp(-K_i S) \frac{S}{K_s + S} \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right)^m \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)^n X \quad (2.46)$$

O termo de inibição pela concentração celular foi proposto por Cysewski e Wilke (1978), e utilizada por Lee *et al.* (1983). A inibição não linear generalizada por produto usada nessa equação foi inicialmente proposta por Levenspiel (1980).

A utilização da Equação (2.46) é bastante adequada para modelagem deste tipo de processo que trabalham a altas concentrações celulares, por possuir um termo de inibição ao crescimento microbiano causado pela biomassa existente. Isto ocorre devido à dificuldade na transferência de oxigênio e substrato no meio fermentativo, que ocorre em alta densidade celular.

A mesma expressão ainda considera o substrato como limitante da fermentação e inibidor, o que ocorre a altas concentrações de melaço de cana-de-açúcar.

$$r_d = (K_{dT} \cdot \exp(K_{dp} \cdot P)) \cdot X \quad (2.47)$$

$$r_p = Y_{P/X} \cdot r_x + m_p \cdot X \quad (2.32)$$

A equação (2.47) representa a taxa de morte celular e a equação (2.32), de Leudeking-Piret (1959), apresenta bom ajuste para fermentações alcoólicas, sendo que leva em conta termos para a formação de etanol associado ou não ao crescimento.

$$r_s = \frac{r_x}{Y_x} + m_x \cdot X \quad (2.48)$$

A expressão (2.48) leva em conta o consumo de substrato para a o crescimento celular bem como a empregada nas atividades microbianas, como respiração, mobilidade, transporte de solutos pela membrana celular e outras, chamadas de energia de manutenção.

2.9 Determinação de parâmetros por métodos gráficos.

Alguns métodos gráficos podem ser aplicados a dados experimentais para determinação prévia e aproximada de parâmetros cinéticos. Para sistemas nos quais a velocidade específica de crescimento é uma função do substrato limitante, seguindo a cinética de Monod, tem-se:

$$\mu_x = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \quad (2.13)$$

Para a determinação dos parâmetros cinéticos $\mu_{\max}$ e K_s , pode-se linearizar a equação de Monod através da aplicação da Eq. de Lineweaver-Burk, obtendo então a equação (2.49):

$$\frac{1}{\mu_x} = \frac{1}{\mu_{\max}} + \frac{K_s}{\mu_{\max}} \cdot \frac{1}{S} \quad (2.49)$$

Pode-se plotar $1/\mu_x$ por $1/S$, determinando então os valores dos parâmetros através do conhecimento dos coeficientes angulares e lineares (BORZANI, 2001).

É importante ressaltar que o uso da Eq. 2.13 não considera termo de inibição por produto, sendo, portanto não adequada para determinação do parâmetro $\mu_{\max}$ para fermentação alcoólica em modo batelada, devido ao acúmulo de etanol no meio.

Através da expressão de Leudeking-Piret (1959), pode-se determinar por um ajuste linear, os valores dos parâmetros $Y_{p/x}$ e m_p , os quais correspondem aos coeficientes angulares e lineares, respectivamente, plotando μ_p (obtido pela Eq. 2.6) por μ_x (Eq. 2.4).

$$\mu_p = Y_{p/x} \cdot \mu_x + m_p \quad (2.32)$$

O parâmetro $Y_{p/x}$ corresponde ao rendimento de produto em relação à biomassa formada, e m_p , um parâmetro que relaciona a formação do produto às células existentes, ou a contribuição do produto não associada ao crescimento microbiano.

2.10 Ajuste dos parâmetros do modelo cinético

Para a estimação dos parâmetros cinéticos do modelo, será utilizada a rotina BCONF do software COMPAQ VISUAL FORTRAN versão 6.6, baseando-se no algoritmo Quasi-Newton de otimização que fornece um valor mínimo para a função $E(\theta)$, dada pela expressão (2.50):

$$E(\theta) = \sum_{n=1}^{np} \left[\frac{(X_n - Xe_n)^2}{Xe_{\max}^2} + \frac{(S_n - Se_n)^2}{Se_{\max}^2} + \frac{(P_n - Pe_n)^2}{Pe_{\max}^2} \right] = \sum_{n=1}^{np} \varepsilon_n(\theta) \pi \quad (2.50)$$

Os valores de Xe_n , Se_n e Pe_n são dados experimentais de concentração nos tempos de amostragem, representados por n , X_n , S_n e P_n , os valores de concentração calculados pelo modelo nos tempos de amostragem. A variável n_p representa o número de amostras colhidas em cada experimento, e os subscritos *max* correspondem à maior concentração para cada variável, X , S e P , medidas experimentalmente. $\varepsilon_n(\theta)$ corresponde ao erro de saída referente à amostra n .

O problema de otimização consiste em minimizar a Equação 2.50, sujeita à

$l_p \leq x_p \leq u_p$, sendo que $p = 1, 2, 3, 4, 5$, e x_p são os valores de cada parâmetro dependente da temperatura. As siglas l_p e u_p denotam as fronteiras inferiores e superiores de cada parâmetro. A partir de um ponto de partida, x^c , a rotina calcula a direção da procura do novo valor para a variável, denominada de x^n (VISUAL NUMERICS INC, 1997). A direção de procura, d , é então computada a partir da Equação (2.51).

$$d = B^{-1} g^c \quad (2.51)$$

Sendo que B é uma aproximação da matriz Hessiana, e g^c é o gradiente calculado no ponto x^c . O novo ponto x^n é calculado a partir da Equação (2.52).

$$x^n = x^c + \lambda \cdot d \quad (2.52)$$

Considera-se que $\lambda \in (0, 1]$

Sendo que

$$f(x^n) \leq f(x^c) + \alpha g^T d \quad (2.53)$$

$$\alpha \in (0; 0,5)$$

Os valores otimizados são encontrados quando

$$\|g(x_p)\| \leq \varepsilon \text{ para } l_p < x_p < u_p. \varepsilon \text{ é a tolerância, e}$$

$$g(x_p) < 0, x_p = u_p$$

$$g(x_p) > 0, x_p = l_p$$

Para se integrar as equações diferenciais do modelo cinético, utilizou-se a rotina LSODE (HINDMARSH, 1983).

Atala (2000) determinou funções que descrevem parâmetros cinéticos em função da temperatura (na faixa de 28 a 40 °C) para processos em batelada. Para melaço de safra distinta, Andrade (2007) re-estimou parâmetros cinéticos na faixa de temperatura de 30 a 38 °C e mostrou que era possível através da re-estimação de alguns parâmetros do modelo (mantendo os demais fixos), obter um novo modelo com alta acurácia, que representasse a cinética do processo fermentativo. Através da análise de sensibilidade, pode-se dar maior atenção aos parâmetros mais sensíveis do modelo em re-estimações para representar novas condições operacionais. Os valores dos parâmetros cinéticos obtidos por Andrade (2007) são apresentados na Tabela 2.6.

Estes parâmetros são específicos para um determinado meio de cultivo composto por melaço de cana-de-açúcar diluído, e uma linhagem de levedura. Para trabalhos com outras linhagens, ou quando nutrientes ou caldo hidrolisado são adicionados ao meio, para se obter um modelo confiável é necessária a re-estimação desses parâmetros, obtendo então novos valores que descrevam a cinética do processo atualizado.

Tabela 2.6 – Parâmetros cinéticos do modelo em batelada obtidos por Andrade (2007)

Parâmetros	Temperatura de fermentação (°C)				
*	30,0	31,2	34,0	36,8	38,0
$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	0,224	0,275	0,390	0,337	0,300
$X_{\text{máx}}$ (g/L)	79,9367	54,000	43,000	38,000	37,000
$P_{\text{máx}}$ (g/L)	129,915	79,990	75,000	76,000	78,000
Y_x	0,045	0,044	0,039	0,037	0,036
$Y_{p/x}$	3,967	8,551	9,932	9,957	10,200
K_s (g/L)	4,100	4,100	4,100	4,100	4,100
K_i (g/L)	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004
m_x	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200
m	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
n	1,500	1,500	1,500	1,500	1,500
m_p	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100

2.11 Metodologia de Plackett-Burman (PB) para a seleção dos parâmetros mais relevantes do modelo.

Segundo Rodrigues e Iemma (2009), geralmente, ao desenvolver processos, o número de variáveis encontradas é bastante grande, sendo que o planejamento fracionado é ideal para se trabalhar com no máximo 8 variáveis. Para valores maiores, existe uma metodologia adequada para seleção de variáveis que influenciam em uma dada resposta (BARROS NETO *et al.*, 1996), desenvolvida por Plackett & Burman (1946). Esta metodologia tem uma grande vantagem, pois exige um número de experimentos muito menor para determinação da influência de k fatores, se comparada ao planejamento fatorial completo, o qual requereria 2^k experimentos (ou simulações), considerando 2 níveis investigados de cada fator.

Existem na literatura outras metodologias disponíveis para avaliação de influência de variáveis independentes em dependentes, como a “one-at-a-time sensitivity analysis”, onde cada

parâmetro é avaliado de forma individual, porém a metodologia de análise de sensibilidade por Plackett-Burman (1946) apresenta várias vantagens sobre esta. A análise de sensibilidade por Plackett-Burman (1946) considera que os efeitos de variáveis independentes são calculados, considerando valores médios das demais variáveis, ao invés de manter as outras variáveis em um valor fixo (BERES; HAWKINS, 2001). Isto significa que todas as variáveis do modelo são avaliadas de forma simultânea, o que evita a perda de informações e promove maior eficiência para esta técnica (KENNEDY; KROUSE, 1999), com a mesma acurácia se cada parâmetro fosse avaliado de forma individual (PLACKETT; BURMAN, 1946), além da sua aplicação não estar limitada a um tipo de modelo em particular. Outra característica importante da metodologia de Plackett-Burman (PB) é que o intervalo de variação dos parâmetros envolvidos na análise de sensibilidade não precisa ser o mesmo, porém é requerido que esses parâmetros estejam em um intervalo que corresponde a valores providos de significado físico (BERES; HAWKINS, 2001).

Barros Neto *et al.* (2003) afirmam que os planejamentos fracionários de Plackett-Burman podem empregar até 12, 20, 24, 28 ensaios, podendo investigar para esses até 11, 19, 23, 27 fatores, dados por $(n-1)$, sendo n o número de ensaios, porém recomenda-se que o número de fatores analisados não ultrapasse $(n-4)$, para que sobre graus de liberdade para o cálculo dos erros nos valores dos efeitos principais. Rodrigues e Iemma (2005) recomendam que pelo menos 3 repetições no ponto central sejam realizadas. Esses mesmos autores apresentam de forma detalhada uma metodologia de construção de matrizes de delineamento de Plackett-Burman, onde mais informações podem ser encontradas.

Essa idéia de seleção de variáveis por Planejamento de Plackett & Burman (1946) pode ser estendida e utilizada para avaliação da influência de variáveis independentes de um modelo nas dependentes. Para um modelo matemático que representa a cinética de fermentação alcoólica, por exemplo, Andrade (2007) aplicou a metodologia de Plackett-Burman (construindo uma matriz de delineamento PB de 20 ensaios) para selecionar dentre 11 parâmetros do modelo (fatores), os que eram mais relevantes em variáveis de interesse, como concentração final de etanol e células, e tempo de fermentação (respostas). Essa idéia pode ser aplicada também na seleção de parâmetros mais sensíveis de um modelo cinético para processo de produção de etanol

de segunda geração, em variáveis tais como, perfis de substrato, células e etanol formado no reator.

Esta metodologia é bastante útil em problemas de re-estimação de parâmetros, pois se sabe que em processos de fermentação alcoólica os mesmos variam de forma significativa com a qualidade da matéria-prima e linhagem de levedura, o que dificulta assim a obtenção de um modelo robusto. O conhecimento dos parâmetros mais relevantes do processo permite a re-estimação destes, de forma que os menos importantes permaneçam constantes (ou seja, são excluídos da etapa de re-estimação), facilitando esta tarefa e reduzindo o tempo de trabalho devido à interação entre eles. É bem conhecido também que modelos que não têm seus parâmetros reajustados para novas condições não representam com boa qualidade o comportamento do processo.

Neste trabalho, os parâmetros cinéticos do modelo serão testados em dois níveis distintos, baixo (-) e alto (+), sendo que o valor baixo corresponde ao valor nominal do parâmetro no ponto central escolhido (0), subtraído de 10 %, e o nível alto corresponde ao valor nominal do ponto central com acréscimo de 10 %. É importante notar que variação entre os níveis é arbitrária, porém é necessário que os valores permaneçam em intervalos com significado físico. Esta metodologia tem sido adotada por alguns autores para este tipo de processo, como Kalil *et al.* (2000), Costa *et al.* (2001) e Andrade (2007), os quais arbitraram a diferença entre valores de nível (0) e (+) de 10 %.

CAPÍTULO 3

CAPÍTULO DE LIVRO: DEVELOPMENT OF EXTRACTIVE PROCESSES AND ROBUST MATHEMATICAL MODEL FOR BIOETHANOL PRODUCTION

Este capítulo mostra um trabalho publicado como capítulo do livro Bioethanol: Production, benefits and economics. Neste capítulo foi feita uma revisão sobre o uso de processos extrativos na produção de etanol, em especial a extração por flash a vácuo. Também foi abordada a modelagem matemática da fermentação alcoólica com ênfase em técnicas de re-estimação dos parâmetros cinéticos para lidar com flutuações na qualidade da matéria-prima. Com a finalidade de complementar a modelagem abordada neste Capítulo, é apresentado um artigo publicado no periódico Applied Biochemistry and Biotechnology, vide Anexo A.

Trabalho publicado no livro **Bioethanol: Production, benefits and economics**, 2009. Chapter 3, p. 75-92. Rafael Ramos de Andrade, Elmer Ccopa Rivera, Daniel I. P. Atala, Francisco Maugeri Filho, Rubens Maciel Filho, and Aline C. Costa.

Chapter 3

DEVELOPMENT OF EXTRACTIVE PROCESSES AND ROBUST MATHEMATICAL MODEL FOR BIOETHANOL PRODUCTION

***Rafael Ramos de Andrade^a, Elmer Ccopa Rivera^a,
Daniel I. Pires Atala^b, Francisco Maugeri Filho^b,
Rubens Maciel Filho^a and Aline Carvalho da Costa^a***

^aLaboratory of Optimization, Design and Advanced Control, School of Chemical
Engineering, University of Campinas, 13081-970, Campinas, SP, Brazil

^bLaboratory of Bioprocess Engineering, School of Food Engineering,
University of Campinas, 13081-970, Campinas, SP, Brazil

ABSTRACT

Bioethanol production processes have been running for years and ethanol consumption has been proved to be advantageous over fossil fuels considering gas emission, especially in metropolitan areas, reduction of dependence of oil and gas imports and social aspects, such as job generation.

Despite the positive aspects cited and the rapid bioethanol expansion around the world, the concerns on its sustainability and challenges have increased. Among the drawbacks associated with bioethanol production are the high amount of fresh water consumed and the high generation of wastes, specifically the vinasse generated in the conventional processes (13 liter of vinasse/liter of ethanol produced).

One of the alternatives for overcoming these problems is the use of a continuous extractive process, which is associated to a higher productivity when compared to the traditional modes of operation adopted in the industrial sector. This system consists of three interconnected units: a fermentor, a membrane unit and a flash vessel under vacuum. The process is attractive for removing ethanol simultaneously to its production, reducing product inhibition in yeasts, resulting in high performance, productivity and non-necessity of heat exchangers.

Another point to be overcome in the industrial sector is the lack of robustness of the fermentation in the presence of fluctuations in operational conditions, which leads to

changes in the kinetic parameters, with impact on yield, productivity and conversion. These changes are very common in plants of alcoholic fermentation.

Through the implementation of an extractive process associated with a robust model (under parameter re-estimation) to be used in optimization procedures and development of controllers, the performance of the fermentative processes is much improved, with gains of productivity, less waste generation and less water consumption.

In this chapter the advantages of the continuous extractive process and its kinetics are discussed through intrinsic modeling, considering substrate, ethanol and biomass inhibitions, rate of loss of viability of cells and temperature influence on the kinetics. This modeling reduces costs by allowing the investigation of suitable conditions by simulation and the development of optimizers and controllers. Besides, this chapter presents the methodology of continuous re-estimation of the kinetic parameters of existing models, which when associated to sensitivity analysis reduces the complexity of this task to obtain robust models, which are accurate even under changes in operational conditions.

NOMENCLATURE

D	Dilution rate (h^{-1})
F_0	Fresh molasses flow rate (m^3/h)
F	Fermentor outflow rate (m^3/h)
F_P	Permeate flow rate (m^3/h)
F_{PU}	Fermentor purge flow rate (m^3/h)
F_r	Flash tank liquid outlet flow rate (m^3/h)
F_{re}	Return stream flow rate (m^3/h)
F_V	Flash tank vapor outlet flow rate (m^3/h)
K_{dp}	Coefficient of death by ethanol (m^3/Kg)
K_{dT}	Coefficient of death by temperature (h^{-1})
K_i	Substrate inhibition parameter (m^3/kg)
K_s	Substrate saturation parameter (kg/m^3)
m	Parameters of cellular inhibitions
m_p	Luedeking-Piret non growth- associated constant ($\text{kg}/[\text{kg}\cdot\text{h}]$)
m_x	Maintenance parameter ($\text{kg}/[\text{kg}\cdot\text{h}]$)
$\mu_{\max}$	Maximum specific growth rate (h^{-1})
n	Parameter of product inhibitions
P	Ethanol concentration (m^3/Kg)
$P_{\max}$	Product concentration when cell growth ceases (kg/m^3)
P_V	Flash tank pressure (kPa)
P_0	Inlet product concentration (Kg/m^3)
P_r	Product concentration in the flash tank liquid outlet flow (Kg/m^3)
P_v	Product concentration in the flash tank vapor outlet flow (Kg/m^3)
r_d	Rate of unviable cells ($\text{Kg}/\text{m}^3\text{h}$)
r_x	Rate of viable cell growth ($\text{Kg}/\text{m}^3\text{h}$)
r_s	Rate of substrate utilization ($\text{Kg}/\text{m}^3\text{h}$)
RSD	Residual standard deviations (%)
r_p	Rate of products production ($\text{Kg}/\text{m}^3\text{h}$)

S_0	Inlet substrate concentration (Kg/m^3)
S	Fermentor substrate concentration (Kg/m^3)
S_r	Substrate concentration in the flash tank liquid outlet flow (Kg/m^3)
S_v	Substrate concentration in the flash tank vapor outlet flow (Kg/m^3)
t	Time (h)
V	Total volume of the system (m^3)
X	Biomass concentration (Kg/m^3)
X_d	Concentration of dead biomass (Kg/m^3)
$X_{\max}$	Biomass concentration when cell growth ceases (kg/m^3)
X_p	Biomass concentration in the permeate flow (Kg/m^3)
X_t	Total cellular concentration (Kg/m^3)
X_v	Biomass viable concentration (kg/m^3)
Y_{px}	Luedeking-Piret growth associated constant (kg/kg)
Y_x	Limit cellular yield (kg/kg)

1. INTRODUCTION

With the requirement of new energy sources resulting from the advent of industrial capitalism and the rapid growth of population, several alternative energy sources were exploited for centuries without the concerns on sustainability. In the last 15 years, with the increased concerns about climate changes, bioenergy gained importance in the world scenario, and nowadays biomass contributes for the supply of a significant amount of energy in developed countries: 4% in the USA, 18% in Sweden and 20% in Finland, and is projected to achieve 30 % of the total quantity produced in the world by 2050 (Rosillo-Calle et al., 2000), or 50 % of the total energy demand in developing countries (Demirbas, 2008). Bioethanol production has achieved an exponential growth since 2000, and is presumed to grow at the same level in the future (Granda et al., 2007).

Bioenergy presents several advantages over other conventional sources in the environmental and socioeconomic aspects only when produced in a sustainable and efficient way. Among the benefits of bioenergy production and use are job creation, especially in agricultural sectors; reduction in the level of greenhouse gas emissions due to the CO_2 sequestration by cane cropping (Goldemberg et al., 2008); less pollutants generation compared to fossil sources on account of less sulfur and nitrogen contents in biofuels; security energy, obtained by renewable matter; and wide availability of well distributed sources around the world, different from fossil materials that are limited to specific regions (Demirbas, 2008).

The Brazilian bioethanol manufacturing has showed to be more sustainable, environmentally friendly and economically feasible than the ethanol from corn, as it consumes only a small amount of fossil fuels. Only trucks for transportation, agricultural machinery and fertilizers depend on fossils as raw materials (Granda et al., 2007). In addition, all the amount of CO_2 exhausted from vehicles (running on bioethanol) and burning of bagasse in boilers is absorbed by photosynthesis of sugarcane. The CO_2 generation has been depleted with the advent of mechanization and the resulting gradual elimination of the sugarcane burning practice that precedes harvesting, as well as with the gain in efficiency in

industrial boilers, which makes the CO₂ balance more favorable when compared with fossil fuels (Miranda et al., 1994).

Despite all overall advantages of bioethanol and the advancements achieved in that area, the fossil fuels are still economically more competitive in many countries. In addition, many problems in the environmental sector must be solved, as the great volume of residues, especially vinasse generated by the current fermentation processes, and water consumption for diluting molasses. In these aspects, many efforts must be concentrated to change these scenarios in order to make bioethanol production more competitive and environmentally friendly.

Taking this into consideration, this chapter discusses the development and advantages related to the use of extractive processes for bioethanol production coupled to the use of suitable and robust models for improving the process performance in the industrial sector.

1.1. Vinasse Generation and Water Consumption in Fermentation Existing Processes

Vinasse is considered one of the main polluting byproducts of processes of alcoholic fermentation. This effluent produces several damages to the environment when discarded without treatment due to the high BOD (biochemical oxygen demand), around 30 – 60 g/L, low pH due to organic acids, high solids content, and high volumes.

The quantity of vinasse produced by common processes is about 12-15 L per liter of ethanol generated (Navarro et al., 2000). In 2007, only Brazil was responsible for the production of 18 million cubic meters of ethanol (Goldemberg et al., 2008), and with the rapid expansion in the ethanol sector, the volume of vinasse tends to increase, requiring new technologies for its use and treatment. In addition, new biotechnological processes must be developed in order to reduce this amount.

Among the existing methods for vinasse re-use are the thermal concentration, application in lands, methane production (Navarro et al., 2000), cattle feed and fertilizer (Morin-Couallier et al., 2008), fungi production, material of construction, incineration, methane production and recycle of vinasse to partially dilute molasses in fermentation (Braunbeck and Cortez, 2005).

The thermal concentration of vinasse is very energy demanding (Kannabiran and Pragasam, 1993) and does not eliminate completely the problem of its generation; the application in lands as fertilizer is limited by high costs of transportation and storage involved, and can be prohibited by long distances faced to distribute the product.

The use of vinasse for methane production was practiced by a few distilleries in Brazil, and this gas was used as fuel in trucks, but this technology showed to be non competitive with the oil prices, and high costs with maintenance of specific converted trucks also made this technique unusual (Braunbeck and Cortez, 2005).

The technologies discussed above in this chapter for the use of vinasse do not reduce fresh water consumption in distilleries, which is considered another problem that must be solved to make bioethanol production more sustainable. An ideal strategy would solve the consumption of water and the amount of effluent generated, simultaneously.

Among the improvements in bioethanol production achieved with the strategy proposed is the reduction of operational costs by maintaining the industrial plant under optimal operational conditions, which is possible through the use of robust models and controllers;

and also the decrease in effluent generation. Extractive processes have shown to be suitable for reducing costs and vinasse generation and present higher productivity compared to the traditional operational strategies used in the industrial sector, such as batch, fed-batch and continuous modes.

2. EXTRACTIVE PROCESSES FOR ETHANOL PRODUCTION

Despite the researchs in ethanol production, the existing processes in Brazil commonly run in fed-batch or continuous modes, which produce great quantities of vinasse and are subject to ethanol inhibition, reducing productivity. In order to overcome this drawback, some works are focusing on the development of extractive fermentation processes, which consists of interlinked units composed by a bioreactor (ethanol production), and an extractive unit (for ethanol removal), as depicted in Figure 1. Among the advantages of product removal are the reduction of the inhibitory effect by ethanol; less vinasse generation due to the possibility of feeding molasses at higher concentrations, which reduces costs in waste treatment; and the possibility of eliminating one distillation column. It is important to stress that distillation is considered one of the most energy demanding operations in the industrial sector. The ethanol separation during the course of fermentation maintains the product concentration below inhibitory levels.

Thus, an efficient configuration of extractive fermentative process, and the design of compact plants (with high productivity and lower consumption in distillation) requires studies on available technologies for ethanol removal and optimization of operational variables. The most commonly techniques used in extractive processes are pervaporation, gas stripping, extraction with solvent and flash separation under vacuum, as presented on the following sections of this chapter.

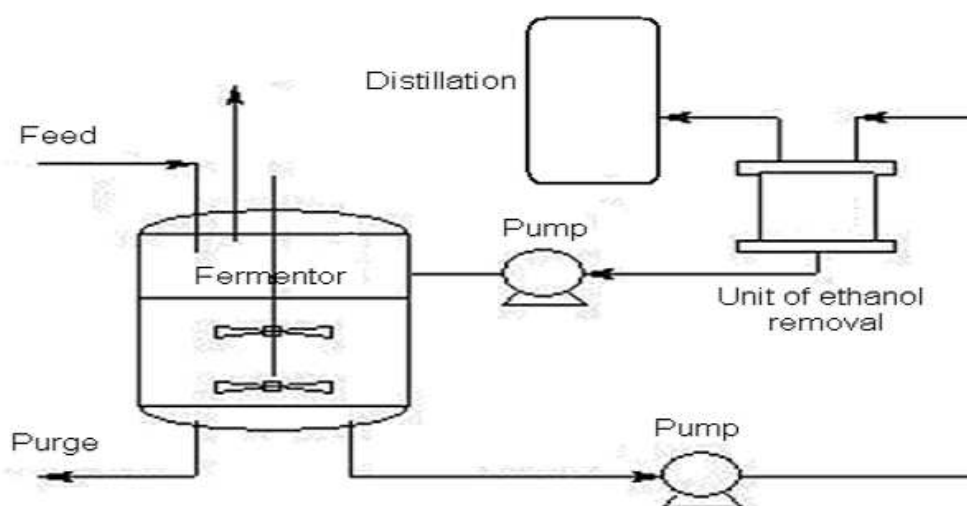


Figure 1. Schematic diagram of generic extractive process for ethanol production.

2.1. Gas Stripping

The gas stripping method for ethanol removal was evaluated by some authors, such as Taylor et al. (1996), and is based on the stripping of ethanol in a column with the injection of a gas in the bottom. The more volatile component is stripped from the mixture due to its high volatility. The recovery of bioethanol from the stream is performed by condensation. Among the carrier gases used in gas stripping processes are CO₂, O₂-free N₂ or H₂. Ezeji et al. (2004) evaluated gas stripping for ethanol-acetone-butanol production, achieving higher productivity than in batch modes of operation. For alcoholic fermentation, it is worthwhile mentioning that the anaerobic conditions must be maintained in the process, and the outlet gases of fermentation can be potentially used as carriers and be recycled, but studies of the effect of carrier gases on cellular metabolism are required. The ethanol obtained at the top of the column usually presents high concentration after condensation in a cooler at 350 Kg/m³, which minimizes costs with downstream separations by distillation. The feeding of water in the reactor is required only to supply the losses due to the gas stripping, maintaining a constant total volume.

2.2. Solvent Extraction

The solvent extraction is one of the available techniques to reduce the inhibition by end product in ethanol fermentation, and is considered efficient energetically (Mariorella et al., 1984 and Daugulis et al., 1991) when compared to distillation. The project of the solvent extractive process is complex and the achievement of high productivity depends strongly on variables such as extraction efficiency, biocompatibility of the solvent (Cheng and Wang, 2007), volume required for separation, chemical stability, costs of separation of the product and solvent recovery, emulsion or foam formation in the broth, safety of the industrial plant, and environmental risk when this solvent is discharged. The solvent selectivity and losses must also be considered.

Some authors like Wang and Achenie (2002) have applied tools as computer-aided molecular design to search for a biocompatible solvent for extractive fermentation processes, and the substances evaluated were 3-hexanone, ethyl isopropyl ketone, sec-butyl isopropyl ether, and *n*-butyl acetate, which was found to be the most biocompatible solvent.

The modern solvent design techniques are based on computational algorithms, such as heuristic numeration, knowledge-based approaches, branch and bound approaches, mixed-integer optimization, genetic algorithm, simulating annealing and other methods (Wang and Achenie, 2002), and the problems are also subject to physical-chemical constraints.

In experimental works, the vegetable oils have been investigated as extractant agents to remove ethanol from fermentation broths. The oleyl alcohol has many desirable characteristics as a solvent, such as low toxicity to yeasts, but for application in the commercial sector its extractive power is not attractive. According to Mehta and Fraser (1985), molecules of high molecular weight, such as hydrocarbons and vegetable oils would be a potential option for ethanol extraction due to its capacity of forming conjugate pairs of molecules in the presence of ethanol. Some examples cited by the authors are hexadecane, cottonseed oil, olive, coconut and soybean oils. The main problem faced was the low extraction capacity obtained in solutions diluted in ethanol (Rahman et al., 1995).

In a recent work, it was found that some branched alcohols with a range of 14- 20 carbons have presented higher extractive performance when compared to other solvents as oleyl alcohol and 1- dodecanol (Offeman et al., 2008). This allows the extraction of ethanol from the fermentation broth even in lower concentrations. It was also shown that these alcohols with long chains are non toxic to microorganisms and present low solubility in the aqueous phase. On the other hand, alcohols with shorter chains (range of 2 to 10 carbons) are toxic to microorganisms and consequently not suitable for extractive processes for ethanol production.

The same authors (Offeman et al., 2008) also evaluated experimentally the effect of the toxicity of alcoholic solvents on the yeasts. The C8-C12 alcohols presented inhibitory or toxic effect on ethanol production, while C14- C20 alcohols were superior for presenting low solubility in the aqueous phase, which results in a low influence in the yeast metabolism and productivity.

2.3. Pervaporation

Extractive processes by pervaporation apply a membrane for selective removal of ethanol from the fermentation broth. By one side, the broth with diluted ethanol is fed, and on the other side, a vacuum pump is installed to produce low pressures, which forces ethanol to pass through the membrane. A trap at low temperature for condensing and recovering the ethanol is installed in the system. The main advantage of pervaporation is that this technique enables the concentration of ethanol in the permeate flow above the azeotropic composition, requiring one stage of separation, which do not occur in other extractive processes that are limited by the thermodynamic equilibrium. Also, the pervaporation processes run at environmental temperature, which do not require additional energy expenses, as in distillations.

Through the use of a silicate membrane, Nomura et al. (2002) successfully obtained a separation factor much higher than polymeric membranes, as investigated by Nakao et al. (1987), and also an ethanol high permselectivity. Additionally, the salt effect of the fermentation broth increases the ethanol selectivity when compared to the mixture water-ethanol.

2.4. Extractive Processes under Vacuum

The extractive process under vacuum is remarkable to be simpler to operate and build up comparing to other systems, as it requires only a tank linked to a vacuum pump and condenser. Thus, the problems with membrane fouling, solvent separation, toxicities on the cells and emulsification are eliminated. This model is also easier to adapt to existing industrial processes in Brazil. In addition, the evaporation of ethanol removes heat from the system, which potentiality eliminates the necessity of heat exchangers for cooling the fermentor and saves utilities consumption when the flash is operated at 33°C. According to Andrietta (1994), the heat exchangers are one of the most expensive equipments in the ethanol sector.

This process was built up and experimentally validated for bioethanol production in bench scale by Atala (2004), as cited by Mariano et al. (2008). The medium used was

sugarcane molasses at high concentrations, from 180 to 330 Kg/m³ of TRS (total reducing sugar), and the microorganism *Saccharomyces cerevisiae* at 30 Kg/m³ after the achievement of steady state. The flash vessel is able to maintain ethanol concentration at the broth medium bellow the inhibitory level (around 40 - 60 Kg/m³). These characteristics of operation guarantee less vinasse formation for allowing the feeding of molasses at higher concentration than in common existing processes, and increases ethanol productivity to 10 Kg/m³.h.

3. REDUCTION OF OPERATIONAL COSTS BY ROBUST MODELING

One of the challenges in bioethanol production is the reduction of operational costs. One alternative to achieve this goal is the use of extractive processes and the maintenance of the operational unit under optimal conditions to reach high productivity, yield and conversion, with less effluent generation and fresh water consumption. This can be done using simulation tools and efficient optimizers and controllers, which requires robust and well developed models.

Although many works have been published about bioethanol modeling (Phisalaphong, et al. 2005; Andrietta, 1994; Atala, 2004 and Andrade et al. 2007), the kinetic parameters of the models change with operational conditions such as yeast lineage, characteristics of the raw material used, presence of contaminants in fermenters, microbial load in sugarcane and other characteristics of the process used to construct the model.

It is important to stress that the presence of contaminants in raw material in Brazil is not eliminated by sterilization due to high costs of operation that would economically prohibit bioethanol production.

The changes in the operational conditions mentioned above alter drastically the kinetics of fermentation. Estimation of model parameters is one of the important but difficult problems in the construction of a robust model. Since the number of model parameters tends to increase, their estimation become a difficult and time-absorbing step. Furthermore, as model parameters vary according to the fermentation conditions in bioprocesses, it is necessary to re-estimate these parameters. In order to save the effort and time, sensitivity analysis can be applied for parameter screening. The most significant parameters are re-estimated when changes in fermentation conditions occur, obtaining an accurate model.

3.1. Source of Variations in Fermentative Processes

The variations in operational conditions occur frequently in bioethanol production, and affect the kinetic of fermentation. Some sources of variations can be cited, such as different yeasts lineages of *S. cerevisiae*, the variability of sugarcane due to the type of soils, climatic conditions, pluviometric precipitation, maturity of the raw material, and post harvest conditions of storage, microbial load and others.

Andrade et al. (2009) discuss that some authors like Phowchinda and Strehaiano (1999) have investigated the impact of different sugars on the overall kinetic of fermentation by *S. cerevisiae*. The rate of sucrose uptake is lower than glucose and fructose. The kinetic rate is also influenced by nitrogen source in yeasts (Andrade et al., 2009) and heavy metals in the

molasses, although these effects have not been added as terms of kinetic expression in the modeling of alcoholic fermentation.

For batch mode in alcoholic fermentation by *S. cerevisiae*, Andrade et al. (2007) have shown that the re-estimation of 4 parameters of a total of 11 is sufficient for obtaining a robust model. The model used by the authors is formed by three differential expressions (Eq. 1-3) as follows:

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

$$\frac{dP}{dt} = Y_{px} r_x + m_p X \quad (2)$$

$$- \frac{dS}{dt} = (r_x / Y_x) + m_x X \quad (3)$$

where $\mu_{\max}$ is the maximum specific growth rate (h^{-1}); K_s the substrate saturation parameter (kg/m^3); K_i is the substrate inhibition parameter (m^3/kg); $X_{\max}$ is the biomass concentration when cell growth ceases (kg/m^3); $P_{\max}$ is the product concentration when cell growth ceases (kg/m^3); m and n are parameters of cellular and product inhibitions; Y_{px} is Luedeking-Piret growth associated constant (kg/kg); m_p is the Luedeking-Piret non growth- associated constant ($\text{kg}/[\text{kg}\cdot\text{h}]$); Y_x and m_x are the limit cellular yield (kg/kg) and maintenance parameter ($\text{kg}/[\text{kg}\cdot\text{h}]$), respectively. In these equations, X is the biomass, S the substrate, and P the ethanol concentration (m^3/Kg).

The parameters $\mu_{\max}$, $X_{\max}$, $P_{\max}$, Y_x and Y_{px} are temperature dependent. The authors show the re-estimation of these parameters is sufficient to obtain a model with a good capacity of prediction under changes in raw material quality, maintaining the remaining ones, K_s , K_i , m , n , m_p , m_x , fixed. The reduction of the number of parameters to be re-estimated makes model updating quick and simple, especially for models with great number of parameters, as structured models, or complex models that consider additional equations on their kinetics.

The main advantage of parameter updating is the obtaining of an accurate model to be applicable in simulations, optimizations and control, which increases the performance of the fermentative process, reducing costs of production for maintaining it under optimal operational conditions. A non-valid model leads to errors in decision making.

In a recent work, Andrade et al. (2009) discuss and propose an algorithm for screening and re-estimating the kinetic model parameters for alcoholic fermentation based on the well known Plackett-Burman sensitivity analysis, and quasi-Newton method. In a first step, kinetic parameters of a model are selected by sensitivity analysis. The authors also suggest that Plackett-Burman is superior to one-at-a-time sensitivity analysis because all the parameters are simultaneously evaluated in the first technique. In a second step, only the most relevant parameters are updated when changes in operational conditions occur.

3.2. Plackett-Burman (PB) Methodology for Screening of Kinetic Parameters for Re-Estimation Problem

Plackett-Burman design can be applied to evaluate the influence of a great number of factors on some given responses (Barros Neto *et al.*, 1996). With a PB design of 20 trials, a maximum of 19 variables can be analyzed. A lower number of factors can be used to allow for degrees of freedom for error calculation. The main idea of this technique is to screen the kinetic parameters that have significance on the behavior of the process, and the non-significant ones are maintained constant during the parameters re-estimation problem. Re-estimation is performed in order to represent the kinetics of the process at different conditions of molasses composition and microorganism strain.

In the work of Andrade et al. (2009), Plackett-Burman design was used to investigate the influence of kinetic parameters (11) on the responses: fermentation time (t), product concentration at the end of fermentation (P) and cell concentration at the end of fermentation (X). For this purpose, parameters of a deterministic model at 34° C were tested at two levels, high (+) and low (-), according to Table 1. A number of 20 trials was chosen and the calculations were made with 8 degrees of freedom.

Through simulation using FORTRAN 90, the values of t, X and P were obtained for each fermentation and used as responses in PB technique. Initial conditions of concentrations of biomass, substrate and product were fixed at 0.7, 119.1 and 3.9 Kg/m³, respectively.

The software STATISTICA, version 7.0, was used for the screening of the parameters that have higher influence on the kinetic behavior, as shown in Table 2. Values of effects on responses were estimated at the 95 % confidence level. Results presented in bold are significant.

According to Table 2, μ_{max} and n were statistically significant for fermentation time, m_x and m_p for product concentration at the end of fermentation. The effects of P_{max} , Y_x and Y_{px} were observed on the model for all responses (t, P and X).

Table 1. high (+) and low (-) levels of parameters for PB technique

Parameter	Level -1	Level +1
μ_{max}	0.35	0.42
X_{max}	38.7	47.3
P_{max}	67.5	82.5
Y_x	0.0356	0.0436
Y_{px}	8.9393	10.9258
K_s	3.69	4.51
K_i	0.0036	0.0044
m_x	0.18	0.22
m	0.9	1.1
n	1.35	1.65
m_p	0.09	0.11

Andrade et al. (2009)

Table 2. Effect estimates on time of fermentation, final ethanol and biomass concentration, from PB design. Values in bold are considered significant.

	Effect on t	Effect on X	Effect on P
$\mu_{\max}$	-2.1610	0.0464	0.1400
$X_{\max}$	-0.1270	-0.0094	0.0241
$P_{\max}$	-3.7370	0.1193	-0.4875
Y_x	3.8330	0.7058	9.0418
Y_{px}	3.6630	-0.1133	8.9003
K_s	-0.1730	0.0096	-0.1873
K_i	1.0650	-0.0306	-0.1860
m_x	0.6730	-0.0422	-0.8816
m	-0.0870	0.0185	-0.1092
n	1.7430	-0.037918	-0.1195
m_p	-0.0570	-0.0093	1.0309

Andrade et al. (2009).

The parameters that are considered non-significant are fixed in the re-estimation problem. In order to evaluate the importance of re-estimation of parameters, the authors simulate a mechanistic model with parameters obtained by Andrade et al. (2007) and perform some new batch fermentations at different molasses (different harvesting) and yeast strain conditions. As a result, the original model presents poor capacity of prediction.

Thus, the authors propose the re-estimation of the most significant parameters of Table 2 and the less significant parameters were maintained fixed as $X_{\max}=43$, $K_s=4.1$, $K_i=0.004$, $m_p=0.1$, $m=1.0$, $n=1.5$ and $m_x=0.2$. In this methodology, only 4 parameters were re-estimated: $\mu_{\max}$, $P_{\max}$, Y_x and Y_{px} . A mechanistic and robust model is obtained, with good quality of prediction for different experimental condition.

The residual standard deviation (RSD), Eq. (4), was used for characterizing the quality of the model prediction. After the re-estimation procedure, it was shown the original model achieved good accuracy (deviations decreased from about 35 to 10 %).

$$RSD(\%) = \left(\frac{\sqrt{RSD}}{\bar{d}_p} \right) 100 \quad (4)$$

where $RSD = \frac{1}{np} \sum_{p=1}^{np} (d_p - x_p)^2$, in which x_p and d_p are, respectively, the value predicted by the mathematical model and experimental value, $\bar{d}_p$ is the average of the experimental values and np is the number of experimental points.

3.3. Mathematical Modeling of an Extractive Process under Vacuum

The mathematical modeling of the extractive process potentially reduces costs of production by allowing the operation under suitable conditions. This modelling will consider the non-structured approach, where cells are represented as a single component in the

mixture, according to Bailey et al. (1986). The non-segregated approach was also considered, or in other words, the average cell properties are used.

According to Phisalaphong et al. (2005), the mathematical modeling of the process establishes a relation between kinetic and environmental parameters, usually represented by a modified Monod type model. This model must represent the substrate and product inhibitions, considering that the lineages used in industrial processes are subject to these effects on cellular growth.

Figure 2 presents a continuous extractive process for ethanol production coupled to a flash vessel with cell recycle. The modeling of the process takes into account the volume occupied by the cells, intracellular ethanol and terms of cell death, considering that continuous processes are operated for long periods. The term ρ , defined by Monbouquette (1992), is a relation between dry cell mass and the volume of wet cells, and γ , the relation between the inter and extracellular ethanol concentrations.

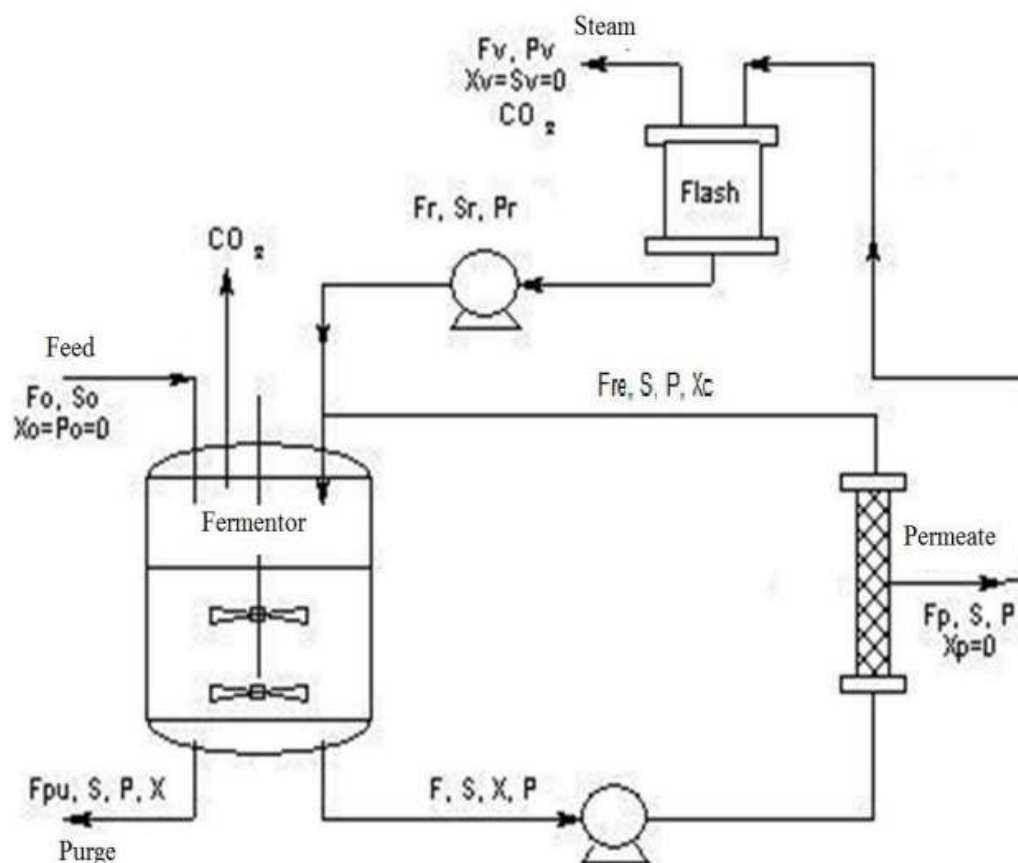


Figure 2. General scheme of extractive process using a flash vessel.

For the modeling of the extractive process under vacuum, some considerations are made, such as a fermentative system represented by a well stirred tank reactor; the total volume of the fermentative process remains constant; the biomass content is removed from the system

only in the purge stream, or in other words, the membrane retains completely the cells; the feed stream contains only diluted sugarcane molasses, with absence of cells and ethanol.

Thus, the equations of mass balance in the fermentative system are represented by:

- Viable biomass

Accumulation = in – out + generation term

$$\frac{d(X_v \cdot V)}{dt} = r_x \cdot V - r_d \cdot V - F_{PU} \cdot X_v \quad (5)$$

Equation (5) can be written in a simpler way, by:

$$\frac{dX_v}{dt} = r_x - r_d + \phi \cdot D \cdot X_v \quad (6)$$

$$\phi = \frac{F_{PU}}{F_O} \quad (7)$$

$$D = \frac{F_O}{V} \quad (8)$$

The symbol ϕ denotes the purge rate of the system, and D the dilution rate, defined by Eqs (7) and (8), respectively.

- Cellular death

Considering that the continuous fermentation occurs for long periods, the term of cell death must be taken into account in the modeling:

Accumulation = in – out + generation

$$\frac{d(X_d \cdot V)}{dt} = r_d \cdot V - F_{PU} \cdot X_d \quad (9)$$

Thus:

$$\frac{dX_d}{dt} = r_d + \phi \cdot D \cdot X_d \quad (10)$$

- Product formation

Accumulation = in – out + generation

$$\frac{d(P \cdot V)}{dt} = -[F_{PU} \cdot P + F_V \cdot P_V] + rp \cdot V \quad (11)$$

Considering that a fraction of ethanol is intracellular:

$$\begin{aligned} \frac{d(P \cdot V)}{dt} &= \frac{d}{dt} [(vol. reac. - vol. cel.) \cdot P + [P intra cel.] \cdot V_{cel}] = \\ \frac{d}{dt} \left[\left(1 - \frac{Xt}{\rho} \right) \cdot P \cdot V + \frac{Xt}{\rho} \cdot \gamma \cdot P \cdot V \right] \end{aligned} \quad (12)$$

$$\frac{d}{dt} \left[\left(1 - \frac{Xt}{\rho} \right) \cdot P \cdot V + \frac{Xt}{\rho} \cdot \gamma \cdot P \cdot V \right] = rp \cdot V - F_O \cdot [(\phi) \cdot P + (1 - \phi) \cdot P_V] \quad (13)$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{rp - D \cdot [(\phi) \cdot P + (1 - \phi) \cdot P_V] + \frac{(1 - \gamma)}{\rho} \cdot P \cdot (rx - \phi \cdot D \cdot X_{Total})}{\left[1 + \frac{X_{Total}}{\rho} \cdot (\gamma - 1) \right]} \quad (14)$$

the symbol ϖ is the rate of permeate of the system, and is defined by Eq. (15):

$$\varpi = \frac{F_P}{F_O} \quad (15)$$

- Substrate consumption

Accumulation = in – out + generation

$$\frac{d(S \cdot V)}{dt} = F_O \cdot S_O - [F_{PU} \cdot S] - rs \cdot V \quad (16)$$

Considering that the concentration of substrate in the interior of cell is zero:

$$\frac{d}{dt} \left[\left(1 - \frac{Xt}{\rho} \right) \cdot S \cdot V \right] = F_O \cdot [S_O - S \cdot (\phi)] - rs \cdot V \quad (17)$$

$$\text{Writing Eq. 17 in a simplest way: } \frac{d}{dt} \left[\left(1 - \frac{Xt}{\rho} \right) \cdot S \right] = D \cdot [S_O - S \cdot (\phi)] - rs \quad (18)$$

and finally

$$\frac{dS}{dt} = \frac{D \cdot [S_o - S \cdot (\phi)] - rs + \frac{S}{\rho} \cdot [rx - \phi \cdot D \cdot X_{Total}]}{1 - \frac{X_{Total}}{\rho}} \quad (19)$$

The symbols X_v , X_d , S and P are the concentrations of viable and dead cells, substrate (total reducing sugar) and product, respectively; S_o denotes the substrate concentration in the feed stream and D is the dilution term ($D=Q/V$, where Q is the volumetric flow rate in the feed stream and V is the total volume of the fermentative system).

In the balance of product and substrate the volume occupied by biomass was considered. According to Monbouquette (1992), for cultivation at high cellular densities where the fractions of cell are greater than 10 % of the reactor volume, the intrinsic approach must be considered.

The specific rates of biomass formation, cell death, product formation and substrate uptake are given by the Eqs. (20) - (23), respectively:

$$rx = \mu_{max} \cdot \left(\frac{S}{K_S + S} \right) \cdot \exp(-K_i \cdot S) \cdot \left(1 - \frac{P}{P_{max}} \right)^n \cdot \left(1 - \frac{X_t}{X_{max}} \right)^m \cdot X_v \quad (20)$$

Eq. (20) is based on the expression proposed by Levenspiel (1980) and was used by Andrietta (1994) and recently by Atala et al. (2001) and Andrade et al. (2007) for modeling of ethanol fermentation processes, and presented a good agreement with experimental data.

The use of Eq. (20) is suitable for modeling this process that run at high cellular concentration as it presents a term of growth inhibition caused by existing yeasts on the fermentor. This occurs due to the difficulty of oxygen and substrate transfer in the fermentative broth at high yeasts concentration, which is common in processes with cell recycle.

The same expression also considers the substrate as a limiting factor of growth and as inhibitor, which occurs with sugarcane molasses at high concentration due to the presence of components that reduce the microbial growth.

$$rd = (K_{dT} \cdot \exp(K_{dp} \cdot P)) \cdot X_v \quad (21)$$

$$rp = Y_{px} \cdot rx + m_p \cdot X_v \quad (22)$$

Eq. 22 is suitable for alcoholic fermentations, considering that the expression takes into account a term for ethanol formation associated with yeasts growth (r_x) or existing viable microorganisms (X_v).

$$rs = \frac{rx}{Y_x} + m_x \cdot X_v \quad (23)$$

Eq. (23) takes into account the substrate consumption for cellular growth, microbial activities, mobility, and transport of solutes by the cellular membrane.

Overall Mass Balance in Extractive Process

Some considerations must be taken into account in the overall mass balance of the extractive process, as presented:

- the biomass concentration in the permeate is zero (stream F_p), occurring total separation of yeasts by the membrane system;
- the concentrations of ethanol and sugars in inlet and outlet streams of filtration system are held constant;
- the biomass concentration in the fermentor does not change during the time of operation;

The cellular concentration in the reactor is held constant due to the use of a purge (stream F_{PU}), which allows the withdrawal of metabolites of fermentation that concentrate in the system and are not removed by flash distillation under the working conditions. The purge also renews the cells continuously, according to Andrietta (1994).

When a mass balance is applied to the process of Figure 2, the following expressions are obtained:

$$F_F = F_O + F_R + F_{RE} = F_{PU} + F \quad (24)$$

$$F_R = F_P - F_V \quad (25)$$

$$F_P = F - F_{RE} \quad (26)$$

$$S_F = \frac{F_R S_R + F_O S_O + F_{RE} S_{RE}}{F_F} \quad (27)$$

$$F_0 = F_V + F_{PU} \quad (28)$$

$$F_V = F_O \cdot (1 - \phi) \quad (29)$$

$$t_r = \frac{V}{F} \quad (30)$$

$$V = V_{reactor} + V_{filter} + V_{pipes_of_cell_recycle} \quad (31)$$

The residence time is represented by (tr) and (V) is the volume occupied by all the regions where reactions occur.

CONCLUSION

This chapter brings a review of existing available techniques for extracting ethanol from diluted broth. By its simplicity of installation and operation, the extractive process under vacuum was presented as a remarkable and suitable methodology to be adapted to industrial plants, especially in Brazil. Although other techniques, such as pervaporation, are more efficient by the higher concentration of ethanol obtained with one stage, the extraction under vacuum coupled to existing distillation towers probably requires less investments.

The use of the extractive process under vacuum for bioethanol production, with the suitable model presented in this chapter, with robust optimizers and controllers that act continuously when changes in fermentation conditions occur, potentially enhances ethanol production.

REFERENCES

- Andrade, R.R.; Rivera, E.C.; Atala, D.I.P.; Maciel Filho, R.; Maugeri Filho, F.; Costa, A.C. (2009). Study of kinetic parameters in a mechanistic model for bioethanol production through a screening technique and optimization. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* [doi 10.1007/s00449-008-0291-8].
- Andrade, R.R.; Rivera, E.C.; Costa, A.C.; Atala, D.I.P.; Maugeri Filho, F.; Maciel Filho, R. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2007, 136-140, 753.
- Andrietta, S. R. *Modelagem, simulação e controle de fermentação alcoólica em escala industrial*; (PhD. Thesis) Unicamp: Campinas - SP, 1994; 178p.
- Atala, D. I. P. *Montagem, Instrumentação, Controle e Desenvolvimento Experimental de um Processo de Fermentação Alcoólica Extrativo*; (PhD. Thesis) Unicamp: Campinas – SP, 2004.
- Bailey, J.E; Ollis, D.F. *Biochemical Engineering Fundamentals*; Second Edition; Mc Graw-Hill: New York, NY, 1986; Vol. 1, pp 984.
- Braunbeck, O.A. Cortez, L.A.B. In *The use of biomass for energy production in Brazilian industries. (in Portuguese)*; Rosillo-Calle, F.; Bajay, S.V.; Rothman, H.; Editora Unicamp: Campinas, SP, 2000; Vol. 1, pp 215-246.
- Cheng, H.; Wang, F. *Chem. Eng. Sci.* 2007, 62, 4316 – 4324.
- Daugulis, A.J.; Axford, D.B.; McLellan, P.J. *Can. J.Chem. Eng.* 1991, 69, 488–497.
- Demirbas, A. *Energ. Conv.Manag.* 2008, 49, 2106-16.
- Ezeji, T.C.; Qureshi, N.; Blaschek, H.P. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004, 63, 653–658.
- Goldemberg, J.; Coelho, S.T.; Guardabassi, P. (2008). The sustainability of ethanol production for sugarcane. *Energy Policy* [doi:10.1016/j.enpol.2008.02.028].
- Granda, C.B.; Zhu, L.; Holtzaple, M.T. (2007). Sustainable liquid biofuels and their environmental impact. *Environmental Progress* [doi: 10.1002/ep], Vol. 26.
- Kannabiran, B.; Pragasam, A. *Geobios.* 1993, 20, 108-12.

- Levenspiel, O. *Biotechnol. Bioeng.* 1980, 22, 1671-1687.
- Maiorella, B.L.; Blanch, H.W.; Wilke, C.R. *Biotechnol. Bioeng.* 1984, 26, 1003-1025.
- Mariano, A. P.; Angelis, D. F.; Maugeri Filho, F.; Atala, D.I.P.; Maciel, M.R.W.; Maciel Filho, R. *Chem. Product. Process. Model.* 2008, 3, 1-14.
- Mehta, G.D.; Fraser, M.D. *Ibi.* 1985, 24, 556-560.
- Miranda, E.E.; Dourado, A.J.; Assunção, J.V. *Doenças respiratórias crônicas em quatro municípios paulistas (Chronic respiratory disease in four São Paulo municipalities)*. Ecoforça: São Paulo - SP, 1994.
- Monbouquette, H. G. *Biotechnol. Bioeng.* 1992, 39, 498-503.
- Morin-Couallier, E.; Fargues, C.; Lewandowski, R.; Decloux, M.; Lameloise, M. *J. Clean.Prod.* 2008; 16, 655-663.
- Navarro, A.R.; Sepúlveda, M. del C.; Rubio, M.C. *Waste manag.* 2000, 20, 581-585.
- Nakao, S.; Saitoh, F.; Asakura, T.; Toda, K.; Kimura, S. *J. Membr. Sci.* 1987, 34, 273.
- Nomura, M.; Bin, T.; Nakao, S. *Sep.Purif. Technol.* 2002, 27, 59-66.
- Offeman R.D.; Stephenson, S.K.; Franqui, D.; Cline, J.L. *Sep.Purif. Technol.* 2008, 63, 444-451.
- Phisalaphong, M.; Srirattana, N.; Tanthapanichakoon, W. *Biochem. Eng. J.* 2005, 28, 36-43.
- Phowchinda, O.; Strehaiano, P. *Thammasat Int J Sci Technol.* 1999, 4,2.
- Rahman, M.A.; Rahman, M.S.; Asadullah, M. *Indian J. Chem.Technol.* 1995, 2, 90-92.
- Rosillo-Calle, F.; Bajay, S.V.; Rothman, H. (2000). *The use of biomass for energy production in Brazilian industries. (in Portuguese)*; Editora Unicamp: Campinas, SP, 2000; Vol. 1, pp 25-67.
- Taylor, F.; Kiurantz, M. J.; Goldberg, N.; Craig, J.C. *Biotechnol. Bioeng.* 1996, 51, 33-39.
- Wang, Y.; Achenie, L.E.K. *Fluid Phase Equilibria.* 2002, 201, 1-18.

CAPÍTULO 4

ARTIGO: STUDY OF KINETIC PARAMETERS IN A MECHANISTIC MODEL FOR BIOETHANOL PRODUCTION THROUGH A SCREENING TECHNIQUE AND OPTIMIZATION

Neste capítulo é mostrado um artigo publicado na revista *Bioprocess & Biosystems Engineering* que desenvolve uma metodologia para determinação dos parâmetros cinéticos mais sensíveis no modelo matemático de fermentação alcoólica de forma que apenas estes parâmetros sejam re-estimados quando ocorrerem mudanças nas condições operacionais.

Trabalho publicado na revista **Bioprocess & Biosystems Engineering**, 2009. v. 32-5, p. 673-680. Rafael Ramos de Andrade, Elmer Ccopa Rivera, Daniel I. P. Atala, Rubens Maciel Filho, Francisco Maugeri Filho and Aline C. Costa.

Study of kinetic parameters in a mechanistic model for bioethanol production through a screening technique and optimization

Rafael Ramos de Andrade · Elmer Ccopa Rivera ·
Daniel I. P. Atala · Rubens Maciel Filho ·
Francisco Maugeri Filho · Aline C. Costa

Received: 4 September 2008 / Accepted: 13 December 2008 / Published online: 6 January 2009
© Springer-Verlag 2008

Abstract The accurate description of the kinetics and robust modeling of biotechnological processes can only be achieved by incorporating reliable methodologies to easily update the model when there are changes in operational conditions. The purpose of this work is to provide a systematic approach with which to perform model parameters screening and updating in biotechnological processes. Batch experiments are performed to develop a mechanistic model, considering the effect of temperature on the kinetics, and further experiments (batch fermentations using sugar cane molasses from a different harvest) are used to validate the effectiveness of screening before parameters updating. The reduction in the number of kinetic parameters to be re-estimated enabled by the screening procedure reduces significantly the complexity of the optimization, which makes the updating procedure to be significantly quicker, while resulting in accurate performance of the updated model.

Keywords Bioreactors · Modeling · Optimization · Parameter estimation · Plackett–Burman design

List of symbols

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

Introduction

Nowadays, attention has been directed to the use of biomass for energy production on account of the depletion of fossil resources. Bioethanol (ethanol from biomass) seems to be the most promising alternative energy source to be used as a fuel and provides an option that is immediate and practicable without the necessity of permanent subsidies and trade barriers [1]. Nevertheless, although the bioethanol production is running for several years, improvements are required to increase process performance.

R. R. de Andrade (✉) · E. C. Rivera · R. M. Filho ·
A. C. Costa (✉)
School of Chemical Engineering,
University of Campinas, P.O. Box 6066,
13083-970 Campinas, SP, Brazil
e-mail: rafaelra@feq.unicamp.br

A. C. Costa
e-mail: accosta@feq.unicamp.br

D. I. P. Atala · F. M. Filho
School of Food Engineering, University of Campinas,
P.O. Box 6121, 13081-970 Campinas, SP, Brazil

The lack of robustness of the fermentation in the presence of fluctuations in the quality of the raw material and variations of dominant yeast in the process are among the main current problems related to the alcoholic fermentation process.

Some authors like Phowchinda and Strehaiano [2] have discussed that changes on composition of raw material occur due to the difference in maturity and variety of the cropping and also the post-harvest cultivation of raw materials. They investigated the kinetics and consumption of different sugars by *Saccharomyces cerevisiae* and have shown that the sucrose consumption rate is lower compared with glucose and fructose, and the hydrolysis activity of sucrose by *S. cerevisiae* is inhibited when the media is rich in glucose (catabolic repression by glucose). Taking into account the sugar composition frequently changes in the molasses, the overall kinetic rate is influenced by this phenomena in fermentative processes.

Also, temperature has a strong influence on the process, because it is usually difficult to support a constant temperature during large-scale alcoholic fermentation [3] and it affects productivity as well as microorganism viability (cell activities have minimum and maximum values in different temperatures) [4, 5].

Owing to the difficulties described above, the main challenge in model-based techniques for definition of operational strategies, control and optimization for biotechnological processes is the problem of obtaining an accurate model which can be updated easily to aid in the decision making.

As the number of parameters is directly related to the cost of performing an optimization study, a crucial point in model-based optimization techniques is the screening of significant variables. This statement is especially applicable to the field of modeling of biotechnological processes, because their operation involves microbial growth under constantly changing conditions.

In previous works mechanistic models considering the influence of temperature on the processes kinetics were proposed [6–8]. An important feature of these models is that they use equations correlating the kinetic parameters with temperature, which is important for robust modeling due to the difficulty in maintaining constant temperature in industrial ethanol fermentations.

Even when a mechanistic model is already proposed for the process, changes in operational conditions require periodical updating of kinetic parameters [7]. The updating problem consists in the minimization of some performance index written as a function of the parameters to be re-estimated. In order to obtain good model performance, all possible parameters whose changes influence the kinetic behavior of the process should be considered.

As different parameters are expected to have different contributions or sensitivities in allowable optimization regions, it would be advantageous to have an automated screening technique available that would reduce the parameter set such that only significant parameters become optimization variables.

A reliable technique is the Plackett–Burman screening design [9], which can identify among large numbers of possible input variables (factors) the ones that are significant for the desired response. In this work Plackett–Burman designs are used to select the most significant kinetic parameters in a mechanistic model for the ethanol fermentation process, and these parameters are re-estimated using a quasi-Newton algorithm to account for changes in operational conditions (variations in the quality of the raw material). The updated model is shown to present good performance in describing new experiments.

Materials and methods

Experiments

Experiments used to develop and validate the mechanistic model

Five batch experiments in the temperature range of 30–38 °C were used to estimate the kinetic parameters as functions of temperature in a mechanistic model, and a sixth fermentation at 34 °C was considered for validation. Details of these experiments are described elsewhere [8].

Experiment with changes in operational conditions

Three experiments were used to validate the effectiveness of screening when there are changes in operational conditions and quality of raw material. The first and second experiments, both as batch fermentations at temperature of 34 °C and initial biomass, substrate and ethanol concentrations of 1.6, 242, 0.6 kg/m³, respectively, and 0.7, 131.221, 8.424 kg/m³ were carried out using an industrial strain of *S. cerevisiae* cultivated in the Bioprocess Engineering Laboratory in the Faculty of Food Engineering, State University of Campinas, Brazil. The growth medium for inoculum, materials and analytical methods are the same as described in Andrade et al. [8]. The sugar cane molasses used, however, was from two different harvesting periods than the molasses used in the experiments performed to develop the mechanistic model.

A third experiment was performed at 36.8 °C, and initial biomass, substrate and ethanol concentrations of 0.29, 132.924 and 0.0 kg/m³, respectively. The sugar cane

molasses used in the fermentation, after being stored for a long period of time at relatively high environmental temperatures (25–35 °C), was inverted, presenting only glucose and fructose in its composition, with absence of sucrose, which has a great influence on the profiles of substrate, biomass and ethanol.

The results of these three fermentations were used to evaluate the screening tool for parameter re-estimation.

For all experiments, cell viability was counted with the methylene blue staining technique [10] and presented values next to 100%, due to the short period of cultivation in batch processes.

Mathematical modeling

The mechanistic model for batch mode is constituted of ordinary differential equations (Eqs. 1–3) derived from mass balance on the reactor, including the kinetic rates that describe microorganism growth, ethanol formation and substrate consumption (Eqs. 4–6). Details of the methodology for the calculation of the kinetic parameters as a function of temperature can be found in Andrade et al. [8].

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

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

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

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

$$r_P = Y_{PX} r_X + m_P X \quad (5)$$

$$r_S = (r_X / Y_X) + m_X X. \quad (6)$$

For batch mode, cell death is not taken into account due to the short time of cultivation.

The temperature-dependent parameters $\mu_{\max}$, $X_{\max}$, $P_{\max}$, Y_X and Y_{PX} are given by Eq. 7 with the constants (A , B , C , and D) determined by Andrade et al. [8].

Temperature – dependent parameter

$$= A \exp\left(\frac{B}{T}\right) + C \exp\left(\frac{D}{T}\right). \quad (7)$$

In this equation T is the temperature in °C.

The parameters which are not temperature-dependent are fixed in the values given by Atala et al. [3] as follow: $K_s = 4.1 \text{ kg/m}^3$, $K_i = 0.002 \text{ m}^3/\text{kg}$, $m_P = 0.1 \text{ kg}/(\text{kg h})$, $m_X = 0.2 \text{ kg}/(\text{kg h})$, $m = 1.0$ and $n = 1.5$, except K_i that was better fitted at $0.004 \text{ m}^3/\text{kg}$ for the molasses used for parameter estimation in mechanistic model [8].

Screening of significant parameters

The influence of the 11 kinetic parameters of the mechanistic model on the kinetic behavior of the ethanol fermentation was assessed using PB design. The Plackett–Burman sensitivity analysis presents several advantages over one-at-a-time sensitivity analysis methods, where all parameters significances are individually evaluated. Among them, in Plackett–Burman, the effect of parameters on the model is calculated considering average variations in remaining parameters, instead of fixing them at given values [11]. Thus, in Plackett–Burman, all parameters are simultaneously investigated, which makes this technique more efficient and avoids loss of information [12].

Also, Plackett–Burman technique allows the parameters investigation with the same accuracy as if each value was varied individually [9], and it is not limited to a specific type of model. As an additional and remarkable characteristic of Plackett–Burman sensitivity analysis is the range of each parameter required does not need to be limited to the same variation percentage, as occurs in one-at-a-time sensitivity analysis, but its range can be limited and defined by the modeler, allowing a more suitable choice subjected to intervals with physical meaning for each particular parameter that governs the phenomena [11].

This Plackett–Burman sensitivity analysis technique allows to test up to $N - 1$ factors in N trials, where N is a multiple of 4 [9]. When the number of examined factors is smaller than $N - 1$, the design is completed with dummy variables, which enables the calculation of the standard error for the factors.

The responses chosen to represent the kinetic behavior were the product and biomass concentrations (P and X) at the end of a batch fermentation, as well as the fermentation time (t). Final substrate concentration was not used as a response because all the fermentations were performed until all the substrate was depleted.

The parameters of the mechanistic model developed by Andrade et al. [8] at 34 °C were varied at two levels, high (+) and low (–), according to Table 1. A PB design with 20 trials was used, so the calculations were performed with 8 degrees of freedom and the 8 dummy variables (d_n) were used for standard error estimation.

A total of 20 simulations of batch fermentations were performed using the kinetic parameters in the values corresponding to Plackett–Burman matrix. The values of final ethanol and biomass concentrations and of fermentation time were obtained and used as responses in the PB design. Initial conditions of concentrations of substrate, product and biomass were fixed at 119, 3.90 and 0.70 kg/m^3 , respectively.

The effects were calculated using the software Statistica 7.0 (Statsoft).

Table 1 Low and high setting for the parameters used in PB design

Parameter	Level		
	(–)	Nominal (0) ^a	(+)
$\mu_{\max}$	0.35	0.39	0.43
$X_{\max}$	38.7	43.0	47.3
$P_{\max}$	67.5	75.0	82.5
Y_x	0.036	0.04	0.044
Y_{px}	8.94	9.93	10.92
K_s	3.69	4.10	4.51
K_i	0.0036	0.004	0.0044
m_x	0.18	0.20	0.22
m	0.90	1.00	1.10
n	1.35	1.50	1.65
m_p	0.09	0.10	0.11

^a Parameters at 34 °C (Andrade et al. 2007)

Optimization of screened parameters using the quasi-Newton algorithm and re-estimation technique

The simultaneous estimation of the kinetic parameters selected by the PB design is carried out using the quasi-Newton algorithm. The optimization is performed by minimizing Eq. 8 with the more significant parameters as optimization variables, whereas all other parameters remain fixed. The IMSL FORTRAN subroutine DBCONF was used for this purpose.

$$E(\theta) = \sum_{n=1}^{np} \left[\frac{(X_n - X_{e_n})^2}{X_{e_{\max}}^2} + \frac{(S_n - S_{e_n})^2}{S_{e_{\max}}^2} + \frac{(P_n - P_{e_n})^2}{P_{e_{\max}}^2} \right] \quad (8)$$

$$= \sum_{n=1}^{np} e_n(\theta).$$

The optimization is carried out using the experimental data from batch fermentations described in Sect. 2.1.2. θ specifies the parameters vector, which contains all the significant kinetic parameters. X_{e_n} , S_{e_n} and P_{e_n} are the measured concentrations of cell mass, substrate and ethanol at the sampling time n . X_n , S_n and P_n are the concentrations computed by the mechanistic model at the sampling time n . $X_{e_{\max}}$, $S_{e_{\max}}$ and $P_{e_{\max}}$ are the maximum measured concentrations and the term np is the number of sampling points. Here $e_n(\theta)$ is the error in the output due to the n th sample.

Applying quasi-Newton method associated to the model described in Sect. 2.2, the experience proved to be impossible to perform an overall estimation (all 11 parameters simultaneously) on account of the convergence problems. Those are ascribed to the non-linearity of the kinetic model, large number and interactions among parameters. In order to solve this drawback, the kinetic

parameters were divided into two groups, the non-significant and the significant ones using PB screening, which also leads to less time consumption in the re-estimation procedure under changes in raw material. A similar procedure was recently adopted by Franceschini et al. [13] to overcome convergence problems in non-linear kinetic modeling.

The parameter re-estimation methodology involves the following steps, as depicted in Fig. 1 and explained as follows:

- obtaining 11 kinetic parameters from the proposed model described in Andrade et al. [8], considering the temperature range;
- choosing the i non-relevant parameters obtained by PB screening to be fixed in the estimation procedure;
- defining the upper and lower bound (constraints) for each relevant parameters ($\mu_{\max}$, $P_{\max}$, Y_x and Y_{px}) considering the commonly used range found in the literature. The physical meaning must be taken into account;
- collecting new experimental data from industrial plant (profiles of X , S and P) in each harvesting;

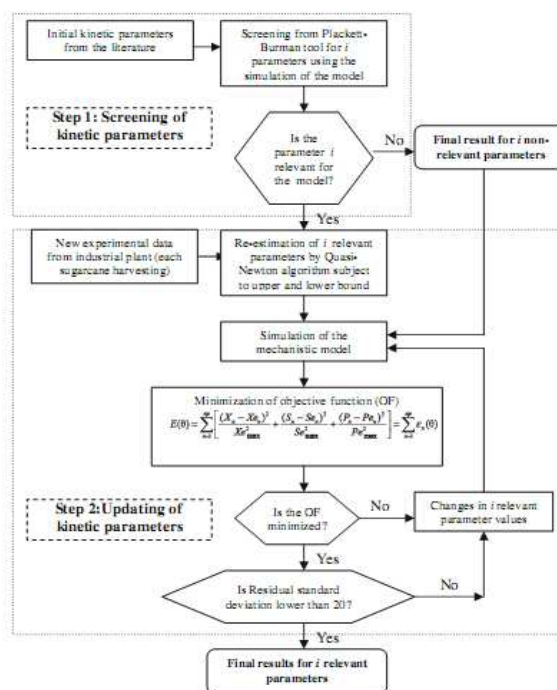


Fig. 1 General framework for the screening and parameter re-estimation methodology for batch processes under changes in operational conditions

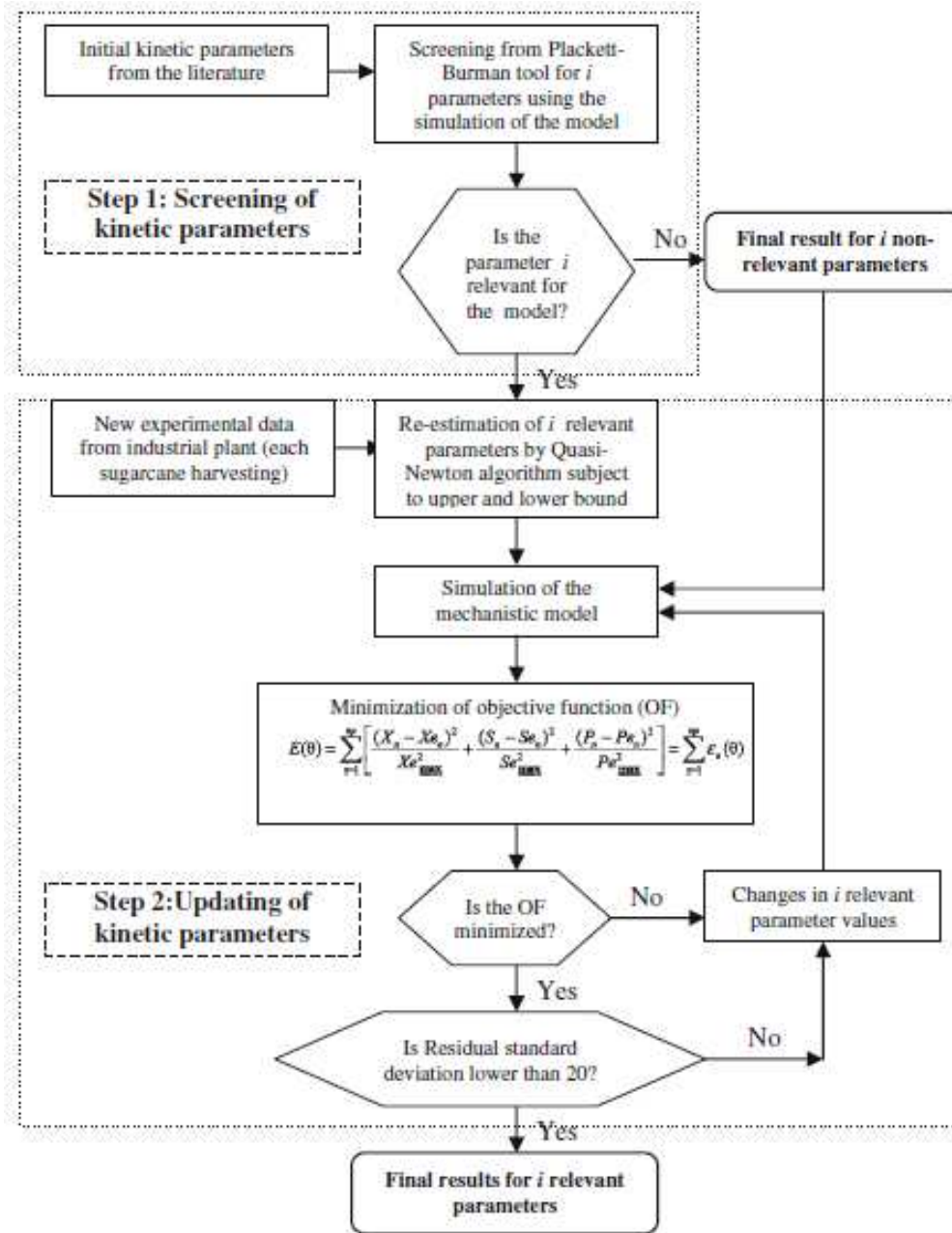


Fig. 1 General framework for the screening and parameter re-estimation methodology for batch processes under changes in operational conditions

- optimizing the significant parameter values by quasi-Newton algorithm, minimizing the objective function (OF);
- checking the model adequacy by the calculation of residual standard deviation, RSD;
- step 2 in the procedure must be repeated when a satisfactory degree of precision in the model predictions is not achieved (each cane harvesting).

Results and discussion

Plackett–Burman design

The effects of the 11 kinetic parameters on fermentation time, t , final product concentration, P , and final biomass concentration, X , are given in Tables 2, 3 and 4. The significant parameters (with 95% of confidence) are marked in bold. Although we use P value analysis to evaluate the significance of the effects (effects with P level ≤ 0.05 are considered significant), in a simulation work the P value has no physical meaning, as there are no experimental random errors involved.

According to Tables 2, 3 and 4, $P_{\max}$, Y_x and Y_{px} were significant for all the responses considered, $\mu_{\max}$ and n were only statistically significant for the fermentation time, t , and m_x and m_p were only significant for the final product concentration, P . So, there are seven significant parameters and four non-significant parameters ($X_{\max}$, K_s , K_i and m).

Among the parameters that influences only one response ($\mu_{\max}$, n , m_x and m_p), $\mu_{\max}$ presents the largest effect, as can be seen in Tables 2, 3 and 4. This parameter and the three parameters that influence all the considered responses ($P_{\max}$, Y_x and Y_{px}) were chosen to be updated.

Table 2 Effects of the kinetic parameters on fermentation time, PB design

Factor	Effect	Standard error	P value
Mean	16.1465*	0.3470*	0.0000*
$\mu_{\max}$	-2.1610*	0.6940*	0.0144*
$X_{\max}$	-0.1270	0.6940	0.8593
$P_{\max}$	-3.7370*	0.6940*	0.0006*
Y_x	3.8330*	0.6940*	0.0005*
Y_{px}	3.6630*	0.6940*	0.0007*
K_s	-0.1730	0.6940	0.8094
K_i	1.0650	0.6940	0.1634
m_x	0.6730	0.6940	0.3606
m	-0.0870	0.6940	0.9033
n	1.7430*	0.6940*	0.0363*
m_p	-0.0570	0.6940	0.9366

* Significant for a 95% confidence level

Table 3 Effects of the kinetic parameters on final product concentration, PB design

Factor	Effect	Standard error	P value
Mean	51.4433*	0.0781*	0.0000*
$\mu_{\max}$	0.1400	0.1562	0.3962
$X_{\max}$	0.0241	0.1562	0.8809
$P_{\max}$	-0.4875*	0.1562*	0.0142*
Y_x	9.0418*	0.1562*	0.0000*
Y_{px}	8.9003*	0.1562*	0.0000*
K_s	-0.1873	0.1562	0.2651
K_i	-0.1861	0.1562	0.2679
m_x	-0.8816*	0.1562*	0.0005*
m	-0.1092	0.1562	0.5044
n	-0.1195	0.1562	0.4665
m_p	1.0309*	0.1562*	0.0002*

* Significant for a 95% confidence level

Table 4 Effects of kinetic parameters on final biomass concentration, PB design

Factor	Effect	Standard error	P value
Mean	5.0130*	0.0132*	0.0000*
$\mu_{\max}$	0.0464	0.0265	0.1177
$X_{\max}$	-0.0094	0.0265	0.7299
$P_{\max}$	0.1193*	0.0265*	0.0019*
Y_x	0.7058*	0.0265*	0.0000*
Y_{px}	-0.1133*	0.0265*	0.0027*
K_s	0.0096	0.0265	0.7256
K_i	-0.0306	0.0265	0.2808
m_x	-0.0422	0.0265	0.1493
m	0.0185	0.0265	0.5040
n	-0.037918	0.0265	0.1901
m_p	-0.0093	0.0265	0.7326

* Significant for a 95% confidence level

Re-estimation of parameters from batch experimental data

A batch experiment performed at 34 °C was considered to assess the performance of the model detailed in Sect. 2. The operational differences of this experiment when compared to the ones performed by Andrade et al. [8] and used to estimate the kinetic parameters are the molasses origin (molasses from a different harvesting) and the medium composition. Such changes occur frequently in industrial fermentation plants, and this reinforces the importance of kinetic parameters updating. It can be noticed from Fig. 2a that the prediction quality is poor for the batch experimental data without re-estimation.

For the updating of the kinetic parameters, the less significant parameters were maintained fixed in the values

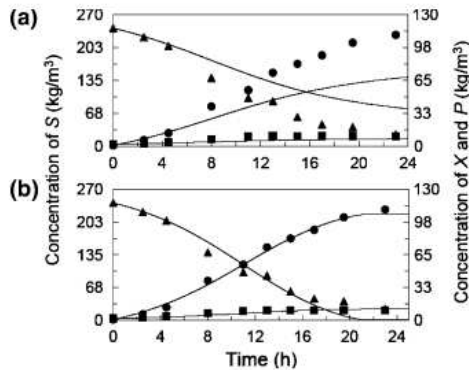


Fig. 2 Batch experimental data [cell mass, X (filled squares); substrate (total reducing sugars), S (filled triangles) and ethanol, P (filled circles)] and modeling (mechanistic model, continuous line) at 34 °C and initial substrate concentration of 242.18 kg/m³. **a** Simulation without parameters re-estimation. **b** Simulations with parameters re-estimation

determined by Andrade et al. [8] and only the four most significant parameters ($\mu_{\max}$, $P_{\max}$, Y_x and Y_{px}) were re-estimated. The re-estimation problem implies that the most significant parameters are evaluated in a subregion of the optimization space that successively moves toward the minimum of Eq. 8 by using a quasi-Newton algorithm. After optimization, the calculated values were $\mu_{\max} = 0.43$, $P_{\max} = 126$, $Y_x = 0.043$ and $Y_{px} = 9.78$. The performance of the mechanistic model with re-estimated parameters in describing the batch experimental data is shown in Fig. 2b.

The RSD [3], Eq. 9, written as a percentage of the average of the experimental values, $\bar{d}_k$, was used for measuring the prediction quality of the updated mechanistic model.

$$\text{RSD}(\%) = \frac{\left(\frac{1}{n} \left(\sum_{k=1}^n (d_k - g_k)^2 \right)^{0.5} \right)}{\bar{d}_k} \times 100 \quad (9)$$

where d_k is the experimental observation, g_k is the value predicted by the mechanistic model and n is the number of points. In Table 5 the RSD(%) values for the model with parameters re-estimation is depicted. It can be seen that, although the re-estimation is carried out using only 4 parameters of a total of 11, it is possible to obtain an updated model that describes accurately the batch experimental data for a different experimental condition from that established initially.

The prediction of experimental data for batch cultivation after re-estimation of four parameters was also evaluated in case of inverted molasses (absence of sucrose) as a culture media in a fermentation at 36.8 °C. The simulation of the original model shows (Fig. 3a) that it has poor performance

Table 5 Residual standard deviation (RSD) written as a percentage of average of experimental values, used to characterize the prediction quality of the mechanistic model with parameters re-estimation in the presence of changes in operational conditions

Output variable	Batch experiment ($T = 34$ °C)		Batch experiment ($T = 36.8$ °C)	
	Without re-estimation	With re-estimation	Without re-estimation	With re-estimation
X	39.7	17.4	13.3	9.1
S	36.1	13.2	8.3	10.2
P	45.3	4.8	37.8	7.5

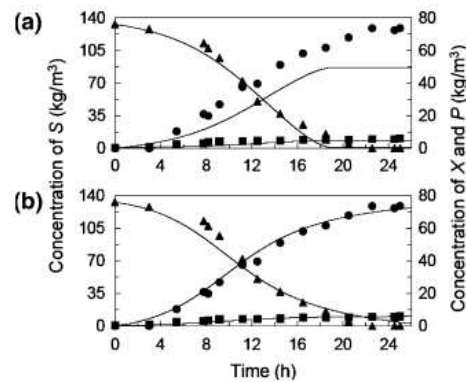


Fig. 3 Batch experimental data with inverted sugar cane molasses [cell mass, X (filled squares); substrate (total reducing sugars), S (filled triangles) and ethanol, P (filled circles)] and modeling (mechanistic model, continuous line) at 36.8 °C. **a** Simulation without parameters re-estimation. **b** Simulations with parameters re-estimation

in describing the ethanol profile. However, after the updating of the four parameters screened by PB technique, a model with high quality of prediction is obtained, as shown in Fig. 3b. The RSD(%) values are presented in Table 5 at a maximum of 10.2%, and new re-estimated parameters are $\mu_{\max} = 0.52/\text{h}$, $P_{\max} = 76 \text{ kg/m}^3$, $Y_x = 0.0509$ and $Y_{px} = 11.1436$.

A third batch run at 34 °C was performed to evaluate the necessity of the screening technique for parameter estimation for different molasses. Figure 4a presents the simulation without parameter re-estimation. It can be seen that, although the overall fermentation profiles are well predicted by the model without parameter re-estimation, the model predicts that the batch run finishes at 20 h with ethanol concentration of 60.41 kg/m³, but experimentally it occurs at 24 h and 74.54 kg/m³. Also, the substrate consumption predicted by the model at the end of fermentation is faster than the experimental results. From Fig. 4b it can

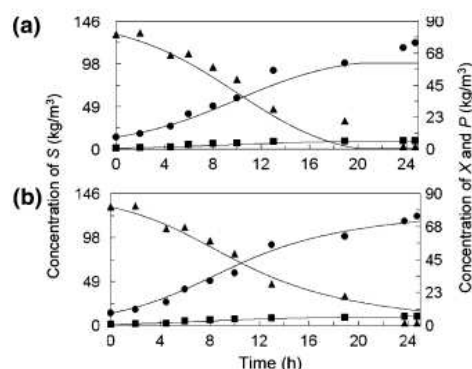


Fig. 4 Batch experimental data [cell mass, X (filled squares); substrate (total reducing sugars), S (filled triangles) and ethanol, P (filled circles)] and modeling (mechanistic model, continuous line) at 34 °C and initial substrate concentration of 131.22 kg/m³, using different molasses. **a** Simulation without parameters re-estimation. **b** Simulations with parameters re-estimation

be noticed that the experimental data are better represented by the model with re-estimation of four parameters ($\mu_{\max} = 0.4674/\text{h}$, $P_{\max} = 75 \text{ kg/m}^3$, $Y_x = 0.054 \text{ kg/m}^3$ and $Y_{px} = 10.07 \text{ kg/m}^3$). Parameters with minor significance were maintained fixed, and this reduction of the number of parameters to be re-estimated decreases significantly the time for this task, allowing more refinement in the quality of the model.

All the parameters obtained in the re-estimation procedure agree with the range published in the literature. Several values of parameter for alcoholic fermentation with distinct molasses and lineage can be found in the literature. Dourado et al. [14] cite that $\mu_{\max}$ can vary from 0.24 to 0.453/h in different works, and $P_{\max}$ values are in a range of 85–90 kg/m³. According to Andrietta et al. [15], $\mu_{\max}$ values vary from less than 0.45 to higher than 0.55/h. This shows that despite the large number of publications in the area, there is no consensus about kinetic parameter values, as they change with specific experimental conditions. This reinforces the necessity of an easier and quick tool for re-estimation.

Changes in kinetics occur due to several synergistic effects of pH, ethanol and acid concentrations, nitrogen source and presence of heavy metals in the molasses. It has been reported by Dorta et al. [16] that low pH in the broth increases the toxic effect of ethanol and organic acids on yeasts, with influence on kinetic parameters as alcoholic yield. In the particular case of this work, the difference in pH of initial molasses can be responsible for distinct results of Y_{px} under changes in raw material.

Another source of variation in synthesis of yeast biomass and kinetics is the nitrogen content in the medium, as reported by Torija et al. [17]. Lower levels of nitrogen in

the medium are responsible for lower fermentation rates and yeast growth. The variation in nitrogen source is not considered in the modeling, but this affects $\mu_{\max}$ values. In sugarcane must, ammoniacal nitrogen is the most commonly found nitrogen source and, according to Basso et al. [18], its concentration influences the sprouting and multiplication of yeasts.

Probably, the fermentations with higher specific growth rate are subjected to a higher concentration of nitrogen in the molasses and lower presence of heavy metals. Both variables are highly influenced by the industrial process conditions.

Concluding remarks

In industrial plants of ethanol production, in order to guarantee high productivity, yield and conversion of substrate to ethanol, the use of controllers and optimizers are important. A successful process control can be achieved through the use of suitable models capable of predicting process behavior for longer periods of operation, even in the presence of raw material fluctuations. A robust mathematical model can also be used for determination of new control structures when necessary, for process optimization and for simulating the impact of variables of interest as residence time, concentration of sugar, ethanol and biomass on yield, conversion and productivity.

The difficulty in modeling biotechnological processes is in the accurate description of the kinetics. Although many mechanistic mathematical models have been proposed to describe the alcoholic fermentation process, they are only valid in the conditions used for their development. Disturbances that occur frequently in the industrial environment, such as changes in raw material composition and/or dominant yeasts, among others, influence the kinetics of the fermentation and the pre-developed models often present poor performance. Thus, robust modeling can only be achieved by incorporating reliable procedures to easily update the model when there are changes in operational conditions.

The frequent re-estimation of kinetic parameters, however, is usually difficult and time consuming due to the non-linearity, great number of parameters and interactions among them, as well as the difficulty in attributing initial values in the estimation procedures. A screening methodology that selects the most significant parameters simplifies the re-estimation procedure, as it decreases the number of parameters to be updated, diminishing the complexity of the re-estimation.

The use of Plackett–Burman designs for the screening of the kinetic parameters was shown to be rapid and simple, requiring relatively few simulations even when a great

number of parameters are involved. This procedure can be applied for the ethanol fermentation or any other process. Then, the re-estimation of the most significant parameters can be performed always that operational changes affects the model performance.

The results of this work have shown that, for the ethanol fermentation process, the updating of 4 parameters in a total of 11 enabled the model to describe accurately experimental data even in the presence of changes in the operational conditions. It was also shown that the use of a non-updated mathematical model developed for other operational conditions led to unacceptable performance.

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

References

- Mathews JA (2007) *Energ Policy* 35:3550
- Phowchinda O, Strehaiano P (1999) *Thammasat Int J Sci Technol* 4:2
- Atala DIP, Costa AC, Maciel Filho R, Maugeri F (2001) *Appl Biochem Biotechnol* 91–93:353–366
- Dale MC, Chen C, Okos MR (1980) *Biotechnol Bioeng* 36:983–992
- Chang HN, Lee WG, Kin BS (1993) *Biotechnol Bioeng* 41:677
- Phisalaphong M, Srirattana N, Tanthapanichakoon W (2006) *Biochem Eng J* 28:36
- Rivera EC, Costa AC, Andrade RR, Atala DIP, Maugeri F, Maciel Filho R (2007) *Biochem Eng J* 36:157
- Andrade RR, Rivera EC, Costa AC, Atala DIP, Maugeri F, Maciel Filho R (2007) *Appl Biochem Biotechnol* 136–140:753
- Plackett RL, Burman JP (1946) *Biometrika* 33:305
- Yoshida N, Minamimura T, Ogawa K (1999) *J Biosci Bioeng* 88:342
- Beres DL, Hawkins DM (2001) *Ecol Model* 141:171
- Kennedy M, Krouse D (1999) *J Ind Microbiol Biotechnol* 23:456
- Franceschini G, Macchietto S (2007) *Ind Eng Chem Res* 46:220
- Dourado A, Goma G, Albuquerque U, Sevely Y (1987) *Biotechnol Bioeng* 29:187
- Andrietta SR, Migliari PC, Andrietta (1999) *Stab: Açúcar, Alcool e Subprodutos* 17:54
- Dorta P, Oliva-Neto MS, de-Abreu-Neto N, Nicolau Jr, Nagashima AI (2006) *World J Microbiol Biotechnol* 22: 177
- Torija MJ, Beltran G, Novo M, Poblet M, Rozès N, Guillamón JM, Mas A (2003) *Food Microbiol* 20:255
- Basso LC, Alves DMG, Amorin HV (1996) In: Amorin HV (ed) *Processes of ethanol production*. ESALQ/USP, Piracicaba

CAPÍTULO 5

ARTIGO: EVALUATION OF THE ALCOHOLIC FERMENTATION KINETICS OF ENZYMATIC HYDROLYSATES FROM SUGARCANE BAGASSE PRETREATED WITH ALKALINE HYDROGEN PEROXIDE.

Neste capítulo são mostrados os resultados de uma avaliação preliminar da cinética de fermentação alcoólica quando melaço é usado para concentrar o hidrolisado enzimático de bagaço de cana-de-açúcar durante a fermentação. A cinética quando hidrolisado puro é fermentado também é avaliada. É feita uma comparação dos parâmetros cinéticos com aqueles obtidos em um trabalho anterior para fermentação de melaço e conclui-se que há grande alteração nos parâmetros, justificando estudos mais detalhados para determinação da cinética de fermentação na presença de hidrolisado.

Trabalho submetido ao periódico **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. Rafael Ramos de Andrade, Sarita Cândida Rabelo, Francisco Maugeri Filho, Rubens Maciel Filho and Aline Carvalho da Costa.

1 EVALUATION OF THE ALCOHOLIC FERMENTATION KINETICS OF ENZYMATIC
2 HYDROLYSATES FROM SUGARCANE BAGASSE

3

4 Short Title: Evaluation of kinetics of hydrolysates fermentation

5

6 Rafael Ramos de Andrade^{1*}, Sarita Cândida Rabelo^{1, 2}, Francisco Maugeri Filho³, Rubens Maciel
7 Filho¹ and Aline Carvalho da Costa¹

8

9 ¹Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),
10 Caixa Postal 6066, 13083-970 Campinas, São Paulo, Brazil.

11 ²Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), Caixa Postal 6170, 13083-
12 970, Campinas, São Paulo, Brazil.

13 ³Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Caixa
14 Postal 6121, 13035-388, Campinas, São Paulo, Brazil.

15

16 *corresponding author. Tel: +55 1935213971 (R. R. Andrade)

17 e-mail address: rafaelra@feq.unicamp.br; rafaelfra20012001@yahoo.com.br (R. R. Andrade)

18

19

20

21

22

23

24

1 ABSTRACT

2
3 BACKGROUND: The efficient production of bioethanol by *Saccharomyces cerevisiae*
4 using lignocellulosic biomass as raw material depends on the fermentability of the
5 hydrolysates. In this work the evaluation of the kinetics of ethanol production by *S.*
6 *cerevisiae* using enzymatic hydrolysates was performed and compared to the kinetics of
7 diluted sugarcane molasses fermentation.

8
9 RESULTS: A term of inhibition by acetic acid was added to a previous model, the kinetic
10 parameters were re-estimated and the model has been shown to describe accurately new
11 experiments with distinct hydrolysates proportions as fermentative media. Among all the
12 kinetic parameters, a great reduction in μ_{max} (from 0.437 to 0.37 h^{-1} , at 34°C), and
13 increment in Y_{px} (from 9.89 to 16.63 g/g, at 34 °C) were noted, which highly impacted the
14 kinetics of fermentation.

15
16 CONCLUSIONS: The kinetic parameters obtained for hydrolysates differed drastically to
17 the obtained using molasses, which shows that models developed to describe the kinetics
18 of first generation ethanol production needs to be reformulated and adapted to describe
19 the kinetics of second generation ethanol fermentation. The productivities achieved were
20 between 1 - 3 $Kg/m^3.h$, which are considered acceptable for alcoholic fermentations in
21 batch mode, showing the good fermentability of hydrolysates even without
22 detoxification.

1 KEYWORDS: Alcoholic fermentation; sugarcane molasses; hydrolysates; modeling,
2 bioethanol, kinetics.

3

4 **INTRODUCTION**

5 Among the trends in the energy sector is the use of low cost lignocellulosic biomass as raw
6 material for bioethanol production. Considering bioethanol production from sugarcane, if
7 lignocellulose (from trash and bagasse) is used as raw material as well as sucrose there is an
8 important increase in the productivity per area of cultivated sugarcane.

9 Although the technology of bioethanol production from lignocellulosic biomass presents
10 great potential, it suffers limitations, among them the formation of inhibitors in the hydrolysate
11 broth during the pre-treatment process, with impacts on fermentation kinetics, ethanol yield and
12 productivity, affecting economically the productive process.¹

13 The presence of inhibitors varies with the raw material, type of pretreatment and
14 hydrolysis applied. If the pretreatment and hydrolysis are performed in severe conditions, such as
15 high temperature and acid concentrations for long reaction times, there is high inhibitors
16 formation.² Those result from degradation of lignin and sugar monomers formed in the reactional
17 media,³ or can be found in the raw material before pretreatment. The pentose and hexose
18 degradations lead to furfural and 5-hydroximetilfurfural (HMF), respectively, which impact on
19 the fermentation step.⁴ Furfural and 5-hydroximetilfurfural (HMF) inhibits growth rate and
20 bioethanol productivity in fermentations.⁵

21 The inhibitors from the hydrolysate broth present synergistic effect on *S. cerevisiae*
22 growth,³ and show higher impact when mixed, even in lower concentrations, than a single

1 component in the media. The inhibitory effect highly varies with *S. cerevisiae* lineage, inoculum
2 concentration, and can extend the lag phase from 4 to 24 hours or more.

3 Among the most common inhibitory components of microbial growth and bioethanol
4 formation are furfural, hydroximetilfurfural (HMF), weak acids and phenolic compounds. It is
5 believed that the presence of weak acids in the media at low concentrations can increase ethanol
6 yield when pH is around 5.5,² because these compounds stimulate the ATP (adenosine
7 triphosphate) production by the cells under anaerobic conditions.³ At high concentrations, the
8 acids, including acetic acid, act in the opposite direction, reducing the rate of microbial growth,
9 and consequently ethanol formation.

10 Acetic acid totally inhibits yeasts growth in a range of concentrations from 1.4 to 8 g/L,
11 depending on the microorganism lineage,⁶ furfural in a range of 0.5 -5.0 g/L, and HMF in a
12 minimum of 1 g/L for *S. cerevisiae*.³

13 The reduction of microbial growth for different lineages of *S. cerevisiae* as function of
14 furfural, HMF and acetic acid was widely studied in the literature and is shown in Table 1:

15

16 Table 1. Inhibition of growth in several strains of *S. cerevisiae*.

Inhibitor	Concentration (Kg/m ³)	Inhibition (%)	Reference
1	1.4	50 (pH=4.5)	24
1	4.3	50 (pH=5.5)	24
2	5.1	87	2
2	2.0	90	25
3	4.0	71	26
3	1.5	39	27

17 1. Acetic Acid, 2. Furfural, 3. Hydroximetilfurfural

4

1

2 As shown in Table 1, the inhibition of *S. cerevisiae* growth by acetic acid depends on pH
3 value. At the lower pH (4.5), acetic acid presents higher negative impact on growth due to the
4 predominant undissociated form of the acid, so the concentration of acetic acid that causes 50%
5 of inhibition is lower than when the fermentation is conducted at higher pH (5.5).

6 For furfural, inhibition of around 90 % of growth is observed even at low concentrations
7 of 2.0 and 5.1 kg/m³. Hydroxymethylfurfural resulted in a lower toxicity on yeasts, although it
8 presents higher inhibiting effect when mixed with the other components, due to the synergistic
9 effect. Also, the toxicities vary with the yeast lineages of *S. cerevisiae* used in experiment.³

10 Although exerting inhibition on yeasts even at small concentrations, furfural and HMF
11 can be metabolized by *S. cerevisiae* ⁶ in less toxic alcohols during the fermentation process,⁷ and
12 the inhibitory effect can disappear along the cultivation time.

13 Acetic acid presents high relevance for the bioethanol sector due to its potential inhibition
14 on the kinetics of fermentation by yeasts. Some authors, such as Narendranath *et al.*⁸, concluded
15 that acetic acid reduces the growth rate of yeasts even in low concentrations 0.05 – 0.1 % w/v.
16 Lower rates of glucose uptake and ethanol formation were observed as the acid concentration
17 increased in the medium.

18 The total biomass produced also decreased when acetic acid was added to the medium. The
19 reduction of cellular yield is explained in the work of Narendranath *et al.*⁸ by the fact that the
20 undissociated form of acetic acid in the medium diffuses through the cellular membrane,
21 penetrating and dissociating in the cytoplasm, acidifying it. In order to maintain the internal pH,
22 the cells utilizes ATP to pump H⁺ protons out of the membrane, and the part of ATP initially
23 used for cell growth is deviated to maintenance,⁹ resulting in lower cellular yield. Also, an
24 increment of the lag phase is related to the time spent by the yeasts to pump out H⁺ protons to

1 reach the minimum pH for cells growth. Acetic acid, even in low concentration, also destroys the
2 cell membrane, leading the yeasts to an elongated morphology.⁹

3 Taking into account the inhibitor potential presented by acetic acid, furfural and HMF,
4 which potentially affects the kinetics of alcoholic fermentation, this paper evaluates the
5 fermentability of a mixture hydrolysates-molasses for bioethanol production and, based on a
6 well-established kinetic model used by de Andrade *et al.*¹⁰, proposes parameters updating to
7 evaluate the kinetics of bioethanol formation by pure hydrolysates, and hydrolysate mixed with
8 molasses. Also, a term considering acetic acid inhibition was added to the expression of yeasts
9 growth to represent its inhibitory effect on the kinetics. In order to obtain the kinetics,
10 fermentations were performed using enzymatic hydrolysates obtained after alkaline hydrogen
11 peroxide pretreatment and enzymatic hydrolysis.

13 MATERIAL AND METHODS

15 Raw material

16 Sugarcane bagasse (*Saccharum officinarum*) from a single harvest was obtained from
17 Usina São Luiz-Dedini S/A sugar plant (Pirassununga/SP, Brazil). It was dried at 45 °C for 48 h,
18 left for 48 h at room temperature, put into plastic bags and kept in a storage room. The dry matter
19 content (DM) was approximately 95%.

21 Pretreatment with alkaline hydrogen peroxide

22 The pretreatment was performed with 4% dry matter (DM). A hydrogen peroxide solution
23 was prepared by dissolving 7.36% (v/v) of H₂O₂ in 100.0 mL distilled water and adjusting the

1 pH to 11.5 with sodium hydroxide. The flasks were incubated in an orbital shaker MA-832
2 (Marconi, Piracicaba, SP, Brazil), agitated at 150 rpm, at 25°C for 1 h.¹¹⁻¹²

3

4 **Enzymatic hydrolysis**

5 Enzymatic hydrolysis of the washed material was performed using a substrate
6 concentration of 3.0% (w/w) WIS (water-insoluble solids) in flasks incubated in an orbital
7 shaker MA-832 (Marconi, Piracicaba, SP, Brazil) agitated at 100 rpm at 50°C. The pH was
8 adjusted to 4.8 with 0.05 mol/L sodium citrate buffer.

9 Cellulase from *T. reesei* (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA.) was added at
10 a concentration corresponding to 3.5 FPU/g WIS and β -glucosidase from *Aspergillus niger*
11 (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) was added at a concentration corresponding
12 to 25 CBU/g WIS.¹³ The same authors optimized the enzyme load to achieve the higher
13 conversion of the cellulose content into glucose of the pretreated biomass. More details about
14 pretreatment and hydrolysis are also described in Rabelo *et al.*¹¹

15 Cellulase activity was determined as filter paper units per milliliter, as recommended by
16 the International Union of Pure and Applied Chemistry.¹⁴ β -glucosidase activity was determined
17 through a solution of cellobiose 15 mmol/L and expressed in units per milliliter (CBU/mL).¹⁵
18 Enzyme activity was 47.44 FPU/mL for cellulases and 343.63 CBU/mL for β -glucosidase.

19

20 **Fed-batch enzymatic hydrolysis**

21 In order to obtain high glucose concentrations for the fermentations performed with pure
22 hydrolysates, hydrolysis was performed in fed-batch mode. Hydrolysis initiated with the
23 maximum pretreated bagasse concentration attainable and this concentration was doubled by
24 bagasse and enzymes feeding at two reactional times. The hydrolysis started with 5.0% (w/w)

1 WIS in flasks incubated in an orbital shaker MA-832 (Marconi, Piracicaba, SP, Brazil) agitated
2 at 100 rpm at 50°C. The pH was adjusted to 4.8 with 0.05 mol/L sodium citrate buffer. Cellulase
3 and β -glucosidase were added at a concentration corresponding to 3.5 FPU/g WIS and 25 CBU/g
4 WIS, respectively.¹³

5 After 6 and 12 h of reaction, 2.5 g of pretreated bagasse and the amount of enzymes to
6 maintain enzymatic loads of 3.5 FPU/g WIS and 25 CBU/g WIS were added. The total solids
7 concentration reached 10% WIS and the reaction lasted 96 h for total conversion of the cellulosic
8 material. A solution of 57.74 g/L of glucose was obtained and posteriorly used in fermentation to
9 evaluate the kinetics of ethanol production when using pure hydrolysates as culture media.

10 **Fermentations**

11 Hydrolysate concentrated with molasses was used for fermentations in batch mode, and
12 were performed in bioreactors Bioflo III (New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ) with 1
13 L of working volume, stirred by two flat blade turbines, with six blades each, at 300 rpm. The
14 microorganism used was an industrial strain of *S. cerevisiae* provided by Santa Adélia ethanol
15 plant, SP, Brazil. The hydrolysate (containing 23.872 g/L of glucose) was mixed to molasses
16 solution with 77 % of reducing sugars (proportions in reducing sugar: 91.74% of sucrose, 4.13 %
17 of glucose and 4.13 % of fructose) to reach the concentrations presented in Table 2. The
18 resulting cultivation media was a mixed solution of sugarcane molasses and hydrolysate broth
19 composed by 66.67 % (v/v) of hydrolysate, 22.22 % of molasses solution, and 11.11 % of
20 inoculum. The initial substrate concentration (sum of sucrose, glucose and fructose), the
21 inhibitors (acetic acid, furfural and HMF) in cultivation media, as well as the temperature for the
22 assays in batch mode are shown in Table 2. It can be seen that using alkaline peroxide
23 pretreatment and enzymatic hydrolysis, both occurring in mild conditions of pH and temperature,
24 there is practically no formation of furfural and HMF.

1 Table 2. Temperature, initial substrate concentration, acetic acid, furfural and HMF in batch
2 mode

Exp.	$T (^{\circ}C)$	$S_0 (g/L)$	$C_{Ac} (g/L)$	$C_F (g/L)$	$C_{HMF} (g/L)$
1	30.0	122.628	0.936	0	0
2	32.0	135.332	1.860	0.036	0.084
3	34.0	125.894	1.560	0.036	0.048

3
4 The media composition for inoculum growth was 50 kg/m³ of glucose, 5 kg/m³ of
5 KH₂PO₄, 1.5 kg/m³ of NH₄Cl, 0.7 kg/m³ of MgSO₄·7H₂O, 1.2 kg/m³ of KCl, and 5 kg/m³ of
6 yeast extract. The inoculum growth was performed in erlenmeyer's flasks maintained in a shaker
7 at 30° C and 150 rpm for 24 hours. Prior to fermentation, the molasses sterilization was
8 performed in an autoclave Phoenix (Araraquara, SP, Brazil) at 121°C for 20 minutes. The
9 hydrolysate broth was cold sterilized using a sterile system of membrane filtration after
10 centrifuging (Sorvall centrifuge) at 8000 rpm (15,810 g) for 20 minutes. The cellulose ester
11 material membrane was 0.2 µm pore diameter, as used by Yu and Stahl.¹⁶ A pipeline of
12 compressed air was connected to the system to increase the permeate flux and avoid loss of
13 volatile components.

14 *Pure hydrolysate*

15 Hydrolysate obtained by fed-batch enzymatic hydrolysis of pretreated sugarcane bagasse was
16 used for ethanol fermentation. The temperature was of 34°C, and the concentrations of sugars
17 and inhibitors are shown in Table 3.

18

1 Table 3. Concentration of sugars, furfural, hydroximetilfurfural and acetic acid in pure
2 hydrolysates

Component	Concentration (Kg/m ³)
Celobiose	*
glucose	57.74
xylose	8.94
arabinose	6.44
furfural	*
hydroximetilfurfural	0.012
acetic acid	2.96

3 *Values below the limit of quantification

4

5 Analytical Methodology

6 Yeasts concentrations were gravimetrically determined, after centrifuging the media for 15
7 minutes at 3300 rpm, washing and drying the precipitate in an oven at 70°C.

8 The supernatant was used for determination of sugar (sucrose, glucose, fructose and
9 xylose), acetic acid, ethanol, furfural and hydroximetilfurfural concentrations in a high-
10 performance liquid chromatograph Varian model 9010 (Varian Inc. Scientific Instruments, Palo
11 Alto, CA). For sugar, acids and ethanol separation, an Aminex HPX-87-H column (Bio-Rad
12 Laboratories Inc., Hercules, CA) at 30°C and eluent flow of 0.6 mL/min (degassed and ultrapure
13 water with pH adjusted to 1.4 with H₂SO₄) and refraction index detector was used. Furfural and
14 hydroximetilfurfural were separated by a Nova-Pak C18 column (Waters Co., Milford, MA),
15 with an eluent flow of 0.8 mL/min. (acetonitrile/ water 1:8) and detected by UV at wavelength of
16 276 nm.

10

1 Mathematical modeling

2 For batch mode, the mass balance equations that describe cell, substrate and ethanol
3 concentrations are given by:

$$4 \quad \frac{dX}{dt} = r_x \quad (1)$$

$$5 \quad \frac{dS}{dt} = -r_s \quad (2)$$

$$6 \quad \frac{dP}{dt} = r_p \quad (3)$$

7 The kinetics of cell death was not considered because there was 100 % of cell viability.

8 For fermentations of *S. cerevisiae* using sugarcane molasses, experimental data have
9 shown the inhibition by high substrate, ethanol and cell concentrations are important aspects to
10 be considered in the phenomenological model.¹⁰ The term of ethanol inhibition considers the
11 complete cessation of ethanol formation.¹⁷

12 The growth rate expression used by de Andrade *et al.*¹⁰ is given by Eq. 4, which considers
13 the substrate (*S*) as limiting yeast growth, and ethanol (*P*) and cell concentration (*X*) as
14 inhibitors:

$$15 \quad r_x = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \exp(-K_i S) \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right)^m \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)^n X \quad (4)$$

16 Luedking-Piret expression (Eq. 5) was used to represent the ethanol formation rate, which
17 is proportional to the existing biomass concentration (*X*) and to the rate of microbial growth (*r_x*):

$$18 \quad r_p = Y_{px} r_x + m_p X \quad (5)$$

19 The rate of substrate consumption is given by Eq. 6:

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

More details about the model and parameters are described in de Andrade *et al.*¹⁰ The kinetic parameters obtained by de Andrade *et al.*¹⁰ as function of temperature are given by expression 7. The remaining parameters are fixed at $K_s = 4.1$ g/L; $K_i = 0.004$ L/g; $m_p = 0.1$ g/(g.h); $m_x = 0.2$ g/(g.h); $m = 1.0$; $n = 1.5$.

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

Where A, B, C and D are defined for each parameter, as shown in Table 4.

Table 4. Constant values of temperature dependent parameters in Eq. (7).

Parameter*	A	B	C	D
μ_{max}	-2.98×10^5	-304.44	2.82×10^5	-302.18
X_{max}	7.20×10^{-18}	1284.40	10.24	48.58
P_{max}	6.01×10^{-22}	1588.05	106.33	-12.02
Y_{Px}	-2.98×10^{-17}	1194.15	11.73	-5.60
Y_x	-4.10×10^{-78}	5111.34	0.01	33.72

(Andrade et al., 2007)

*Parameters defined for a temperature range of 30 - 38°C.

RESULTS

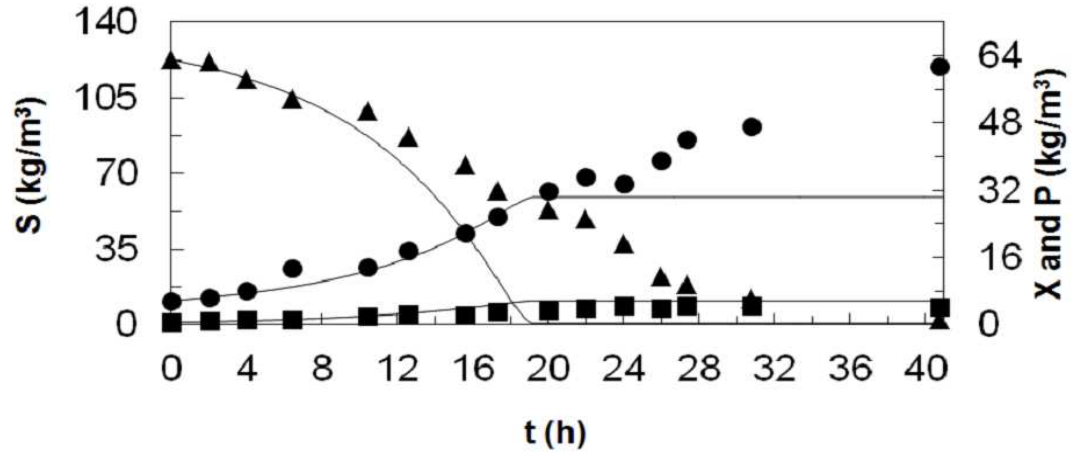
Simulation of the model

1

2

3

The model given by Eqs. 4-6 with kinetic parameters described by Eq. 7 was simulated for the experiments shown in Table 2. The results of the simulation were compared to experimental data as shown in Figs.1-3.



4

5

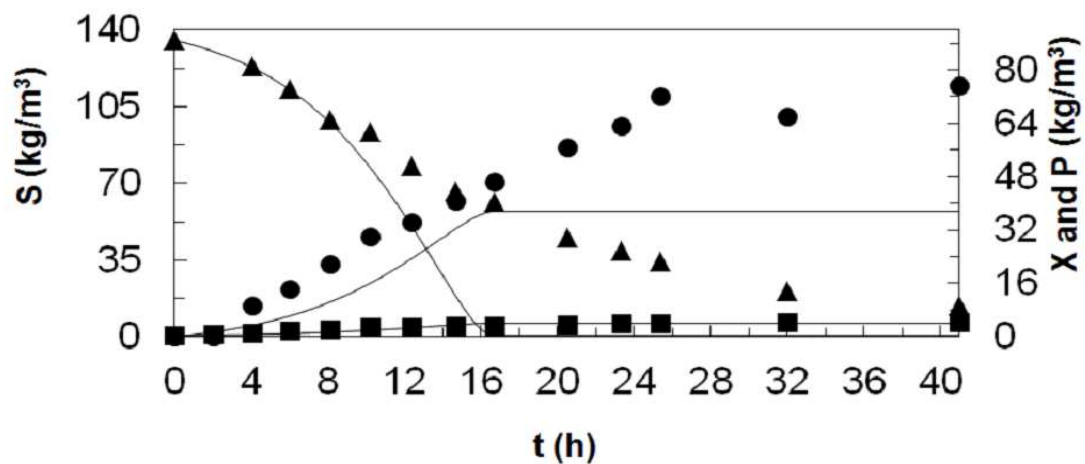
6

7

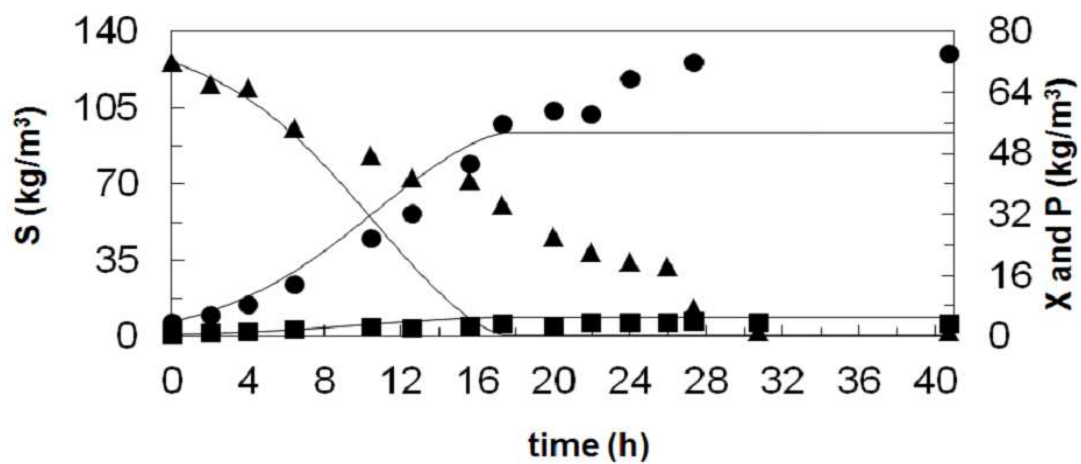
8

9

Figure 1. Experimental and simulated data (—) at 30 °C. Experimental data were obtained by fermentation of a mixture of hydrolysates and molasses. The symbols are concentration of substrate, S(▲); cell mass X(■) and ethanol P(●).



1
2 Figure 2. Experimental and simulated data (—) at 32 °C. Experimental data were obtained by
3 fermentation of a mixture of hydrolysates and molasses. The symbols are concentration of substrate,
4 S(▲); cell mass X(■) and ethanol P(●).
5



6
7 Figure 3. Experimental and simulated data (—) at 34 °C. Experimental data were obtained by
8 fermentation of a mixture of hydrolysates and molasses. The symbols are concentration of substrate,
9 S(▲); cell mass X(■) and ethanol P(●).
10

As can be seen in Figures 1-3, the original model developed by de Andrade *et al.*¹⁰ was not capable to describe the kinetics of alcoholic fermentation when hydrolysate was added to the molasses at a proportion of 66.67 %. The experimental data obtained for hydrolysates suggests a reduction in the rate of substrate consumption, which leads to an increment in fermentation time and to a lower productivity compared to molasses fermentation. Thus, a new evaluation of kinetics of hydrolysates fermentation is necessary to develop reliable models in the future to be used for second generation ethanol optimization procedures.

Mathematical modeling for hydrolysate broth

In this work, the fermentations in batch mode were performed substituting water by hydrolysate to dilute molasses. This practice can be used if the second generation ethanol production process is integrated to the first generation process. Thus, components inherited from the pretreatment and hydrolysis steps were considered as growth inhibitors, and a new term was proposed in this work and included in the original expression used by de Andrade *et al.*¹⁰, resulting in Eq. 8:

$$r_x = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \exp(-K_i S) \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right)^m \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)^n X \left(1 - \frac{C_{Ac}}{C_{Ac \max}}\right)^{nn} \quad (8)$$

Luedking-Piret expression (Eq. 5) was used to represent the ethanol formation rate and Eq. 6 is used to describe the substrate consumption rate.

In Eq.8, the term including C_{Ac} and $C_{Ac \max}$ describes the hyperbolic inhibition by acetic acid on yeast growth. Terms taking into account furfural and HMF were not added to the model due to their low concentration in the hydrolysate (bellow 0.084 g/L), comparing to the inhibition levels presented in Table 1.

Estimation of kinetic parameters by a Quasi-Newton Algorithm

The evaluation of kinetics of bioethanol production from hydrolysates was based on an existing and well validated model for alcoholic fermentation, developed for molasses by de Andrade *et al.*¹⁰, which was originally described by Eqs. 4-6.

In the new model, represented by Eqs 5,6 and 8; 6 parameters are estimated as functions of temperature: $\mu_{\max}$, $X_{\max}$, $P_{\max}$, Y_x , Y_{px} and C_{Acmax} . These vary constantly with the experimental conditions as agitation, yeast lineage, molasses, hydrolysate broth composition and others. The initial guess and range for estimation of C_{Acmax} were based on the values of acetic acid which partially inhibits the growth of *S. cerevisiae*, as shown in Table 1. The parameters that are not functions of temperature were fixed on the values obtained by Atala *et al.*¹⁸

For simultaneous estimation of kinetic parameters, a quasi-Newton algorithm was used. The optimization was performed through the minimization of Eq. 9. A routine was developed in Fortran 90 for this purpose.

$$E(\theta) = \sum_{n=1}^{np} \left[\frac{(X_n - Xe_n)^2}{Xe_{\max}^2} + \frac{(S_n - Se_n)^2}{Se_{\max}^2} + \frac{(P_n - Pe_n)^2}{Pe_{\max}^2} \right] = \sum_{n=1}^{np} \varepsilon_n(\theta) \quad (9)$$

In Eq. 9, θ is the vector of kinetic parameters; Xe_n , Se_n e Pe_n are experimental data of cellular concentration, substrate and product at sampling times n . X_n , S_n and P_n are the concentrations computed by the model in each sampling time, and $Xe_{\max}$, $Se_{\max}$ and $Pe_{\max}$ the maximum measured concentrations, np the number of samples. $\varepsilon_n(\theta)$ is the minimized error.

1st set of data – fermentation of hydrolysates mixed with molasses in batch mode

For the first batch mode experiments, the kinetic parameter estimation was performed for the temperatures of 30, 32 and 34 °C. In order to describe the concentration profiles, the

1 temperature-dependent parameters ($\mu_{\max}$, $X_{\max}$, $P_{\max}$, Y_x , Y_{px} and C_{Acmax}) were estimated to
2 minimize the objective function, given by Eq.9. The remaining parameters were maintained
3 fixed at $K_s= 4.1$ g/L; $K_i= 0.004$ L/g; $m_p= 0.1$ g/(g.h); $m_x= 0.2$ g/(g.h); $m=1.0$; $n=1.5$, according to
4 Andrade.¹⁹ Andrade *et al.*²⁰ have shown that the fixed parameters are the statistically non-
5 significant for the mathematical model, i.e., those that present minor influence on the model.

6 The values of kinetic parameters for each temperature for hydrolysates are compared to the
7 obtained for diluted molasses, as shown in Table 5.

8
9 Table 5. Estimated kinetic parameters for fermentations using diluted molasses, and mixture of
10 molasses and enzymatic hydrolysates.

Parameters	*Temperature (°C)			**Temperature (°C)		
	30.0	32.0	34.0	30.0	32.0	34.0
$\mu_{\max} (h^{-1})$	0.190	0.414	0.370	0.237	0.342	0.437
$X_{\max} (Kg/m^3)$	79.94	55.99	43.00	79.95	48.67	42.92
$P_{\max} (Kg/m^3)$	82.92	76.00	75.00	129.88	75.18	74.78
$Y_{px} (Kg/Kg)$	8.58	15.02	16.63	3.96	9.37	9.89
$Y_x (Kg/Kg)$	0.0436	0.0427	0.0409	0.0427	0.0401	0.0377
$C_{Acmax} (Kg/m^3)$	4.22	4.12	3.13	-	-	-
nn	0.100	0.118	0.210	-	-	-

11 * denotes values of parameters for a mixture of enzymatic hydrolysates and molasses. The
12 hydrolysate portion was of 66.67 % of total reactional volume; 22.22 % of molasses, and 11.11
13 % of inoculum; and ** denotes the parameters for diluted molasses, obtained by de Andrade *et*
14 *al.*¹⁰.

1 The parameters C_{Acmax} and nn were added to the original model used by de Andrade *et al.*¹⁰
2 in order to represent the kinetics of fermentation using hydrolysate mixed with molasses as
3 media, which has significant concentrations of acetic acid to exert inhibitory effects on *S.*
4 *cerevisiae*. The mode of inhibition followed a hyperbolic-type function.

5 In Table 5, the values of μ_{max} obtained for media containing hydrolysates in general
6 decreased, revealing a reduction in growth rate of *S. cerevisiae*, when compared to molasses. At
7 a temperature of 30°C the parameter P_{max} for hydrolysates was 82.92 g/L, suggesting an
8 increasing in toxicity by ethanol at low temperatures when hydrolysates is added to the media.
9 For molasses, the ethanol concentration required to totally inhibit growth at 30°C was 129.88
10 g/L.

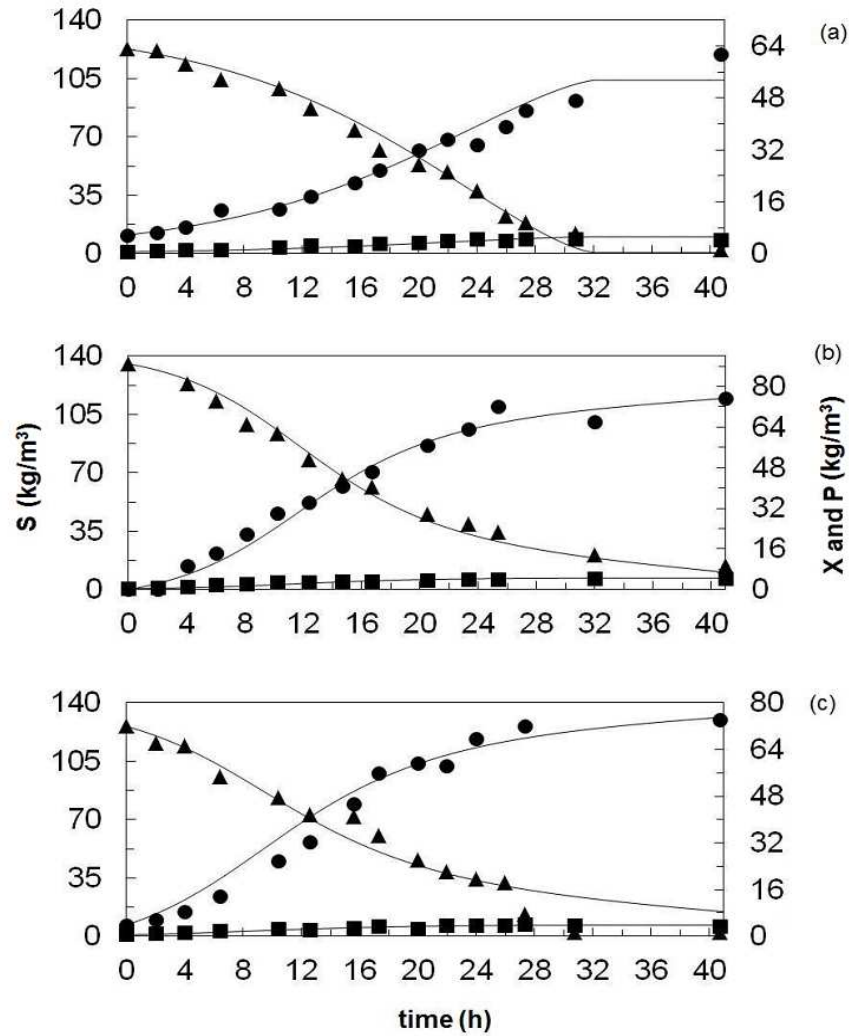
11 The values of Y_{px} for 32 and 34 °C (Table 5) were higher than the Y_{px} obtained by de
12 Andrade *et al.*¹⁰ for the same temperatures. This can be explained by an increment in ethanol
13 formation with relation to biomass produced when in presence of acetic acid in the media. The
14 same behavior was reported by Maiorella *et al.*⁹, which explains that the cells in presence of
15 acetic acid require additional ATP to pump out the excess protons when intracellular pH is low.
16 The energy required for this purpose results in a detriment of cell growth, and higher energy for
17 maintenance.

18 The values of Y_X for hydrolysates and diluted molasses were very similar, and presented the
19 same behavior, decreasing with the increment in temperature. Thus, the temperature of 30°C
20 corresponds to the optimal point for *S. cerevisiae* growth, used for inoculum preparation. The
21 impact of hydrolysates addition on reduction of Y_X was not evident in these experiments.

22 Figure 4 shows the simulation of the proposed model (Eqs. 5, 6 and 8) taking into account
23 inhibition by acetic acid, and the updated parameters, for temperatures of 30, 32 and 34 °C. The
24 additional inhibitory term, which takes into account the impact of acetic acid on the kinetics,

1 results in an accurate description of experimental data for all temperatures using these
2 experimental data.

3



4

5 Figure 4. Experimental and simulated (QN ---) data for temperatures of 30 (a), 32 (b) and 34 °C
6 (c), considering inhibition by acetic acid in the model. Experimental data are for concentrations
7 of substrate (sum of sucrose, glucose and fructose), S (▲); cellular mass, X (■) and ethanol, P
8 (●).

1 The productivities obtained in the fermentations were 1.81, 1.84 and 1.91 $kg/(m^3.h)$ for
2 temperatures of 30, 32 and 34 °C, which are acceptable for batch cultivations, which range is
3 between 1-3.^{21, 22} In the work of Andrade¹⁹, the ethanol productivities were in the range of 2.89 –
4 4.08 $kg/(m^3.h)$. Despite the low productivity compared to fermentation of pure molasses in the
5 study of Andrade¹⁹, the obtained values for hydrolysates fermentation are next to study of Ortiz-
6 Muñoz *et al.*²³, which achieved the maximum ethanol productivity of 1.8 $kg/(m^3.h)$ in batch
7 mode, using molasses as media. In this study, the fermentations also promoted high ethanol
8 yields (Y_{ps}), total ART (sum of sucrose, fructose and glucose) consumption and is an alternative
9 to increase the portion of sugarcane used as raw material, even without applying any
10 detoxification method for the hydrolysates.

11 The additional parameter C_{Acmax} decreases with increasing temperatures to represent the
12 higher toxicity of acetic acid on *S. cerevisiae* at elevated temperatures. The adjustable parameter
13 mn assumed values lower than 1, confirming the hyperbolic inhibition.

14 Although the considerable inhibitory effect of acetic acid on the kinetics of fermentation,
15 the ethanol yields (in relation to the substrate consumed) obtained were high (next to the
16 theoretical value, 0.51) when the fermented medium used was hydrolysates mixed with
17 molasses.

18

19 *2nd set of data –fermentation of pure hydrolysates*

20 The experiment was performed using concentrated and pure sugarcane hydrolysates,
21 without dilution, obtained after successive feeding of bagasse and enzymes during the reaction
22 time, as described in “fed-batch enzymatic hydrolysis”. The bagasse used as raw material for
23 hydrolysis was pretreated with alkaline hydrogen peroxide. The fermentation was performed in
24 batch mode at 34 °C, in an Erlenmeyer flask, placed in a shaker at 150 rpm. Samples were taken
25 aseptically using a laminar flow chamber.

The experimental data from fermentation of concentrated hydrolysate and simulated profiles of the model composed by Eqs. 5, 6 and 8, with parameters shown in Table 5 are depicted in Fig. 5.

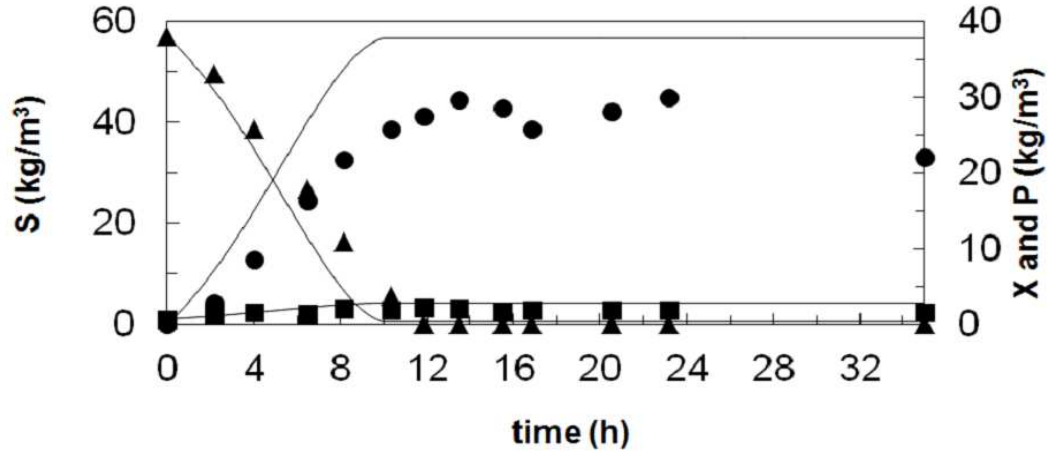


Figure 5. Experimental and simulated (QN ---) data for temperature of 34 °C, considering inhibition by acetic acid in the model without parameter updating. Experimental data are for concentrations of glucose, S (▲); cellular mass, X (■) and ethanol, P (●). Fermentation performed in a shaker and the media was pure and concentrated hydrolysate obtained after alkaline hydrogen peroxide pre-treatment.

As can be seen in Figure 5, the model developed for a mixture of hydrolysates and molasses was not capable to describe the kinetics of fermentation when using pure and concentrated hydrolysates, performed in orbital shaker. In order to obtain an accurate description of the kinetics, an additional parameter updating is required. After the re-estimation procedure, the new kinetic parameters that minimize the objective function were: $\mu_{max} = 0.18 \text{ (h}^{-1}\text{)}$, $X_{max} = 43.0 \text{ kg/m}^3$, $P_{max} = 75.0 \text{ kg/m}^3$, $Y_x = 0.023214 \text{ (kg/kg)}$, $Y_{px} = 20.91 \text{ (kg/kg)}$, $nn = 0.10$ and $C_{Acmax} =$

4.10 kg/m³. The remaining parameters were maintained fixed as for the 1st set of data. The results of the simulation of the model after parameters updating and the experimental data for pure hydrolysate fermentation are shown in Fig. 6.

The values of μ_{max} are low when compared to the obtained in Table 5. That suggests the concentrated hydrolysate used as culture media presented a higher negative impact on *S. cerevisiae* growth than when mixed with molasses.

The ethanol yield (Y_{PS}) for fermentation of concentrated hydrolysates was 75 % of the theoretical value (0.51), which is considered low compared to the obtained by molasses fermentation. Thus, when the hydrolysates were added to dilute molasses at 66.67 %, a higher conversion was achieved, while pure hydrolysates have been shown to be more toxic to *S. cerevisiae*.

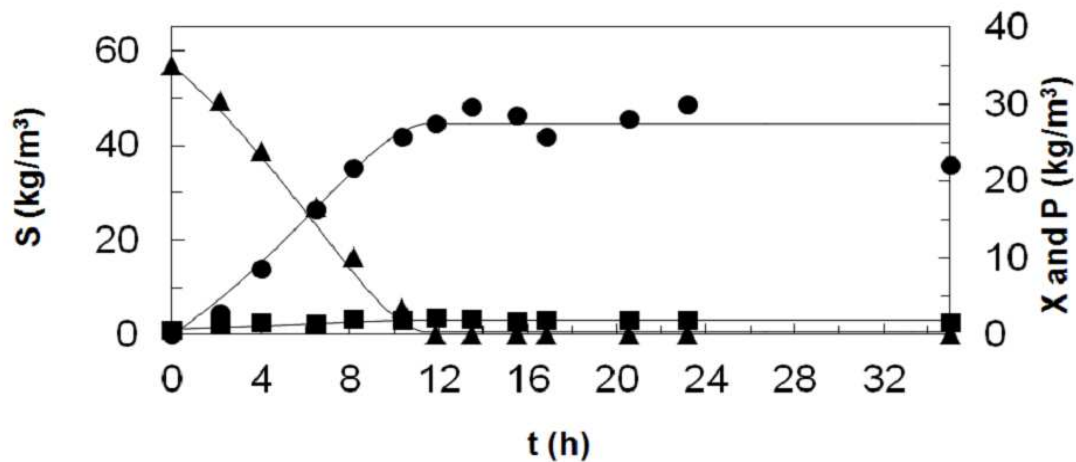


Figure 6. Experimental and simulated (QN ---) data for temperature of 34 °C, considering inhibition by acetic acid in the model, after parameters updating. Experimental data are for concentrations of glucose, S (▲); cellular mass, X (■) and ethanol, P (●). Fermentation performed in a shaker and the media was pure and concentrated hydrolysate obtained after alkaline hydrogen peroxide pre-treatment.

The residual standard deviation (*RSD*), Eq. (10), written as a percentage of the average of the experimental values, was the measurement used for characterizing the quality of model fitting.

$$RSD(\%) = \left(\frac{\sqrt{RSD}}{\bar{d}_p} \right) 100 \quad (10)$$

where $RSD = \frac{1}{np} \sum_{p=1}^{np} (d_p - x_p)^2$, in which x_p and d_p are, respectively, the value predicted by the mathematical model and experimental value, $\bar{d}_p$ is the average of the experimental values and np is the number of experimental points.

The *RSDs* (%) are in Table 6. The concentrations of biomass, substrate and ethanol calculated using the model after parameter re-estimation presented deviations in a range of 6.10% - 26.26% from the experimental data, while the *RSDs* without parameter updating and using the model of de Andrade *et al.*¹⁰ reached 53.60 %, which are inaccurate to describe experimental data when the hydrolysate is mixed with molasses.

12

Table 6. Residual standard deviations for experiments at different temperatures, with and without parameter updating.

Variable	1 st set of data						2 nd set of data	
	Temperature (°C)						Figure	
	30	32	34	30 [*]	32 [*]	34 [*]	5 [*]	6
<i>X</i>	14.94	13.67	14.15	31.44	20.15	46.11	49.47	15.48
<i>S</i>	5.75	6.10	15.15	40.55	39.03	53.60	37.20	12.34
<i>P</i>	11.52	13.72	11.38	37.91	50.70	29.31	47.93	26.26

* model before parameter re-estimation.

16

17

1 **DISCUSSION**

2 In this work, the fermentability of hydrolysates obtained by enzymatic hydrolysis of
3 bagasse pretreated with alkaline hydrogen peroxide was evaluated. The kinetics was determined
4 based on an existing and well validated model previously applied for molasses fermentation. An
5 expression for microbial growth taking into account the inhibition by acetic acid, which is one of
6 the main components in hydrolysates that affects fermentation performance, was developed. For
7 this purpose, fermentations were performed in batch mode, with two different proportions of
8 hydrolysates, and the experimental data used to re-estimate kinetic parameters based on existing
9 values found in literature.

10 The model considering acetic acid inhibition and the updating of kinetic parameters
11 applying the re-estimation procedure showed to be relevant to represent the kinetics of
12 bioethanol production from hydrolysate with accuracy. The kinetic parameters obtained were
13 different from the work of de Andrade *et al.*¹⁰, which used sugarcane molasses as culture media,
14 due to the distinct pH range of molasses and hydrolysates, and different proportions of the
15 glucose and other sugars in the broth, as well as the influence of acetic acid. It is well known that
16 the sucrose uptake is lower than that of glucose, which results in different kinetics²⁰ in media
17 containing molasses, pure hydrolysates, or a mixture of them. The difference in kinetics
18 reinforces the idea that the existing models in literature and parameters for alcoholic
19 fermentation by molasses are not suitable to predict the kinetics for second generation bioethanol
20 production, and parameters updating is required.

21 Terms that take into account inhibition by furfural and HMF were not considered in this
22 work due to the low concentration of these components in the media, which resulted in a not
23 evident effect on this kinetics. It is worthwhile mentioning that, depending on the pretreatment
24 method, these components can be in high concentrations and a detoxification of hydrolysates can
25 be required before fermentation.

1 **ACKNOWLEDGEMENTS**

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

4 **NOMENCLATURE**

5 ATP – adenosine triphosphate

6 $\mu_{\max}$ – maximum specific growth rate (h^{-1})

7 C – concentration (kg/m^3)

8 C_{Ac} – acetic acid concentration (kg/m^3)

9 C_{Acmax} – concentration of acetic acid where cell growth ceases (kg/m^3)

10 CBU – cellobiose Unit

11 C_F –furfural concentration (kg/m^3)

12 C_{HMF} –hydroximetilfurfural concentration (kg/m^3)

13 F – furfural concentration (kg/m^3)

14 F_0 – volumetric flow rate (m^3/h)

15 FPU - filter-paper Unit

16 HMF –hydroximetilfurfural concentration (kg/m^3)

17 I – inhibition (%)

18 K_i – substrate inhibition coefficient (m^3/kg)

19 K_s – substrate saturation parameter (kg/m^3)

20 m, n – parameters used to describe product inhibitions.

21 m_p – ethanol production associated with growth ($\text{kg}/[\text{kg}\cdot\text{h}]$)

22 m_x - maintenance parameter ($\text{kg}/[\text{kg}\cdot\text{h}]$)

23 nm – parameter used to describe acetic acid inhibition.

24 P – ethanol concentration (kg/m^3)

- 1 $P_{\max}$ – concentration of ethanol where cell growth ceases (kg/m^3)
- 2 r_P – kinetic rate of product formation ($\text{kg}/[\text{m}^3 \cdot \text{h}]$)
- 3 r_S – kinetic rate of substrate uptake ($\text{kg}/[\text{m}^3 \cdot \text{h}]$)
- 4 r_x – kinetic rate of cellular growth ($\text{kg}/[\text{m}^3 \cdot \text{h}]$)
- 5 S – substrate concentration in bioreactor (kg/m^3)
- 6 S_0 – inlet substrate concentration (kg/m^3)
- 7 t – time (h)
- 8 V – reactor volume (m^3)
- 9 X – biomass concentration (kg/m^3)
- 10 $X_{\max}$ – biomass concentration when cell growth ceases (kg/m^3)
- 11 Y_{px} – yield of product based on cell growth (kg/kg)
- 12 Y_x – limit cellular yield (kg/kg)

13

14 REFERENCES

- 15 1. Heer D and Sauer U, Identification of furfural as a key toxin in lignocellulosic
16 hydrolysates and evolution of a tolerant yeast strain. *Microbial Biotechnology* **1**: 497-506
17 (2008).
- 18 2. Palmqvist E, Almeida JS and Hahn-Hägerdal B, Influence of furfural on anaerobic
19 glycolytic kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. *Biotechnology and*
20 *Bioengineering* **62**: 447-454 (1999).
- 21 3. Almeida JRM, Modig T, Petersson A, Hahn-Hägerdal B, Lidén G and Gorwa-Grauslund
22 MF, Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by
23 *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **82**: 340-
24 349 (2007).

26

- 1 4. Mussatto SI and Roberto I, Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic
2 hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Bioresource Technology* **93**: 1-
3 10 (2004).
- 4 5. Zautsen RRM, Maugeri-Filho F, Vaz-Rossell CE, Straathof AJJ, van der Wielen LAM
5 and de Bont JAM, Liquid-liquid extraction of fermentation inhibiting compounds in
6 lignocellulose hydrolysate. *Biotechnology and Bioengineering* **102**: 1354-1360 (2009).
- 7 6. Olsson L and Hahn-Hägerdal B, Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol
8 production. *Enzyme and Microbial Technology* **18**: 312-331 (1996).
- 9 7. Nichols NN, Sharma LN, Mowery RA, Chambliss CK, van Walsum GP, Dien BS and
10 Iten LB, Fungal metabolism of fermentation inhibitors present in corn stover dilute acid
11 hydrolysate. *Enzyme and Microbial Technology* **42**: 624-630 (2008).
- 12 8. Narendranath NV, Thomas KC and Ingledew WM, Effects of acetic acid and lactic acid
13 on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. *Journal of Industrial*
14 *Microbiology & Biotechnology* **26**: 171-177 (2001).
- 15 9. Maiorella B, Blanch HW and Wilke CR, By-product inhibition effects on ethanolic
16 fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering* **25**: 103-
17 121 (1983).
- 18 10. de Andrade R, Ccopa Rivera E, Costa A, Atala D, Filho F and Filho R, Estimation of
19 temperature dependent parameters of a batch alcoholic fermentation process. *Applied*
20 *Biochemistry and Biotechnology* **137-140**: 753-763 (2007).
- 21 11. Rabelo S, Filho R and Costa A, A Comparison Between Lime and Alkaline Hydrogen
22 Peroxide Pretreatments of Sugarcane Bagasse for Ethanol Production. *Applied*
23 *Biochemistry and Biotechnology* **144**: 87-100 (2008).
- 24 12. Rabelo SC, Amezquita Fonseca NA, Andrade RR, Maciel Filho R and Costa AC, Ethanol
25 production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and
26 alkaline hydrogen peroxide. *Biomass and Bioenergy* **35**: 2600-2607 (2011a).

- 1 13. Rabelo SC, Carrere H, Maciel Filho R and Costa AC, Production of bioethanol, methane
2 and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept. *Bioresource Technology* **102**:
3 7887-7895 (2011b).
- 4 14. Ghose TK, Measurement of cellulase activities. *Pure Appl Chem* **59** (1987).
- 5 15. Wood TM and Bhat KM, Methods for measuring cellulase activities, in *Methods in*
6 *Enzymology*. Academic Press, pp. 81-112 (1988).
- 7 16. Yu J and Stahl H, Microbial utilization and biopolyester synthesis of bagasse
8 hydrolysates. *Bioresource Technology* **99**: 8042-8048 (2008).
- 9 17. Ding W-W, Wu Y-T, Tang X-Y, Yuan L and Xiao Z-Y, Continuous ethanol fermentation
10 in a closed-circulating system using an immobilized cell coupled with PDMS membrane
11 pervaporation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **86**: 82-87 (2010).
- 12 18. Atala D, Costa A, Maciel R and Maugeri F, Kinetics of ethanol fermentation with high
13 biomass concentration considering the effect of temperature. *Applied Biochemistry and*
14 *Biotechnology* **91-93**: 353-365 (2001).
- 15 19. Andrade RR, Procedure for development of a robust mathematical model for alcoholic
16 fermentation process. University of Campinas, Campinas, pp. 98 (2007).
- 17 20. Andrade RR, Rivera EC, D.I.P. A, Maugeri F, Maciel Filho R and Costa AC,
18 Development of extractive processes and robust mathematical model for bioethanol
19 production, in *Bioethanol: production, benefits and economics*, ed by Erbaum JB. Nova
20 Science Publishers Inc, New York, pp. 74-92 (2009).
- 21 21. Sanchez OJ and Cardona CA, Trends in biotechnological production of fuel ethanol from
22 different feedstocks. *Bioresource Technology* **99**: 5270-5295 (2008).
- 23 22. Claassen PAM, van Lier JB, Lopez Contreras AM, van Niel EWJ, Sijtsma L, Stams
24 AJM, de Vries SS and Weusthuis RA, Utilisation of biomass for the supply of energy
25 carriers. *Applied Microbiology and Biotechnology* **52**: 741-755 (1999).

- 1 23. Ortiz-Muñiz B, Carvajal-Zarrabal O, Torrestiana-Sanchez B and Aguilar-Uscanga MG,
2 Kinetic study on ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 yeast
3 isolated from sugar cane molasses. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **85**:
4 1361-1367.
- 5 24. Pampulha ME and Loureiro V, Interaction of the effects of acetic acid and ethanol on
6 inhibition of fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters* **11**: 269-
7 274 (1989).
- 8 25. Delgenes JP, Moletta R and Navarro JM, Effects of lignocellulose degradation products
9 on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*,
10 *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. *Enzyme and Microbial*
11 *Technology* **19**: 220-225 (1996).
- 12 26. Taherzadeh MJ, Gustafsson L, Niklasson C and Lidén G, Physiological effects of 5-
13 hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and*
14 *Biotechnology* **53**: 701-708 (2000).
- 15 27. Petersson A, Almeida JRM, Modig T, Karhumaa K, Hahn-Hägerdal B, Gorwa-Grauslund
16 MF and Lidén G, A 5-hydroxymethyl furfural reducing enzyme encoded by the
17 *Saccharomyces cerevisiae* ADH6 gene conveys HMF tolerance. *Yeast* **23**: 455-464
18 (2006).
19
20

CAPÍTULO 6

DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA COM ALTA DENSIDADE CELULAR EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA USANDO MELAÇO PARA CONCENTRAR HIDROLISADO ENZIMÁTICO DE BAGAÇO DE CANA

Neste capítulo é feito um estudo detalhado da cinética de fermentação alcoólica quando melaço é utilizado para concentrar hidrolisado enzimático de bagaço de cana pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino. Para o estudo da cinética foram realizadas bateladas sucessivas com o objetivo de avaliar a influência dos inibidores no metabolismo da levedura por longos períodos de tempo e para considerar a influência de alta concentração de biomassa, já que no ambiente industrial há reciclo de células. Foi avaliada também a influência da temperatura na cinética da fermentação. Foram realizados ensaios em 5 temperaturas entre 30 e 38 °C. Para cada temperatura o primeiro ensaio foi realizado com inóculo recém preparado e os seguintes foram bateladas sucessivas reciclando a biomassa do ensaio anterior. Foram realizadas pelo menos 4 bateladas para cada temperatura, sendo que em algumas temperaturas foram realizadas 5 ou 7 bateladas sucessivas.

6.1 Materiais e métodos

6.1.1 Preparo do caldo hidrolisado

6.1.1.1 Bagaço de cana

A matéria-prima usada para o preparo do hidrolisado foi bagaço de cana-de-açúcar moído, não queimado, não peneirado, obtido da última moenda da safra de 2007, da Usina da Pedra, Serrana-SP. O bagaço foi seco ao tempo, por 4 dias, moído em moinhos de facas Wiley

Mill modelo nº 3 e martelo da General Eletronic por 10 minutos em cada um. O bagaço seco e moído foi então mantido em sacos hermeticamente fechados e congelados em freezer.

6.1.1.2 Pré-tratamento do bagaço com peróxido de hidrogênio alcalino

O bagaço de cana-de-açúcar foi preparado através do pré-tratamento de bagaço seco em estufa (a 45 °C por 48 h), com uma solução de peróxido de hidrogênio alcalino (7,355 % v/v, pH ajustado para 11,5 com NaOH) a 25 °C por 1 hora, submetido a agitação de 150 rpm em “shaker”, seguido de lavagem com água a temperatura ambiente, e secagem do bagaço em forno a 105 °C (RABELO *et al.*, 2011). A concentração de bagaço usada no pré-tratamento foi de 4 % de sólidos em solução de 100 mL.

6.1.1.3 Hidrólise enzimática do bagaço

A hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado e seco foi realizada na temperatura de 50,0 °C, tempo reacional de 72 h, submetido a agitação de 100 rpm. Uma solução tampão de citrato de sódio a 0,05 mol/L, pH 4,8 foi misturada com enzima celulase de *Trichoderma reesei* (Sigma-Aldrich) e β -glicosidase 188 de *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich). A carga enzimática utilizada neste trabalho foi baseada em Rabelo *et al.* (2011), e era de 3,5 FPU celulase/g bagaço seco pré-tratado; 25,0 CBU de β -glicosidase/g bagaço. A concentração de sólido na solução para essa etapa foi de 3 % (m/v).

6.1.1.4 Esterilização

A esterilização do melaço, juntamente com o reator, “erlenmeyers”, tubos de centrífuga, tubos de silicone, conexões e espátulas foi realizada em autoclave Phoenix (Araraquara, SP, Brasil) a 121 °C por 20 minutos.

O caldo hidrolisado foi esterilizado a frio, usando um sistema de filtração estéril por membranas modelo Minikap HF Filter MK2M-512-V6S (Spectrum Laboratories, Inc., FL, USA), após ser submetido a centrifugação (centrífuga Sorvall) a 8000 rpm (15810 g) por 20 minutos. O material da membrana consistia em éster de celulose, com diâmetro de poro de 0,2 μm , e área de filtração de 500 cm^2 . Uma linha de ar comprimido foi conectada ao sistema de filtração para aumentar o fluxo de permeado e evitar perda de componentes voláteis. O permeado estéril era colhido em um frasco “erlenmeyer” fechado e previamente esterilizado.

6.1.2 Microrganismo

O microrganismo utilizado foi *Sacchamomyces cerevisiae* cultivado no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, e obtido na Usina Santa Adélia S/A (Jaboticabal - SP). A manutenção do mesmo foi feita em refrigerador utilizando meio de ativação contendo ágar. Toda manipulação foi realizada em câmara de fluxo laminar, cujas superfícies foram esterilizadas através de solução de álcool etílico na concentração de 70° GL e posterior exposição à radiação ultravioleta por 30 minutos. Anteriormente à fermentação no reator, foram realizadas propagações do microrganismo a cada 24 horas, como mostrado nas etapas de 1 a 5, vide Figura 6.1.

6.1.3 Ativação do Microrganismo

Para ativação do microrganismo, um tubo contendo cultura estoque mantido em refrigerador (Figura 6.1, etapa 1) era propagado e acondicionado por 24 horas, a 30 °C, em tubos de ensaio contendo meio de ativação semi sólido YM composto por Extrato de levedura (3 kg/m^3), Extrato de malte (3 kg/m^3), Peptona (5 kg/m^3), Glicose (10 kg/m^3) e 20 kg/m^3 de ágar-ágar (Figura 6.1, etapa 2). Foi realizado repique subsequente, transferindo o microrganismo para outro meio de ativação através de uma alça de inoculação. O meio apresentava a mesma composição do YM, porém sem adição de ágar. O inóculo foi acondicionado por 24 horas no meio líquido a 30 °C (Figura 6.1, etapa 3).

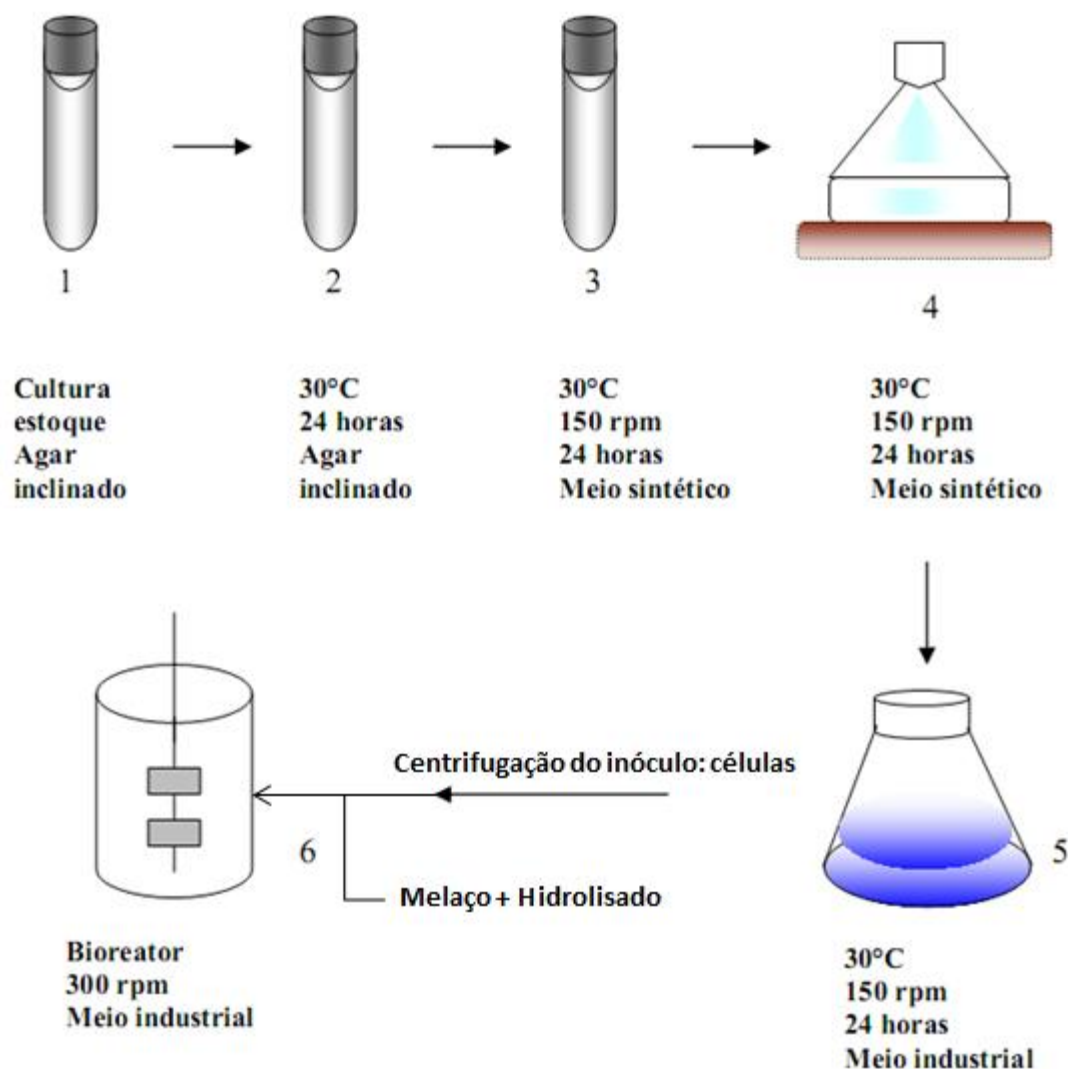


Figura 6.1 – Etapas utilizadas para preparo do inóculo e fermentação (Adaptado de Andrade (2007))

6.1.4 Crescimento do Microrganismo

Após a ativação foi realizado o crescimento microbiano (Figura 6.1, etapa 4) através de nova propagação do inóculo para um “erlenmeyer” aletado, mantido em agitação por 24 horas a 150 rpm e 30 °C em incubadores do tipo “shaker”. O meio de crescimento utilizado foi sintético, composto por Sacarose (20 kg/m³), Extrato de levedura (5 kg/m³), K₂HPO₄ (5 kg/m³), NH₄Cl (1,5 kg/m³), KCl (1,15 kg/m³) e MgSO₄.7 H₂O (0,65 kg/m³). O inóculo crescido em meio

sintético foi transferido para um “erlenmeyer” contendo meio industrial (melaço) diluído para concentração de sacarose, glicose e frutose, totalizando 80 g/L. O inóculo foi acondicionado em “shaker” com agitação de 150 rpm, 30 °C (Figura 6.1, etapa 5), e após 24 horas, transferido para o fermentador contendo meio de produção.

6.1.5 Meio de fermentação

O meio de produção utilizado foi melaço de cana de açúcar diluído, misturado com hidrolisado enzimático de bagaço de cana-de-açúcar. O volume reacional era formado de 66,67 % (v/v) de hidrolisado, 22,22 % de solução de melaço, e 11,11 % de inóculo, totalizando 1 L. Não foi acrescentado nenhum nutriente ao melaço com o objetivo de representar condições de fermentação mais próxima das utilizadas em processos industriais no Brasil.

6.1.6 Fermentação

O inóculo, após etapa 5 (Figura 6.1), era centrifugado a 4000 rpm por 15 minutos, as células precipitadas eram ressuspensas em água destilada estéril e centrifugadas por 2 vezes, e completado o volume das células com água para 100 mL. Assim, as células diluídas em água eram adicionadas ao fermentador contendo 66,67 % (v/v) de hidrolisado estéril e 22,22 % de melaço, iniciando o processo. Amostras foram colhidas do fermentador para análises em HPLC e gravimetria. O processo era mantido até que cessasse a produção de CO₂.

Para evitar contaminação por bactérias durante as fermentações, foram adicionados ao reator o antibiótico Ampicilina e Ácido nalidíxico nas concentrações de 50 ppm cada, conforme utilizado por Maugeri e Hernalsteens (2007).

6.1.6.1 Detalhes do fermentador

As fermentações foram realizadas em um biorreator modelo Bioflo III (New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ) com 1 L de volume de trabalho, agitado por duas turbinas de pás planas, com 6 pás em cada uma, a 300 rpm. Esse equipamento possuía

controlador tipo PID para agitação e temperatura, e um amostrador para coleta de amostras de forma asséptica. Para esgotamento do fermentador de forma asséptica após cada batelada, utilizou-se bombas MasterFlex (Cole Parmer) de alta precisão, conectadas por tubos a um frasco fechado e estéril do tipo “erlenmeyer”. O sistema de fermentação era também provido de sensores de pH, turbidez e CO₂ para monitoramento.

6.1.6.2 Bateladas sucessivas com reciclo de células

Após cada fermentação, a agitação foi desligada e o meio fermentado foi deixado em repouso por algumas horas para decantação das células. Após o período de repouso, o meio foi purgado do reator através da conexão de um tubo de silicone no mesmo. Para o bombeamento, foi utilizada bomba peristáltica MasterFlex. O meio purgado foi então bombeado para um frasco “erlenmeyer” estéril fechado, e levado à câmara de fluxo laminar, onde foi transferido para tubos de centrífuga. Assim, o caldo fermentado foi centrifugado a 6000 rpm por 15 minutos. As células precipitadas foram removidas com uma espátula e ressuspensas em 100 mL de água estéril (equivalente a 11,11 % do volume reacional), e usadas como inóculo para a fermentação subsequente. No reator, juntamente com as células foram adicionados 66,67 % (v/v) de hidrolisado estéril e 22,22 % de melaço, iniciando assim a fermentação. Esses passos foram realizados para n ciclos, conforme mostrado na Figura 6.2.

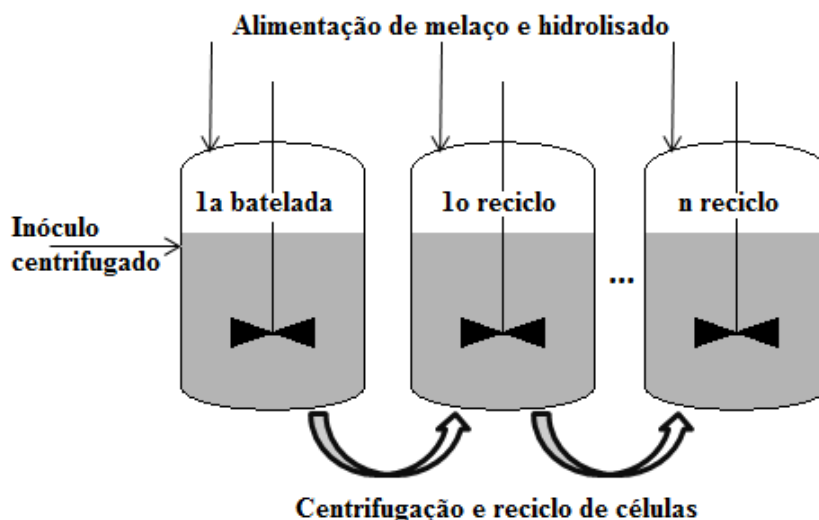


Figura 6.2 – Esquema do reciclo de células para realização de bateladas sucessivas

6.1.7 Métodos Analíticos

6.1.7.1 Concentração de Células Totais

A concentração de biomassa total foi determinada por análise gravimétrica após centrifugação das amostras de meio fermentado por 15 minutos a 4000 rpm e lavagem do precipitado formado por 3 vezes com água destilada e transferência do material sólido para tubos de ensaio previamente tarados. Foi feita a medida de massa até obter peso constante através de balança analítica após a secagem do precipitado em estufa com circulação de ar e temperatura de 60° C. Para análise gravimétrica, foi utilizada uma balança analítica.

6.1.7.2 Viabilidade

A viabilidade celular foi determinada através da técnica de redução do azul de metileno, citada por Yoshida *et al.* (1999). Este método baseia-se no fato das células viáveis reduzirem o corante azul de metileno a azul leucometileno, tornando-se incolores, sendo que as

células não viáveis não apresentam esta capacidade, e continuam azuis quando observadas ao microscópio. A viabilidade era determinada pelo quociente entre células incolores e totais.

6.1.7.3 Concentração de açúcares redutores totais, furfural, hidroximetilfurfural, etanol e glicerol.

Análises de açúcares redutores totais, etanol, glicerol e ácido acético foram feitas no sobrenadante, resultante da centrifugação do meio reacional, após diluição do mesmo e filtração com membrana microporo de éster de celulose (diâmetro de poro de 0,22 µm). Foi usado para isso cromatógrafo líquido modelo Varian 9010 (HPLC- “high performance liquid chromatography”), sendo a fase móvel utilizada uma solução de H₂SO₄ com pH de 2,6; preparada com água ultra-pura (Milli-Q) e vazão de 0,6 mL/min.

A coluna para separação dos componentes foi HPX 87-H (coluna de exclusão iônica), mantida em um forno com circulação de ar e temperatura controlada a 30 °C. Foi utilizado um detector de índice de refração a temperatura de 30 °C ligado a um software para integração e quantificação dos dados obtidos. O ácido acético foi detectado por UV ligado em série ao índice de refração, em comprimento de onda fixo em 205 nm.

Os padrões foram soluções de sacarose, glicose, frutose glicerol e etanol preparadas na faixa de concentração de 0,01 a 4 %. Para ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural, os padrões ficaram na faixa de 0,01 – 1 %.

Para quantificação de furfural e hidroximetilfurfural, utilizou-se para separação uma coluna Nova-Pak C18 (Waters Co., Milford, MA), com vazão de eluente de 0,8 mL/min. (acetonitrila/ água 1:8) e detectado por UV no comprimento de onda de 276 nm.

6.2 Resultados e discussões

O microrganismo usado foi a levedura *S. cerevisiae*, utilizando meio fermentativo composto por hidrolisado enzimático de bagaço de cana-de-açúcar e melaço com composição

fixa. As concentrações dos principais açúcares e inibidores presentes no caldo hidrolisado utilizado como matéria-prima nas fermentações são mostradas na Tabela 6.1.

Os dados cinéticos que serão apresentados nesse Capítulo foram obtidos de fermentações com hidrolisado preparado a partir de bagaço de cana-de-açúcar sem queima (No Capítulo 5, foi utilizado bagaço de safra diferente, previamente submetido à etapa de queima de cana). O processo de centrifugação e lavagem de células foi utilizado para remoção de nutrientes presentes no meio de crescimento, impedindo assim a adição dos mesmos no fermentador. Assim, no Capítulo 6, as fermentações foram realizadas sem suplementação de nutrientes, exceto os contidos no melaço, já que essa prática é realizada em ambientes industriais, diferentemente do Capítulo 5, no qual o inóculo foi adicionado sem centrifugação.

Tabela 6.1 – Principais compostos presente no caldo hidrolisado utilizado nas fermentações e respectivas concentrações

Composto	Concentração (g/L)
Glicose	23,872
Xilose	2,659
Celobiose	1,182
Arabinose	0,568
Furfural	0,026
Hidroximetilfurfural	0,040
Ácido acético	0,847

Na Tabela 6.1, pode-se observar que o hidrolisado era majoritariamente composto por glicose. O principal componente inibitório encontrado foi o ácido acético, o que poderia apresentar algum efeito negativo no crescimento microbiano. Já o furfural e hidroximetilfurfural, os quais estão entre os inibidores mais impactantes em microrganismos, apresentaram concentrações quase nulas, o que é uma característica do pré-tratamento por peróxido de

hidrogênio alcalino seguido de hidrólise via enzimática, já que ambos ocorrem em condições brandas de temperatura e acidez.

São apresentados a seguir os perfis de concentrações de substrato fermentescível pela levedura *S. cerevisiae* (soma de sacarose, glicose e frutose), células, etanol, glicerol e ácido acético para fermentações em batelada, cujas condições iniciais de substrato e temperatura são mostradas nos títulos das Tabelas.

Os resultados apresentados na Tabela 6.2 são de fermentação em batelada partindo de um inóculo cultivado em incubador. Já os dados da Tabela 6.3 foram obtidos utilizando levedura reciclada do experimento anterior (Tabela 6.2), após exposição ao meio contendo hidrolisado. O mesmo reciclo de células foi realizado para os outros experimentos cujos resultados estão expostos nas Tabelas 6.4 e 6.5.

Inicialmente, para a temperatura de 30 °C, 5 fermentações haviam sido realizadas, porém durante a realização de uma delas ocorreu corte de energia sem aviso prévio, resultando em perda de controle rigoroso de temperatura por algumas horas. Assim, os resultados para esta batelada não serão apresentados.

Tabela 6.2 – Dados experimentais de fermentação em batelada a 30 °C e $S_0 = 149,464$ g/L

t (h)	Concentrações (g/L)				
	X_t	Etanol	Glicerol	Substrato*	Ác. Acético
0,00	2,56	5,498	0,584	149,464	0,787
3,75	3,92	19,859	1,076	111,261	0,661
7,56	4,73	33,223	1,483	96,560	0,533
10,45	5,34	38,033	1,739	77,941	0,515
12,71	6,09	39,765	2,839	69,760	0,533
16,75	6,41	40,495	3,712	46,786	0,407
19,75	6,39	58,082	3,593	42,352	0,519
24,75	6,83	61,428	3,535	12,346	0,501
27,75	6,74	71,261	4,550	8,468	0,519
31,46	6,86	70,701	5,181	0,000	0,501
35,31	6,01	68,384	5,945	0,000	0,509

* Substrato consiste na soma dos açúcares fermentescíveis (sacarose, glicose e frutose) por *S. cerevisiae* sem modificação genética.

Pode-se observar na Tabela 6.2 que no período inicial da fermentação havia uma certa concentração de substrato, o qual foi dado neste trabalho pela soma de sacarose, glicose e frutose. A glicose presente é proveniente da concentração inicial da mesma no melaço e da mistura do caldo hidrolisado a 66,67 % no meio.

A concentração de células apresentada na Tabela 6.2 refere-se às células viáveis. Neste experimento a viabilidade era de aproximadamente 100 %. O mesmo ocorre com todos os resultados apresentados no Capítulo 6, exceto quando a concentração de células viáveis (X_v) é mostrada.

Tabela 6.3 – Dados experimentais de fermentação em batelada a 30 °C e $S_0 = 118,1631$ g/L

t (h)	Concentrações (g/L)				
	X_t	Etanol	Glicerol	Substrato*	Ác. Acético
0,00	3,62	18,491	0,585	118,163	0,684
3,00	5,92	28,614	0,967	109,161	0,700
6,80	6,78	39,861	1,941	86,874	0,729
16,12	8,15	54,392	2,993	48,212	0,746
19,63	9,21	58,657	6,653	44,863	0,592
21,58	8,95	70,459	3,963	33,860	0,511
25,80	8,52	68,682	6,719	22,651	0,627
28,30	9,24	72,509	4,372	6,420	0,507
31,63	9,76	72,421	5,065	3,154	0,000
36,38	10,37	79,315	5,098	11,741	0,477
38,92	10,20	83,497	6,072	0,000	0,493
41,00	10,31	74,384	5,768	0,000	0,000

* Substrato consiste na soma dos açúcares fermentescíveis (sacarose, glicose e frutose) por *S. cerevisiae* sem modificação genética.

Na Tabela 6.3, a concentração inicial microbiana foi de 3,62 g/L, mostrando que as células da batelada anterior não foram recuperadas totalmente. Isso se deve às perdas de parte do material precipitado durante a etapa de reciclo de células que envolviam bombeamento e centrifugação. É importante ressaltar que o volume de meio levado na etapa de centrifugação era relativamente grande em relação ao dos tubos de centrífuga, o que requeria grande manipulação com consequentes perdas de material nas paredes dos frascos, e durante a transferência do sobrenadante, com o qual era arrastado o precipitado.

Tabela 6.4 – Dados experimentais de fermentação em batelada a 30 °C e $S_0 = 116,591$ g/L

(h)	Concentrações (g/L)				
	X_t	Etanol	Glicerol	Substrato*	Ác, Acético
0,00	5,95	19,639	0,050	116,591	0,784
5,47	9,71	30,959	1,616	93,387	0,588
8,45	10,86	44,261	1,976	83,596	0,914
12,00	12,17	63,593	4,909	48,269	0,478
15,50	12,88	70,450	4,371	35,571	0,479
19,42	13,05	64,798	4,842	26,993	0,557
21,33	13,25	75,429	4,896	5,604	0,401
24,47	13,81	78,715	4,870	0,000	0,401
28,33	14,11	82,784	5,419	2,732	0,461
31,50	13,71	81,397	4,987	3,318	0,458
34,33	13,53	71,908	5,898	0,000	0,370
37,25	13,20	83,764	6,541	0,000	0,000

* Substrato consiste na soma dos açúcares fermentescíveis (sacarose, glicose e frutose) por *S. cerevisiae* sem modificação genética.

Tabela 6.5 – Dados experimentais de fermentação em batelada a 30 °C e $S_0 = 131,029$ g/L

t (h)	Concentrações (g/L)				
	X_t	Etanol	Glicerol	Substrato*	Ác. Acético
0,00	10,24	28,215	1,328	131,029	0,639
3,00	13,96	33,264	2,312	110,382	0,530
5,30	15,36	37,486	2,589	94,735	0,539
6,95	18,24	48,382	2,113	58,344	0,599
10,50	17,08	85,343	4,541	56,145	0,632
13,33	17,46	65,482	4,884	45,482	0,469
19,17	18,06	73,715	5,169	15,014	0,477
22,33	18,69	83,175	5,660	5,674	0,439
25,35	18,56	76,863	5,271	0,000	0,417
28,83	12,71	85,221	6,465	0,000	0,488

* Substrato consiste na soma dos açúcares fermentescíveis (sacarose, glicose e frutose) por *S. cerevisiae* sem modificação genética.

Nas Tabelas 6.6 a 6.10, são mostrados os perfis de concentração para a temperatura de 32 °C. Na Tabela 6.6, a levedura utilizada foi obtida a partir da etapa de inóculo. Já nos demais, foi utilizada levedura reciclada, previamente exposta a hidrolisado enzimático.

Tabela 6.6 – Dados experimentais de fermentação em batelada a 32 °C e $S_0= 141,263$ g/L

t (h)	Concentrações (g/L)				
	X_t	Etanol	Glicerol	Substrato*	Ác. Acético
0,00	2,82	1,308	1,284	141,263	0,624
2,10	2,97	4,908	2,556	134,886	0,984
5,10	3,97	18,696	3,576	111,352	0,864
7,10	4,55	20,694	3,846	97,280	0,978
9,18	4,73	27,780	4,290	75,647	0,936
12,52	5,03	36,612	4,890	58,787	0,966
14,18	5,54	43,074	5,334	53,651	1,050
16,53	5,98	46,947	5,211	34,871	0,810
18,52	6,37	55,257	5,817	27,287	0,789
21,10	6,41	59,145	5,922	4,335	0,699

* Substrato consiste na soma dos açúcares fermentescíveis (sacarose, glicose e frutose) por *S. cerevisiae* sem modificação genética.

Tabela 6.7 – Dados experimentais de fermentação em batelada a 32 °C e $S_0 = 167,877$ g/L

t (h)	X_t	Concentrações (g/L)			
		Etanol	Glicerol	Substrato*	Ác. Acético
0,00	3,56	10,224	2,256	167,877	0,624
3,65	4,54	20,664	3,288	134,185	0,948
6,92	5,56	32,736	4,020	107,348	0,780
10,17	6,42	41,496	4,812	91,513	0,696
13,12	6,86	48,108	4,878	71,401	0,954
16,12	7,14	61,416	6,498	66,138	1,086
19,12	7,47	64,392	6,684	52,041	0,978
21,48	7,29	67,476	6,474	40,325	0,858
24,48	7,59	81,363	7,413	34,351	0,849
26,30	7,28	76,056	6,912	24,720	0,768
30,53	7,45	80,535	7,116	17,387	0,804

* Substrato consiste na soma dos açúcares fermentescíveis (sacarose, glicose e frutose) por *S. cerevisiae* sem modificação genética.

Tabela 6.8 – Dados experimentais de fermentação em batelada a 32 °C e $S_0 = 152,257$ g/L

t (h)	Concentrações (g/L)				
	X_t	Etanol	Glicerol	Substrato*	Ác. Acético
0,00	4,76	21,492	2,676	152,257	0,840
2,00	5,17	22,392	3,096	139,959	0,828
5,10	6,63	31,848	4,068	106,936	0,780
8,60	7,56	49,536	5,220	89,435	0,720
12,00	8,16	64,662	6,012	67,962	0,762
14,50	8,75	69,876	6,042	54,013	0,756
18,52	9,04	85,842	6,972	37,195	0,660
20,52	9,19	78,744	6,942	25,268	0,642
23,90	10,51	88,431	7,161	18,448	0,753
25,90	10,48	86,463	6,996	16,273	0,744
29,42	9,90	80,598	6,426	11,013	0,756
34,50	9,06	88,611	7,002	12,180	0,801
37,55	10,14	84,258	6,570	10,392	0,780

* Substrato consiste na soma dos açúcares fermentescíveis (sacarose, glicose e frutose) por *S. cerevisiae* sem modificação genética.

Tabela 6.9 – Dados experimentais de fermentação em batelada a 32 °C e $S_0= 149,989$ g/L

t (h)	Concentrações (g/L)				
	X_t	Etanol	Glicerol	Substrato*	Ác. Acético
0,00	5,46	18,024	2,592	149,989	0,876
4,37	6,99	28,776	3,468	132,032	1,032
6,62	8,12	34,680	4,464	102,518	0,648
8,62	8,76	43,536	4,500	98,842	0,504
10,37	9,44	21,984	4,506	70,256	0,690
12,83	9,77	53,478	4,884	58,305	0,630
17,78	10,42	70,542	6,036	41,055	0,690
19,90	10,74	71,514	5,772	30,296	0,666
21,70	11,74	73,224	5,994	24,686	0,702
24,00	11,46	76,968	6,138	18,819	0,711
27,53	11,41	86,199	6,747	12,435	0,783
30,47	11,62	78,537	6,165	10,887	0,723
31,23	12,07	86,919	6,930	0,000	0,828

* Substrato consiste na soma dos açúcares fermentescíveis (sacarose, glicose e frutose) por *S. cerevisiae* sem modificação genética.

Tabela 6.10 – Dados experimentais de fermentação em batelada a 32 °C e $S_0 = 125,727$ g/L

t (h)	Concentrações (g/L)				
	X_t	Etanol	Glicerol	Substrato*	Ác. Acético
0,00	5,41	16,740	2,532	135,797	0,984
2,00	6,29	19,080	3,048	130,976	1,188
4,88	7,59	28,296	4,152	105,714	1,128
7,88	9,32	41,544	5,124	94,837	1,140
10,38	10,03	51,024	5,316	81,758	0,990
12,88	9,64	56,538	5,364	68,067	0,756
15,88	10,74	59,976	4,962	48,682	0,720
18,88	11,14	68,508	5,502	35,112	0,774
22,80	11,60	76,569	6,078	22,010	0,813
25,67	11,59	82,551	6,492	17,139	0,870
30,72	10,41	78,735	6,348	3,402	0,798
37,97	11,05	79,128	5,994	0,000	0,690

* Substrato consiste na soma dos açúcares fermentescíveis (sacarose, glicose e frutose) por *S. cerevisiae* sem modificação genética.

Nas Tabelas 6.11 a 6.17, são mostrados os perfis de concentração para a temperatura de 34 °C. Na Tabela 6.11, a levedura utilizada foi obtida a partir da etapa de inóculo. Já nos demais, foi utilizada levedura reciclada, previamente exposta a hidrolisado enzimático. Os resultados apresentados em todas as tabelas foram utilizados para o ajuste de parâmetros, exceto para os mostrados nas Tabelas 6.16 e 6.17, aplicados na etapa de validação do modelo matemático.

Tabela 6.11 – Dados experimentais de fermentação em batelada a 34 °C e $S_0= 150,628$ g/L

t (h)	Concentrações (g/L)				
	X_t	Etanol	Glicerol	Substrato*	Ác. Acético
0,00	2,69	2,436	1,092	150,628	0,708
2,57	2,86	7,104	1,980	127,877	0,660
4,67	3,66	12,456	3,828	101,789	0,504
6,37	4,03	23,346	3,276	98,338	0,462
10,95	5,19	34,044	3,924	70,351	0,456
13,62	5,57	44,700	4,710	52,464	0,498
20,35	6,33	65,460	6,384	24,966	0,528
23,38	6,24	73,140	6,324	15,984	0,570
26,95	6,51	68,328	5,676	0,000	0,540
30,45	6,39	72,495	5,946	0,000	0,513

* Substrato consiste na soma dos açúcares fermentescíveis (sacarose, glicose e frutose) por *S. cerevisiae* sem modificação genética.

Tabela 6.12 – Dados experimentais de fermentação em batelada a 34 °C e $S_0 = 133,737$ g/L

t (h)	Concentrações (g/L)				
	X_t	Etanol	Glicerol	Substrato*	Ác. Acético
0,00	5,91	20,976	2,340	133,737	1,032
2,58	6,88	20,808	2,748	127,764	0,756
6,67	7,92	29,724	4,836	103,291	0,624
9,92	8,91	39,132	4,332	91,364	0,648
12,67	9,54	50,358	5,166	76,966	0,594
16,92	10,00	63,000	5,238	58,854	0,618
20,67	10,40	66,198	6,738	33,978	0,606
23,12	10,69	69,828	6,816	25,716	0,624
24,68	11,96	66,858	5,514	14,976	0,600
28,10	11,01	76,074	7,188	10,578	0,612
30,93	11,11	82,950	7,173	0,000	0,579
36,77	10,66	83,799	7,161	0,000	0,567

* Substrato consiste na soma dos açúcares fermentescíveis (sacarose, glicose e frutose) por *S. cerevisiae* sem modificação genética.

Tabela 6.13 – Dados experimentais de fermentação em batelada a 34 °C e $S_0= 143,263$ g/L

t (h)	Concentrações (g/L)				
	X_t	Etanol	Glicerol	Substrato*	Ác. Acético
0,00	6,43	23,952	2,556	143,263	1,260
3,07	8,07	28,140	3,120	125,967	0,780
6,25	9,39	36,792	3,780	97,579	0,660
9,50	10,17	47,028	4,164	76,700	0,630
12,33	10,64	57,222	4,842	68,410	0,684
15,70	11,49	61,830	5,460	51,516	0,654
19,87	12,00	70,062	6,255	21,849	0,576
29,25	12,12	78,810	6,642	0,000	0,612
39,58	12,09	80,838	6,894	0,000	0,654

* Substrato consiste na soma dos açúcares fermentescíveis (sacarose, glicose e frutose) por *S. cerevisiae* sem modificação genética.

Tabela 6.14 – Dados experimentais de fermentação em batelada a 34 °C e $S_0= 140,553$ g/L

t (h)	Concentrações (g/L)					
	X_t	X_v	Etanol	Glicerol	Substrato *	Ác. Acético
0,00	7,98	5,82	22,512	2,136	140,553	1,080
4,08	10,69	7,80	31,236	3,132	122,536	0,648
7,75	11,87	8,67	43,344	7,344	104,029	0,612
10,75	12,45	9,09	52,200	4,236	87,112	0,540
13,47	12,55	9,16	57,360	4,338	71,007	0,426
16,38	13,09	9,56	59,826	4,644	61,475	0,462
19,38	13,17	9,62	69,552	4,896	42,072	0,480
22,67	13,14	9,59	75,348	5,562	26,472	0,294
29,00	13,59	9,92	82,488	8,502	15,750	0,294
31,75	13,42	9,80	80,529	6,843	0,000	0,384
36,03	13,84	10,10	84,255	6,339	0,000	0,411

* Substrato consiste na soma dos açúcares fermentescíveis (sacarose, glicose e frutose) por *S. cerevisiae* sem modificação genética.

Na Tabela 6.14 além da concentração das células totais (X_t), foi especificada a de células viáveis (X_v). Em todos os experimentos a viabilidade foi monitorada, porém neste, a mesma ficou abaixo de 100 %. Essa perda de viabilidade ocorria quando na etapa de reciclo de células e decantação, as mesmas eram deixadas em repouso por tempos maiores.

Tabela 6.15– Dados experimentais de fermentação em batelada a 34 °C e $S_0= 148,604$ g/L

t (h)	Concentrações (g/L)					
	X_t	X_V	Etanol	Glicerol	Substrato*	Ác. Acético
0,00	9,46	6,71	23,520	2,256	148,604	0,840
2,30	10,96	7,78	23,100	2,616	134,422	0,684
3,95	11,36	8,07	25,248	3,72	135,139	0,684
5,3	11,95	8,48	32,202	3,642	130,142	0,684
9,67	13,09	9,30	44,718	4,404	103,900	0,642
18,17	15,43	10,95	64,452	5,202	62,067	0,642
23,38	14,75	10,47	71,646	5,736	48,225	0,624
27,42	15,48	10,99	80,184	6,15	21,696	0,636
29,25	15,32	10,88	80,499	5,454	16,734	0,519
34,33	15,01	10,66	84,882	5,793	0,000	0,585
44,55	15,48	10,99	88,479	6,138	0,000	0,645

* Substrato consiste na soma dos açúcares fermentescíveis (sacarose, glicose e frutose) por *S. cerevisiae* sem modificação genética.

Tabela 6.16 – Dados experimentais de fermentação em batelada a 34 °C e $S_0= 140,294$ g/L

t (h)	Concentrações (g/L)					
	X_t	X_V	Etanol	Glicerol	Substrato*	Ác. Acético
0,00	8,50	5,44	25,068	2,904	140,294	1,380
3,87	10,30	6,59	24,780	3,816	134,659	0,876
7,08	11,16	7,14	30,612	3,600	124,619	0,876
11,38	12,94	8,28	39,096	4,152	101,582	0,780
14,83	12,53	8,02	48,768	4,896	90,905	0,696
17,07	13,48	8,63	53,478	4,938	78,574	0,630
20,73	14,95	9,57	59,400	5,190	66,170	0,638
23,17	14,30	9,15	65,487	5,238	58,171	0,594
24,72	13,69	8,76	69,150	5,778	57,215	0,650
29,72	14,08	9,01	71,592	5,862	41,710	0,756
31,67	14,47	9,26	74,424	5,670	23,250	0,623
33,83	14,02	8,97	79,416	5,832	20,445	0,612
37,00	14,28	9,14	85,386	6,252	15,246	0,630
39,78	13,67	8,75	85,386	6,360	11,607	0,603
45,45	14,66	9,38	86,964	6,540	0,000	0,630

* Substrato consiste na soma dos açúcares fermentescíveis (sacarose, glicose e frutose) por *S. cerevisiae* sem modificação genética.

Tabela 6.17 – Dados experimentais de fermentação em batelada a 34 °C e $S_0=143,436$ g/L

t (h)	Concentrações (g/L)				
	X_t	Etanol	Glicerol	Substrato*	Ác. Acético
0,00	5,91	22,860	2,172	143,436	0,924
1,83	7,23	25,860	2,364	139,139	0,876
5,00	8,02	36,264	2,796	117,435	0,828
7,95	8,79	53,664	4,386	89,168	0,684
10,57	8,65	57,612	4,548	76,646	0,744
13,12	9,78	65,406	4,956	69,278	0,66
16,80	9,70	71,394	5,340	58,187	0,708
20,67	10,96	72,828	5,541	33,666	0,621
33,05	10,28	84,741	6,378	0,000	0,627
37,67	10,12	85,788	6,201	0,000	0,627

* Substrato consiste na soma dos açúcares fermentescíveis (sacarose, glicose e frutose) por *S. cerevisiae* sem modificação genética.

Nas Tabelas 6.18 a 6.22, são mostrados os perfis de concentração para a temperatura de 36 °C. Na Tabela 6.18, a levedura utilizada foi obtida a partir da etapa de inóculo. Já nos demais, foi utilizada levedura reciclada, previamente exposta a hidrolisado enzimático.

Tabela 6.18 – Dados experimentais de fermentação em batelada a 36 °C e $S_0= 149,325$ g/L

t (h)	Concentrações (g/L)				
	X_t	Etanol	Glicerol	Substrato*	Ác. Acético
0,00	3,06	1,968	1,008	149,325	0,780
3,58	3,97	14,856	2,556	123,701	0,732
6,00	4,40	18,552	3,612	105,494	0,600
9,75	5,46	31,950	4,512	77,154	0,546
11,58	5,42	35,712	4,584	64,871	0,576
14,33	6,36	45,516	5,190	42,294	0,612
16,30	6,34	55,431	4,926	30,345	0,519
19,30	6,62	51,096	5,688	14,337	0,582
23,25	6,83	59,055	5,676	0,000	0,567
27,08	6,44	62,940	5,679	0,000	0,564

* Substrato consiste na soma dos açúcares fermentescíveis (sacarose, glicose e frutose) por *S. cerevisiae* sem modificação genética.

Tabela 6.19 – Dados experimentais de fermentação em batelada a 36 °C e $S_0= 138,852$ g/L

t (h)	Concentrações (g/L)				
	X_t	Etanol	Glicerol	Substrato*	Ác. Acético
0,00	4,28	11,940	2,652	138,852	1,248
2,05	4,85	14,364	2,160	116,605	0,684
5,13	6,35	30,876	3,468	103,562	0,624
8,68	7,12	48,702	4,338	78,987	0,540
11,68	7,19	58,914	5,040	58,596	0,522
13,68	7,51	58,404	4,944	36,000	0,528
15,68	7,98	69,258	5,208	19,008	0,471
21,33	8,55	72,465	5,424	0,000	0,507
23,83	9,04	74,745	5,361	0,000	0,456

Tabela 6.20 – Dados experimentais de fermentação em batelada a 36 °C e $S_0= 163,627$ g/L

t (h)	Concentrações (g/L)				
	X_t	Etanol	Glicerol	Substrato*	Ác. Acético
0,00	6,82	18,468	2,700	163,627	0,948
2,00	7,90	26,952	2,952	137,236	0,864
4,05	8,83	32,076	3,468	119,674	0,768
7,05	10,27	44,802	4,590	100,136	0,714
10,05	11,54	0,000	5,538	77,511	0,690
11,10	11,39	56,010	5,016	70,196	0,660
14,33	11,88	70,410	5,286	42,312	0,690
16,83	12,06	70,959	5,613	28,059	0,630
19,37	11,35	85,431	6,435	16,572	0,705

* Substrato consiste na soma dos açúcares fermentescíveis (sacarose, glicose e frutose) por *S. cerevisiae* sem modificação genética.

Tabela 6.21 – Dados experimentais de fermentação em batelada a 36 °C e $S_0= 134,761$ g/L

t (h)	Concentrações (g/L)				
	X_t	Etanol	Glicerol	Substrato*	Ác. Acético
0,00	8,28	21,456	2,940	134,761	0,876
2,92	9,24	25,296	2,664	108,998	0,732
5,33	10,46	38,292	3,564	95,839	0,768
7,33	10,52	46,470	4,386	86,440	0,708
11,00	12,30	51,990	4,038	54,467	0,612
14,25	12,53	63,564	5,160	36,756	0,708
19,25	12,68	69,305	5,928	13,137	0,711
24,50	13,06	77,120	6,342	0,000	0,774

* Substrato consiste na soma dos açúcares fermentescíveis (sacarose, glicose e frutose) por *S. cerevisiae* sem modificação genética.

Tabela 6.22 – Dados experimentais de fermentação em batelada a 36 °C e $S_0 = 102,690$ g/L

t (h)	Concentrações (g/L)				
	X_t	Etanol	Glicerol	Substrato*	Ác. Acético
0,00	10,70	26,820	3,012	102,690	0,744
4,00	13,07	42,426	4,518	70,252	0,654
7,67	13,66	54,762	4,728	56,057	0,696
9,83	13,83	55,722	3,912	33,396	0,666
9,83	14,23	68,088	5,172	32,382	0,726
10,80	14,15	75,486	4,974	20,154	0,828
13,83	14,06	74,664	5,604	0,000	0,648
15,83	13,67	83,841	6,084	0,000	0,738
19,28	14,20	86,619	6,243	0,000	0,756

* Substrato consiste na soma dos açúcares fermentescíveis (sacarose, glicose e frutose) por *S. cerevisiae* sem modificação genética.

Nas Tabelas 6.23 a 6.26, são mostrados os perfis de concentração para a temperatura de 38 °C. Na Tabela 6.23, a levedura utilizada foi obtida a partir da etapa de inóculo. Já nos demais, foi utilizada levedura reciclada, previamente exposta a hidrolisado enzimático.

Para a temperatura de 38 °C, 4 bateladas foram apresentadas, sendo que uma delas foi perdida devido à corte de energia.

Tabela 6.23 – Dados experimentais de fermentação em batelada a 38 °C e $S_0= 147,701$ g/L

t (h)	Concentrações (g/L)				
	X_t	Etanol	Glicerol	Substrato*	Ác. Acético
0,00	2,22	1,776	0,576	147,701	0,576
2,02	3,60	6,024	0,000	136,820	0,576
6,15	4,22	21,300	3,048	100,570	0,444
8,15	4,82	30,270	3,276	88,904	0,372
11,02	5,26	39,564	4,680	69,876	0,330
14,18	5,26	43,602	5,490	57,764	0,330
17,85	6,09	43,374	5,538	28,608	0,366
19,60	6,99	61,620	6,306	19,056	0,600
23,60	5,46	70,548	6,036	0,000	0,321
26,60	5,82	70,017	6,336	0,000	0,396

* Substrato consiste na soma dos açúcares fermentescíveis (sacarose, glicose e frutose) por *S. cerevisiae* sem modificação genética.

Tabela 6.24 – Dados experimentais de fermentação em batelada a 38 °C e $S_0 = 126,254$ g/L

t (h)	Concentrações (g/L)				
	X_t	Etanol	Glicerol	Substrato*	Ác. Acético
0,00	3,53	15,348	0,000	126,254	0,732
4,00	3,60	24,252	2,292	112,797	0,504
10,00	4,54	35,028	4,392	84,823	0,492
13,00	5,03	52,986	4,698	77,079	0,474
16,00	5,09	56,856	4,710	61,222	0,480
19,00	5,62	60,636	5,028	54,926	0,510
22,00	6,09	64,482	4,854	42,978	0,480
25,00	6,16	73,659	5,607	26,169	0,426
28,00	6,43	78,885	5,676	16,122	0,558
30,92	6,42	81,216	5,697	13,092	0,513
35,42	6,09	77,244	5,358	0,000	0,528

* Substrato consiste na soma dos açúcares fermentescíveis (sacarose, glicose e frutose) por *S. cerevisiae* sem modificação genética.

Tabela 6.25 – Dados experimentais de fermentação em batelada a 38 °C e $S_0=137,650$ g/L

t (h)	Concentrações (g/L)				
	X_t	Etanol	Glicerol	Substrato*	Ác. Acético
0,00	5,84	20,952	2,496	137,650	0,972
3,08	6,06	21,372	2,532	125,061	0,984
6,50	7,41	26,556	2,976	121,595	0,912
9,33	8,00	35,784	3,636	111,029	0,000
12,83	8,06	42,444	4,344	92,014	0,888
21,25	8,04	60,684	4,392	66,497	0,918
27,25	9,36	66,330	4,422	38,214	0,882
30,58	9,05	74,520	4,833	29,103	0,807
33,50	7,96	72,522	4,962	19,032	0,864
37,33	7,99	76,887	4,821	13,620	0,858
40,33	8,01	77,229	5,223	0,000	0,750

* Substrato consiste na soma dos açúcares fermentescíveis (sacarose, glicose e frutose) por *S. cerevisiae* sem modificação genética.

Tabela 6.26 – Dados experimentais de fermentação em batelada a 38 °C e $S_0 = 131,230$ g/L

t (h)	Concentrações (g/L)				
	X_t	Etanol	Glicerol	Substrato*	Ác. Acético
0,00	6,27	22,680	1,800	131,230	1,044
5,00	7,30	28,068	2,208	123,597	0,924
7,17	7,67	34,008	2,244	111,674	0,876
9,92	8,16	41,536	2,839	86,955	0,858
12,17	8,21	40,062	3,060	93,706	0,822
15,17	8,53	49,501	3,286	68,185	0,779
18,67	8,47	50,898	3,576	70,877	0,786
22,00	8,96	59,460	3,846	50,820	0,810
25,50	8,86	67,200	4,380	45,006	0,870
27,50	9,27	66,594	4,194	37,728	0,804
33,33	8,75	68,226	4,209	19,209	0,711
36,33	9,16	75,162	4,668	17,208	0,753
37,92	9,00	73,243	4,692	19,823	0,739
40,17	8,65	76,596	4,917	13,257	0,768
46,50	6,27	77,139	4,836	0,000	0,744

* Substrato consiste na soma dos açúcares fermentescíveis (sacarose, glicose e frutose) por *S. cerevisiae* sem modificação genética.

Foi realizada também uma fermentação em batelada a 34 °C, utilizando com meio de cultivo melaço de cana-de-açúcar diluído com água, sem adição de hidrolisado. Antes do início da fermentação, as células foram centrifugadas por duas vezes e submetidas à lavagem para retirada dos componentes presentes no inóculo, que possivelmente poderiam influenciar na taxa de crescimento microbiano. O objetivo do experimento foi comparar esses dados de fermentação com os que envolviam adição de hidrolisado. Os resultados são mostrados na Tabela 6.27. Pode-se observar que o tempo de fermentação foi em torno de 22,33 h, sendo consideravelmente menor que todos os outros experimentos a 34 °C nos quais o meio continha hidrolisado.

Tabela 6.27 – Dados experimentais de fermentação em batelada a 34 °C e $S_0 = 130,438$ g/L. Meio utilizado foi melaço de cana-de-açúcar e água (sem adição de hidrolisado).

t (h)	Concentrações (g/L)		
	X_t	Etanol	Substrato*
0,00	2,513	1,356	130,438
2,00	3,103	5,640	112,091
4,00	3,931	14,364	99,673
6,00	4,250	19,602	81,971
8,00	4,594	25,494	69,528
10,00	4,964	29,958	53,844
11,50	5,101	35,250	49,146
14,50	5,399	44,016	34,986
17,50	5,677	49,758	20,904
19,50	5,636	49,329	11,943
22,33	5,937	57,660	0,000
24,33	5,540	59,775	0,000

* Substrato consiste na soma dos açúcares fermentescíveis (sacarose, glicose e frutose) por *S. cerevisiae* sem modificação genética.

6.3 Ajuste dos parâmetros cinéticos da fermentação alcoólica da mistura melaço e hidrolisado, sem reciclo de células

Para o ajuste dos parâmetros cinéticos em função da temperatura, foram utilizados 5 experimentos (cujos resultados estão apresentados nas Tabelas 6.2, 6.6, 6.11, 6.18 e 6.23) nos quais as células utilizadas partiram de um inóculo propagado e mantido em incubadora, sem a realização de reciclo. A diferença entre esses experimentos foi somente a concentração inicial de substrato e temperatura utilizada no fermentador.

O modelo matemático utilizado nos ajustes é formado pelas equações de balanço de massa 2.1, 2.2 e 2.3, com taxas cinéticas. As taxas cinéticas são dadas pelas expressões 2.32, 2.46

e 2.48, sendo que a equação 2.46 foi modificada neste caso para representar fermentação com meio contendo ácido acético, como desenvolvido no artigo apresentado no Capítulo 5 (Equação 8), o que resultou na expressão 6.1.

$$r_x = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \exp(-K_i S) \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right)^m \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)^n X \left(1 - \frac{C_{Ac}}{C_{Ac \max}}\right)^{nn} \quad (6.1)$$

O sistema composto pelas equações citadas é formado por 13 parâmetros, dos quais 7 deles serão ajustados através do algoritmo de otimização por quasi-Newton, sendo portanto: $\mu_{\max}$, $X_{\max}$, $P_{\max}$, Y_x , $Y_{p/x}$, $C_{Ac \max}$ e nn . A escolha dos parâmetros a serem ajustados foi feita com base na análise de sensibilidade dos parâmetros cinéticos realizada no artigo de Andrade *et al.* (2009), apresentado no Capítulo 4. Neste trabalho concluiu-se que os 4 parâmetros com maior influência nos perfis de concentração de células (X), etanol (P) e no tempo de consumo de substrato (t) eram: $\mu_{\max}$, $P_{\max}$, Y_x , $Y_{p/x}$. No caso atual decidiu-se reajustar também o parâmetro $X_{\max}$, já que no trabalho de Andrade *et al.* (2009) trabalhou-se com uma batelada apenas e, logo, com baixa concentração de células. O ajuste dos parâmetros associados à inibição por ácido acético é necessário já que no trabalho de Andrade *et al.* (2009) o modelo não possuía este termo. Os demais parâmetros foram mantidos fixos nos valores determinados por Andrade *et al.* (2007): $K_s = 4,1$ (kg/m³), $m_p = 0,1$, $m_x = 0,2$, $m = 1,0$, $K_i = 0,004$ e $n = 1,5$.

A otimização apresentada consiste em encontrar valores ótimos dos parâmetros que minimizam uma função objetivo, formados por valores experimentais e computados com a utilização do modelo, conforme descrito no algoritmo descrito no artigo apresentado no Capítulo 4. Os parâmetros relevantes foram ajustados em função da temperatura para os dados experimentais apresentados nas Tabelas 6.2, 6.6, 6.11, 6.18 e 6.23.

A Tabela 6.28 apresenta os valores dos parâmetros cinéticos ajustados para cada temperatura de fermentação, considerando a mistura de melaço e hidrolisado (66,67 %), sem reciclo de células. Pode-se observar que a velocidade máxima específica de crescimento para a linhagem de levedura *S. cerevisiae* utilizada ocorreu a 34 °C, sendo que o valor deste parâmetro diminuiu conforme se afastava dessa temperatura, apresentando maior queda para 38 °C.

É importante observar que inicialmente, o $\mu_{m\acute{a}x}$ foi estimado através da Equação de Monod (Eq. 2.13), utilizando método gráfico, porém no caso que envolve inibição por produto em batelada, métodos de linearização não são suficientes para obtenção de valores confiáveis.

Em todos os experimentos do Capítulo 6, para estimação inicial dos valores de $Y_{p/x}$, foi plotado μ_p (obtido dos valores experimentais diretamente, Eq. 2.6) por μ_x (Eq. 2.4), cujo coeficiente angular equivale ao valor do parâmetro $Y_{p/x}$, e linear ao Y_x , conforme expressão determinada por Piret (Eq. 2.33). Aplicando o método gráfico, os valores obtidos para Y_x foram bastante imprecisos, pois requerem alta acurácia dos dados experimentais. Os valores de $Y_{p/x}$ encontrados apesar de apresentarem flutuações para a mesma temperatura, serviram como estimativa inicial (não apresentados na tese) para ajuste do modelo através da rotina de otimização quasi-Newton.

Tabela 6.28 – Parâmetros cinéticos em função da temperatura para as bateladas iniciadas a partir do inóculo (sem reciclo de células). O meio utilizado foi uma mistura de melaço e hidrolisado

Parâmetros	Temperatura de fermentação (°C)				
*	30,0	32,0	34,0	36,0	38,0
$\mu_{m\acute{a}x}$ (h ⁻¹)	0,150	0,180	0,190	0,179	0,145
$X_{m\acute{a}x}$ (g/L)	71,900	55,000	43,000	39,800	39,800
$P_{m\acute{a}x}$ (g/L)	96,000	81,340	75,000	72,400	72,020
Y_x	0,039	0,038	0,034	0,031	0,025
$Y_{p/x}$	12,000	13,300	14,330	15,200	16,000

Os parâmetros C_{Acmax} e nn foram estimados em 4,0 g/L e 0,3; respectivamente, para todas as temperaturas.

Tabela 6.29 – Parâmetros cinéticos calculados em função da temperatura para expressões obtidas por Andrade (2007). O meio utilizado foi melaço diluído com água

Parâmetros	Temperatura de fermentação (°C)				
*	30,0	32,0	34,0	36,0	38,0
$\mu_{m\acute{a}x}$ (h ⁻¹)	0,222	0,314	0,387	0,401	0,298
$X_{m\acute{a}x}$ (g/L)	79,929	48,654	42,902	39,482	36,757
$P_{m\acute{a}x}$ (g/L)	129,883	75,184	74,784	76,159	77,501
Y_x	0,043	0,040	0,037	0,036	0,034
$Y_{p/x}$	3,961	9,367	9,895	10,032	10,121

A Figura 6.3 apresenta uma comparação entre os valores de $\mu_{m\acute{a}x}$ obtidos por Andrade (2007), o qual utilizou melaço de cana de açúcar como meio de cultivo; e os ajustados com dados de fermentação considerando uma mistura de hidrolisado e melaço, sem reciclo de células. Os valores deste parâmetro quando se usa hidrolisado misturado ao melaço foram menores para todas as temperaturas apresentadas, sendo que as maiores diferenças ocorreram para 34 e 36 °C, sendo aproximadamente 50 % do valor original. Este parâmetro cinético é comumente utilizado para se medir a adaptação do microrganismo ao meio e classificação do desempenho de cepas, e neste caso demonstra a maior facilidade de crescimento da *S. cerevisiae* no meio sem adição de hidrolisado. O efeito da temperatura neste parâmetro mostrou não apresentar grande influência quando se adiciona hidrolisado, se comparado com a fermentação à base de melaço diluído.

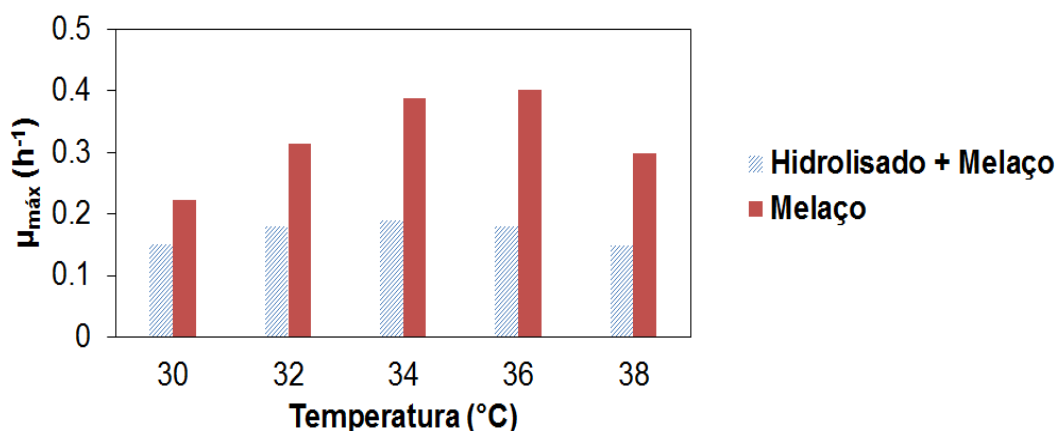


Figura 6.3 – Comparação entre os valores de $\mu_{m\acute{a}x}$ ajustados a partir de dados de fermentação, considerando meio com mistura de hidrolisado e melaço, e melaço diluído em água.

Já na Figura 6.4, os valores do parâmetro $X_{m\acute{a}x}$ obtidos através do ajuste do modelo, ficaram muito próximos nos casos da mistura melaço e hidrolisado, e melaço diluído com água, apresentando maior diferença para temperaturas mais baixas. A 30 °C, o valor de $X_{m\acute{a}x}$ com adição de hidrolisado foi inferior ao melaço diluído com água, o que sugere maior inibição do crescimento microbiano pela concentração celular em presença de caldo hidrolisado.

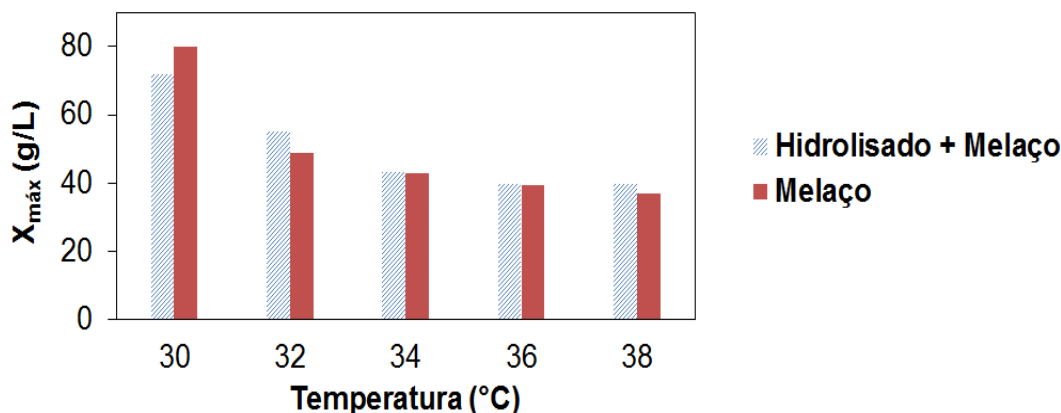


Figura 6.4 – Comparação entre os valores de $X_{m\acute{a}x}$ ajustados a partir de dados de fermentação, considerando meio com mistura de hidrolisado e melaço, e melaço diluído em água.

Na Figura 6.5 são mostrados que os valores de $P_{m\acute{a}x}$ obtidos foram praticamente iguais para ambos os casos, em todas as temperaturas, com exceção de 30 °C, no qual a adição de

hidrolisado mostrou reduzir seu valor. Este comportamento mostra uma maior toxicidade do etanol no crescimento microbiano quando se adicionou caldo hidrolisado no meio, provavelmente pelo efeito sinérgico deste produto com algum componente tóxico presente no hidrolisado. Para as fermentações contendo os dois tipos de meio, o comportamento do $P_{máx}$ é praticamente o mesmo, decrescendo com aumento de temperatura, o que sugere maiores toxicidades por etanol à altas temperaturas. No trabalho de Andrade (2007), a levedura apresentava grande inibição à presença de etanol a 30 °C, sendo que a inibição total do seu crescimento acontecia com o produto em torno de 125 g/L. Já com adição de hidrolisado, a Figura 6.5 sugere que o efeito inibitório total ocorre em torno de 100 g/L, sugerindo possível aumento de toxicidade em meios contendo hidrolisado.

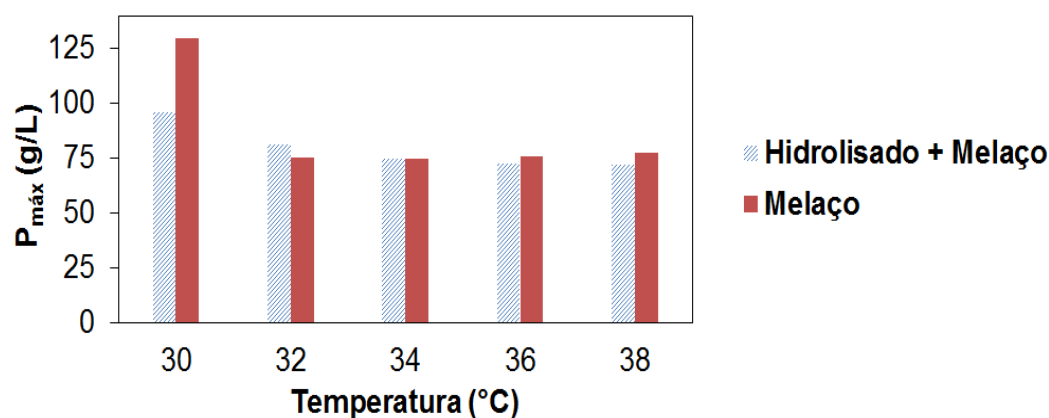


Figura 6.5 – Comparação entre os valores de $P_{máx}$ ajustados a partir de dados de fermentação, considerando meio com mistura de hidrolisado e melaço, e melaço diluído em água.

Na Figura 6.6, o parâmetro Y_x apresentou comportamento semelhante às fermentações com melaço, mostrando menor crescimento celular, e consequentemente, rendimento, conforme se aumentava a temperatura. A adição de hidrolisado no meio mostrou ter impacto negativo na concentração final de células, se comparado com fermentação de melaço diluído.

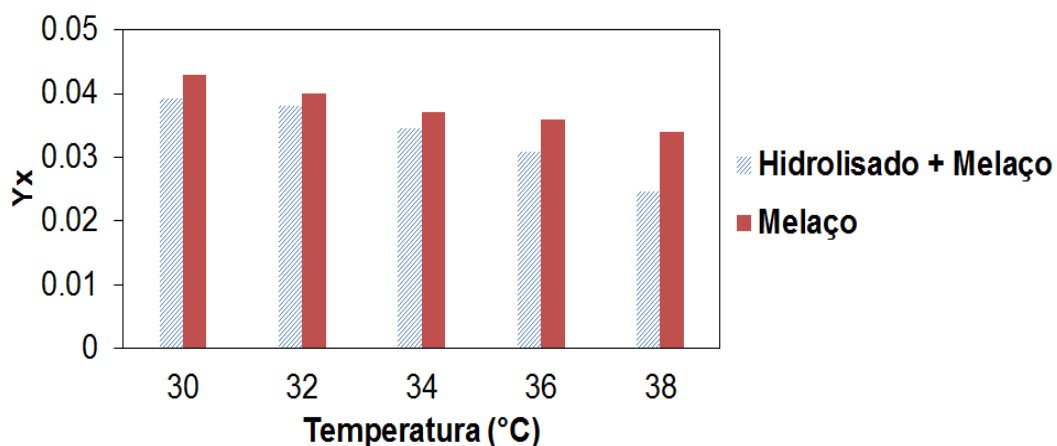


Figura 6.6 – Comparação entre os valores de Y_x ajustados a partir de dados de fermentação, considerando meio com mistura de hidrolisado e melaço, e melaço diluído em água.

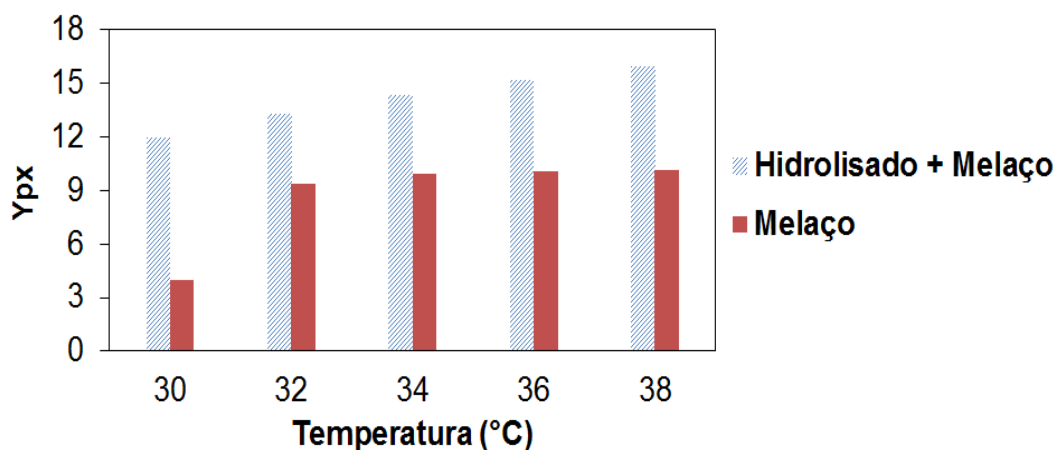


Figura 6.7 – Comparação entre os valores de $Y_{p/x}$ ajustados a partir de dados de fermentação, considerando meio com mistura de hidrolisado e melaço, e melaço diluído em água.

Na Figura 6.7, nota-se que o rendimento de etanol em relação à quantidade de células presentes no reator ($Y_{p/x}$) aumenta com a temperatura, sendo que a temperaturas mais altas, a levedura tende a produzir mais produto e menos células, e para mais baixas, o metabolismo da mesma é desviado para crescimento celular, sendo esta última condição a comumente utilizada

em fase de crescimento de inóculos. Ainda, pode-se observar que os valores do parâmetro $Y_{p/x}$ obtidos foram consideravelmente mais altos nas fermentações com adição de hidrolisado. Este mesmo comportamento foi observado em outros trabalhos encontrados na literatura, como em Maiorella *et al.* (1983), o qual explica que em baixas concentrações de ácido acético no meio, as células requerem maior quantidade de ATP para expulsar o excesso de prótons presentes no seu citoplasma. A energia requerida para este propósito é produzida de forma associada com a formação de etanol, e assim, ocorre um detrimento do crescimento celular e aumento da formação do produto. Portanto, na fermentação do caldo hidrolisado com melaço, neste caso, os altos valores de $Y_{p/x}$ são explicados como resultantes da baixa concentração de ácido acético presente no hidrolisado.

Os 5 parâmetros cinéticos ($\mu_{máx}$, $X_{máx}$, $P_{máx}$, Y_x e $Y_{p/x}$) apresentados na Tabela 6.28, ajustados a partir de dados experimentais colhidos para fermentação de uma mistura de hidrolisado e melaço foram plotados em função da temperatura, como apresentados nas Figuras 6.8 – 6.12. Na Figura 6.8, o parâmetro $\mu_{máx}$ atinge valor mais alto para a temperatura de 34 °C, sendo que, conforme se distancia desta, este caiu de forma significativa, principalmente para altas temperaturas (próximas a 38 °C), indicando que uma velocidade específica de crescimento microbiano mais baixa ocorre nesta faixa. Este parâmetro é bastante importante para se caracterizar o desempenho do crescimento de uma linhagem de levedura em um determinado meio (STECKELBERG, 2001). Assim, o valor de $\mu_{máx}$ obtido para 34 °C menor que 0,2 h⁻¹ indica a dificuldade dessa linhagem microbiana em crescer no meio contendo hidrolisado, se comparado com melaço diluído, no qual este valor ficou em torno de 0,387 h⁻¹, como apresentado na Tabela 6.29. A queda no valor de $\mu_{máx}$ para o meio contendo hidrolisado possivelmente ocorre devido à toxicidade de compostos presentes neste meio, principalmente ácido acético.

É importante ressaltar que a queda significativa nos valores de $\mu_{máx}$ obtidos resulta em grande impacto no perfil de consumo de substrato do meio quando se adiciona hidrolisado, e centrifuga o inóculo, já que os nutrientes utilizados no inóculo não são levados à fermentação. Em um trabalho anterior, Andrade (2007) concluiu que este parâmetro apresentava impacto negativo no tempo de fermentação, ou seja, conforme se reduz o valor de $\mu_{máx}$, ocorre um

aumento do tempo de fermentação, o qual é uma variável bastante relevante para o setor industrial.

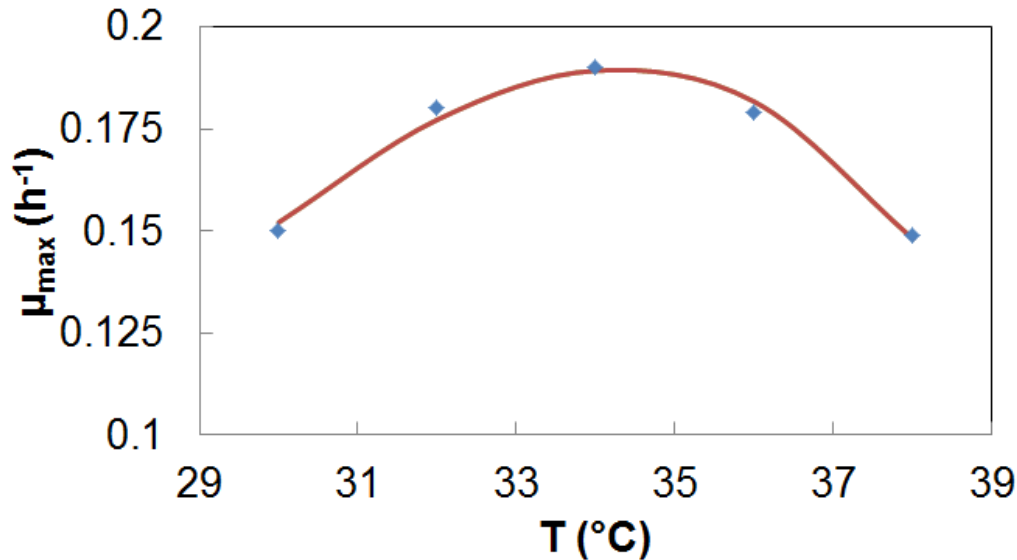


Figura 6.8 – Dependência de μ_{max} com temperatura. O símbolo (♦) representa os valores otimizados para cada temperatura utilizando o algoritmo Quasi-Newton, a linha (---) a descrição do parâmetro pela equação de Arrhenius. Os parâmetros representam a cinética para mistura de hidrolisado e melaço.

Na Figura 6.9, pode-se observar uma queda no valor de $X_{máx}$ com o aumento da temperatura na faixa de 30 a 36 °C. Isto indica que, a baixas temperaturas, a levedura apresenta menor inibição do seu crescimento pela concentração de células (acima de 70 g/L), sendo que em 36 °C, ocorre um máximo de inibição. Este parâmetro representa a concentração de células na qual cessa o crescimento microbiano devido à redução no transporte de oxigênio e nutrientes pelo meio quando se trabalha com altas densidades celulares. Comportamento similar ocorre na Figura 6.10, onde o valor do parâmetro $P_{máx}$ apresentou uma queda com a temperatura. Isso indica maior toxicidade do etanol sobre essa linhagem de levedura à temperatura de 38 °C, sendo que, neste caso, o crescimento microbiano seria completamente cessado quando a concentração de etanol no meio alcançasse aproximadamente 72 g/L. Pela mesma figura, à temperatura de 30 °C, o valor de $P_{máx}$ encontrado foi de 96 g/L, contra os 129,8 g/L para fermentação de melaço diluído (Tabela 6.29). Isto sugere que à temperatura de 30 °C, o etanol passa a ser mais tóxico para esta linhagem

de levedura, em concentração mais baixa, quando se adiciona hidrolisado no meio.

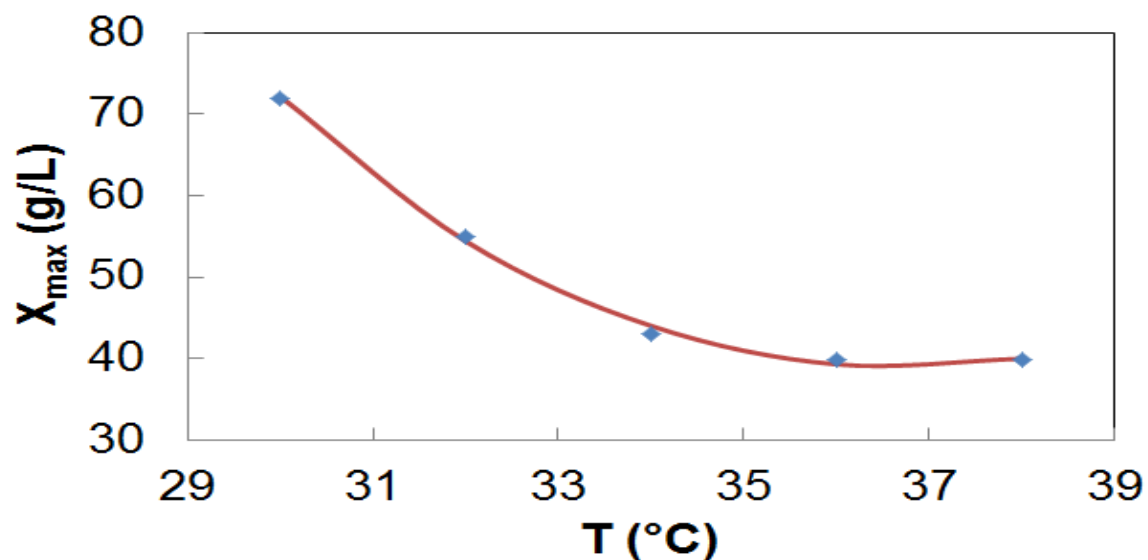


Figura 6.9 – Dependência de X_{max} com temperatura. O símbolo (♦) representa os valores otimizados para cada temperatura utilizando o algoritmo Quasi-Newton, a linha (---) a descrição do parâmetro pela equação de Arrhenius. Os parâmetros representam a cinética para mistura de hidrolisado e melaço.

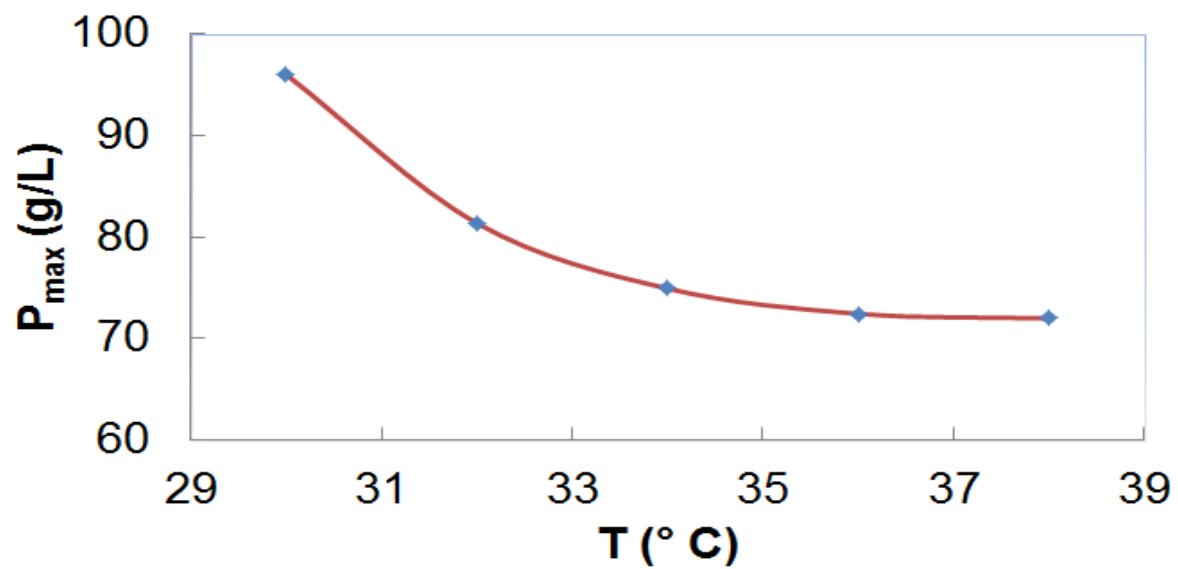


Figura 6.10 – Dependência de P_{max} com temperatura. O símbolo (♦) representa os valores otimizados para cada temperatura utilizando o algoritmo Quasi-Newton, a linha (---) a descrição do parâmetro pela equação de Arrhenius. Os parâmetros representam a cinética para mistura de hidrolisado e melaço.

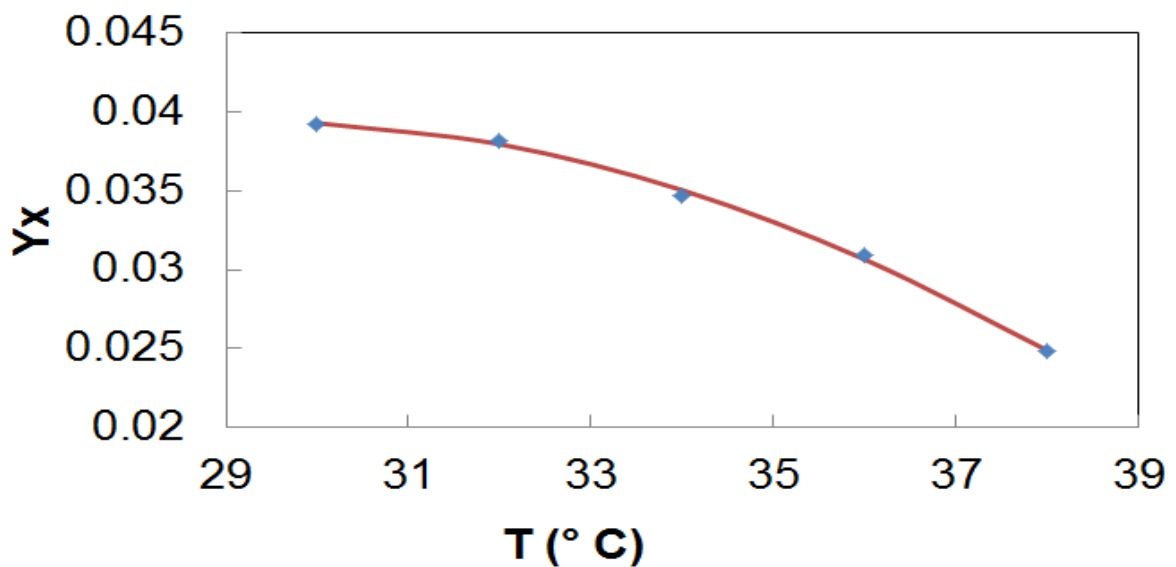


Figura 6.11 – Dependência de Y_x com temperatura. O símbolo (♦) representa os valores otimizados para cada temperatura utilizando o algoritmo Quasi-Newton, a linha (---) a descrição do parâmetro pela equação de Arrhenius. Os parâmetros representam a cinética para mistura de hidrolisado e melaço.

Na Figura 6.11, o rendimento limite em células alcançou valor máximo à temperatura de 30 °C, na qual o metabolismo microbiano resulta em maior crescimento celular e coincide com a temperatura usada na etapa de inóculo. Comportamento oposto é mostrado na Figura 6.12, onde o rendimento de etanol produzido em relação à concentração microbiana existente aumenta com o crescimento da temperatura.

Os parâmetros $\mu_{máx}$, $X_{máx}$, $P_{máx}$, Y_x e $Y_{p/x}$ obtidos foram ajustados em função da temperatura por funções dupla exponencial do tipo Arrhenius, formadas por 4 constantes (A , B , C e D), dada pela Eq. 6.2.

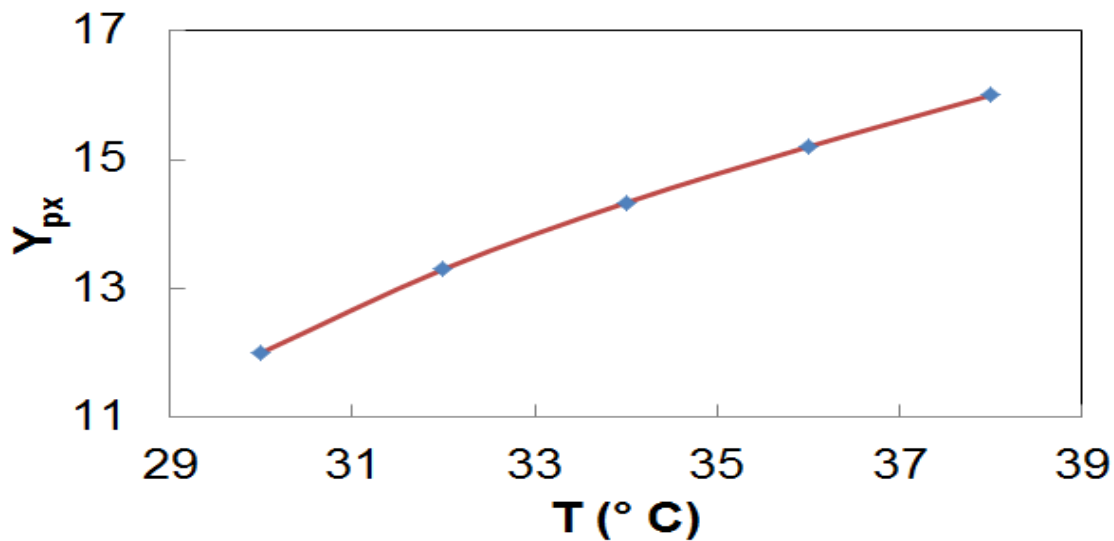


Figura 6.12 – Dependência de $Y_{p/x}$ com temperatura. O símbolo ($\blacklozenge$) representa os valores otimizados para cada temperatura utilizando o algoritmo Quasi-Newton, a linha (---) a descrição do parâmetro pela equação de Arrhenius. Os parâmetros representam a cinética para mistura de hidrolisado e melaço.

$$\text{Parâmetro dependente da temperatura} = A \exp(B/T) + C \exp(D/T) \quad (6.2)$$

Para essa finalidade, utilizou-se o software Microcal Origin versão 8.5 e sua ferramenta de ajuste não linear no qual se minimizava uma função objetivo. Os valores de A , B , C e D são mostrados na Tabela 6.30, bem como seus coeficientes de determinação e a linha contínua nas Figuras 6.8 a 6.12 representam o ajuste.

Tabela 6.30 – Valores das constantes de equação de Arrhenius e coeficiente de determinação (r^2) de ajuste de parâmetros em função de temperaturas, otimizado pelo método quasi-Newton.

Parâmetros	(r^2)	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>
$\mu_{m\acute{a}x}$ (h ⁻¹)	0,964	-88691,984	-194,839	288433,456	-194,802
$X_{m\acute{a}x}$ (g/L)	0,993	0,553	145,900	1,68E+06	-443,700
$P_{m\acute{a}x}$ (g/L)	0,979	9,727E-3	252,700	147,600	-31,470
Y_x	0,992	-79781,911	-87,618	279780,362	-87,618
$Y_{p/x}$	0,998	-79586,913	-92,567	279468,041	-92,526

6.4 Simulação do modelo matemático da cinética para a mistura de hidrolisado e melaço, sem reciclo de células

Utilizando o modelo cinético com os parâmetros ajustados pela rotina quasi-Newton, desenvolvida em Fortran, foi feita a simulação dos perfis de concentração de células, substrato e etanol para fermentações nas temperaturas de 30, 32, 34, 36 e 38 °C, sem reciclo de células. Os resultados dos perfis simulados e dados experimentais são apresentados nas Figura 6.13 a 6.17. Pode-se perceber a boa acurácia obtida pelo modelo matemático na predição dos dados experimentais, em todas as temperaturas. Mais adiante esta acurácia será quantificada através do cálculo do desvio padrão residual.

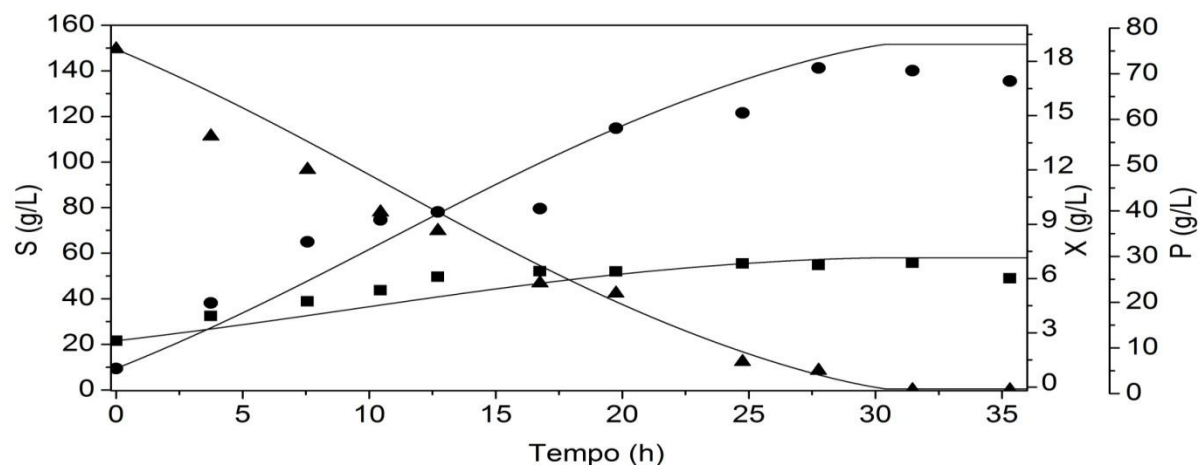


Figura 6.13 – Dados experimentais e simulados (QN —) da cinética para mistura de hidrolisado e melaço na temperatura de 30 °C. Dados experimentais são para concentração de substrato, S (▲); biomassa, X (■) e etanol, P (●).

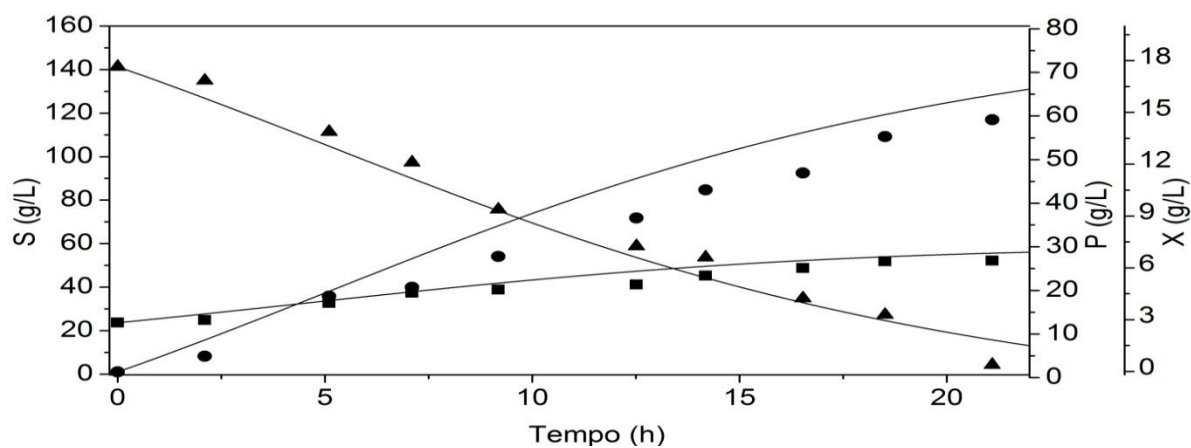


Figura 6.14 – Dados experimentais e simulados (QN —) da cinética para mistura de hidrolisado e melaço na temperatura de 32 °C. Dados experimentais são para concentração de substrato, $S(\blacktriangle)$; biomassa, $X(\blacksquare)$ e etanol, $P(\bullet)$.

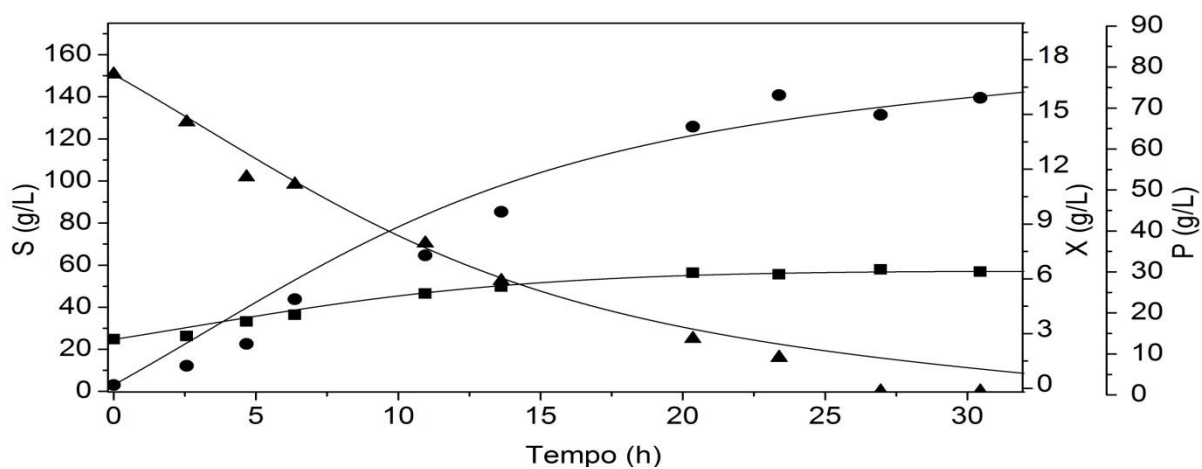


Figura 6.15 – Dados experimentais e simulados (QN —) da cinética para mistura de hidrolisado e melaço na temperatura de 34 °C. Dados experimentais são para concentração de substrato, $S(\blacktriangle)$; biomassa, $X(\blacksquare)$ e etanol, $P(\bullet)$.

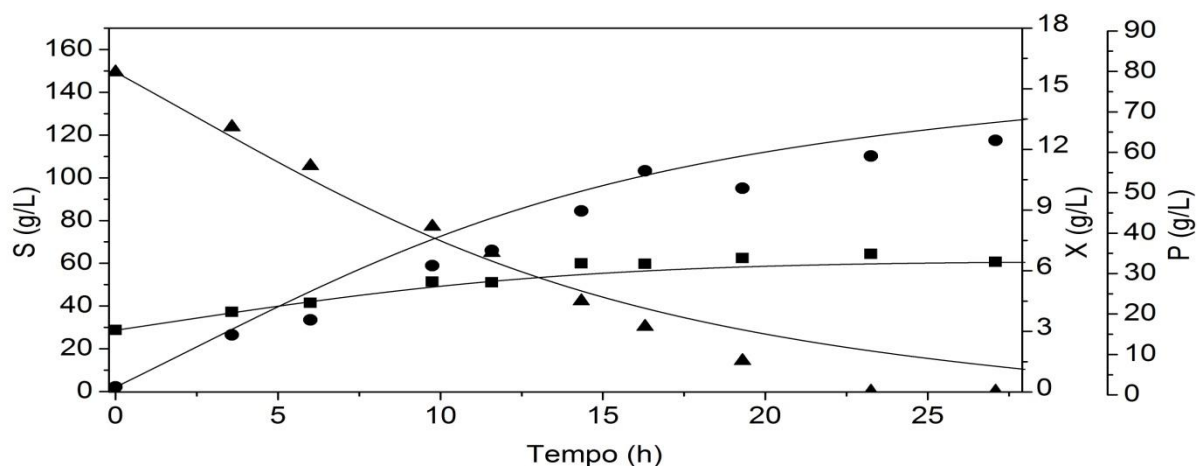


Figura 6.16 – Dados experimentais e simulados (QN —) da cinética para mistura de hidrolisado e melaço na temperatura de 36 °C. Dados experimentais são para concentração de substrato, S (▲); biomassa, X (■) e etanol, P (●).

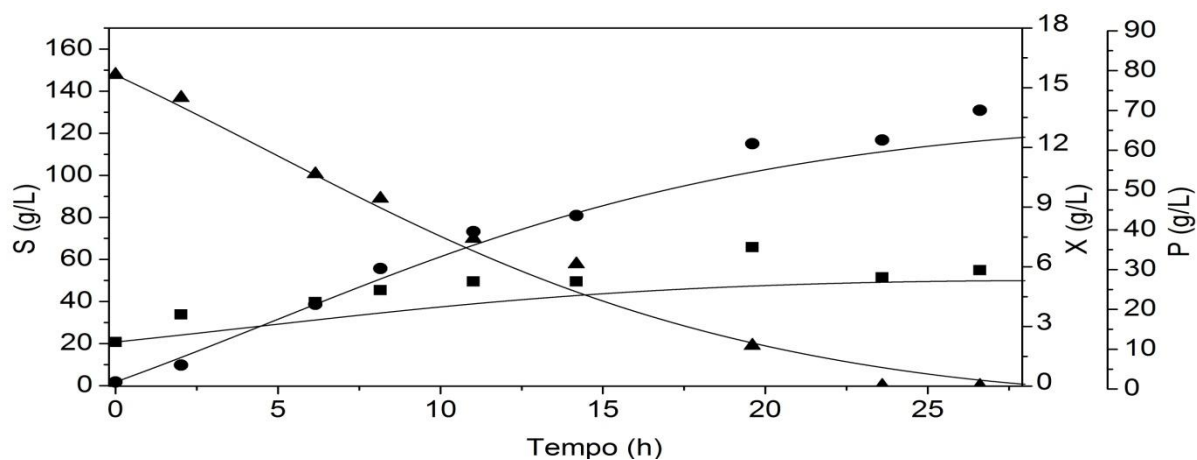


Figura 6.17 – Dados experimentais e simulados (QN —) da cinética para mistura de hidrolisado e melaço na temperatura de 38 °C. Dados experimentais são para concentração de substrato, S (▲); biomassa, X (■) e etanol, P (●).

6.5 Ajuste dos parâmetros cinéticos da fermentação alcoólica da mistura melaço e hidrolisado, com reciclo de células

Com a finalidade de representar a realidade da indústria brasileira, após a realização das fermentações a partir do inóculo, para cada temperatura, foram feitos reciclos de células sucessivos. Esta prática consiste na separação por centrifugação das células suspensas no meio fermentado e reaproveitamento das mesmas para início de uma nova fermentação.

O objetivo desta etapa de reciclo é avaliar a capacidade de fermentabilidade da levedura após longo tempo de exposição ao meio contendo hidrolisado, bem como observar sua cinética através do cálculo dos seus parâmetros. O modelo ajustado através de dados com reciclo celular é importante para ser usado em simulações e otimização de processos industriais, nos quais a prática de reaproveitamento de células é bastante comum por ser significativo na redução de tempo e recursos gastos na etapa de preparação de inóculo.

O ajuste de parâmetros das fermentações com reciclo celular foi realizado fixando-se todos os parâmetros do modelo de acordo com os valores apresentados na Tabela 6.28, exceto Y_x e $Y_{p/x}$, já que apenas estes dois parâmetros parecem ter sido afetados pelo uso do reciclo.

Na Figura 6.18 são apresentados os resultados dos perfis de Y_x ajustados em função da temperatura. Pode-se observar que conforme se aumentava a temperatura de fermentação, de 30 para 38 °C, os valores de Y_x decresciam de forma considerável, principalmente próximo à temperatura de 30 °C. Nesta mesma temperatura, os valores de Y_x foram maiores, indicando maior rendimento em células nas temperaturas baixas. Para as temperaturas de 36 e 38 °C, seus rendimentos limites foram inferiores, e decresciam de forma mais lenta nessa vizinhança.

De forma similar, foram ajustados os valores de $Y_{p/x}$ em função da temperatura, e os resultados são apresentados na Figura 6.19. Pode-se observar que para temperaturas próximas a 30 °C, o $Y_{p/x}$ apresenta valor em torno de 4,5, e o mesmo aumenta seguindo uma função dupla exponencial, conforme cresce a temperatura, até alcançar valores em torno de 13, a 38 °C. Ou seja, para temperaturas baixas, o $Y_{p/x}$ é pequeno, o que indica que a levedura produz pouco etanol em relação às células existentes. Em temperaturas mais altas, $Y_{p/x}$ cresce, mostrando o resultado esperado que o microrganismo produz mais etanol em relação às células.

O comportamento de Y_x e $Y_{p/x}$ como função da temperatura foi ajustado através de uma função dupla exponencial, cujos parâmetros A , B , C e D e r^2 são mostrados na Tabela 6.31. Para os experimentos com reciclo de células, pode-se notar que os parâmetros Y_x e $Y_{p/x}$ apresentaram valores bastante distintos dos obtidos nos experimentos sem reciclo. Os valores de $Y_{p/x}$ foram menores com reciclo de células, se comparado com experimentos sem reciclo. O mesmo comportamento de decréscimo de $Y_{p/x}$ foi observado no trabalho de Zhao *et al.* (2010), conforme as células eram submetidas a reciclo. Essa redução na produção de etanol em relação às células existentes foi observada, pois nos experimentos com reciclo pode ocorrer um possível aumento de concentração de sais no meio, com aumento de pressão osmótica, levando as células a reduzir a produção de etanol e utilizar maior parte da sua energia vinda do substrato para outras funções básicas da célula, como manutenção, por exemplo.

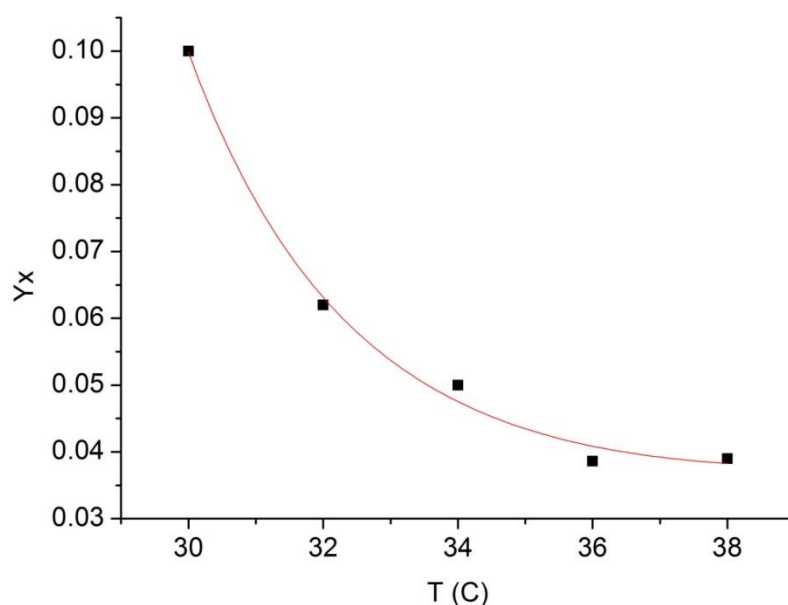


Figura 6.18 – Parâmetro Y_x em função da temperatura, para fermentações com reciclo celular.
Dados experimentais (■) e ajustados (—).

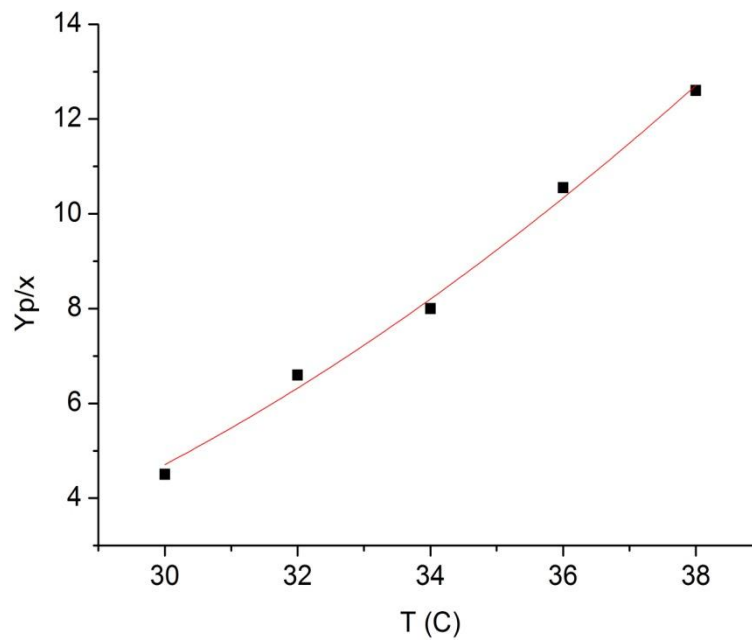


Figura 6.19 – Parâmetro $Y_{p/x}$ em função da temperatura, com reciclo celular. Dados experimentais (■) e ajustados (—).

Tabela 6.31 – Valores das constantes de equação de Arrhenius e coeficiente de determinação (r^2) de ajuste de parâmetros em função de temperaturas, otimizado pelo método quasi-Newton, para Y_x e $Y_{p/x}$, considerando uma mistura de hidrolisado e melaço, com reciclo de células.

Parâmetro	(r^2)	A	B	C	D
Y_x	0,979	$1,275 \cdot 10^{-6}$	330,835	0,118	-51,272
$Y_{p/x}$	0,978	263,251	-141,511	263,251	-141,511

6.6 Simulação do modelo matemático da cinética para a mistura de hidrolisado e melaço, com reciclo de células

Utilizando o modelo cinético com parâmetros ajustados pela rotina quasi-Newton, desenvolvida em Fortran, foi feita a simulação dos perfis de concentração de células, substrato e etanol para fermentações nas temperaturas de 30, 32, 34 e 36 °C, com reciclo de células. Nessas simulações, os parâmetros cinéticos usados foram obtidos da Tabela 6.28, exceto Y_x e $Y_{p/x}$, os quais foram calculados com expressões dupla exponencial em função da temperatura (T), apresentadas na Tabela 6.31, respectivamente. Os resultados dos perfis simulados e dados experimentais são apresentados nas figuras a seguir. Pode-se perceber a boa acurácia obtida pelo modelo matemático na predição dos dados experimentais, quantificados através do cálculo do desvio padrão residual, mostrados na Tabela 6.32, que também apresenta o desvio padrão residual do modelo para os ensaios sem reciclo. É importante ressaltar que para temperatura de 38 °C procedeu-se de forma similar. A única diferença foi que conforme se reciclavam as células, o valor de $\mu_{m\acute{a}x}$ caiu para 0,117 h⁻¹, mostrando menor adaptação da levedura ao meio. Este comportamento não foi observado para temperaturas inferiores.

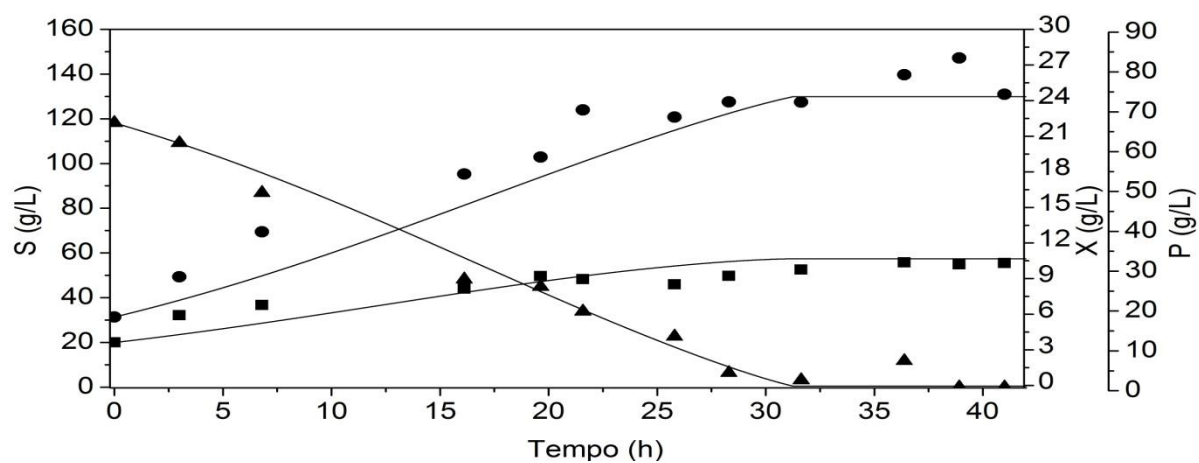


Figura 6.20 – Dados experimentais e simulados (QN —) da cinética para mistura de hidrolisado e melaço na temperatura de 30 °C, reciclo 2. Dados experimentais são para concentração de substrato, S (▲); biomassa, X (■) e etanol, P (●).

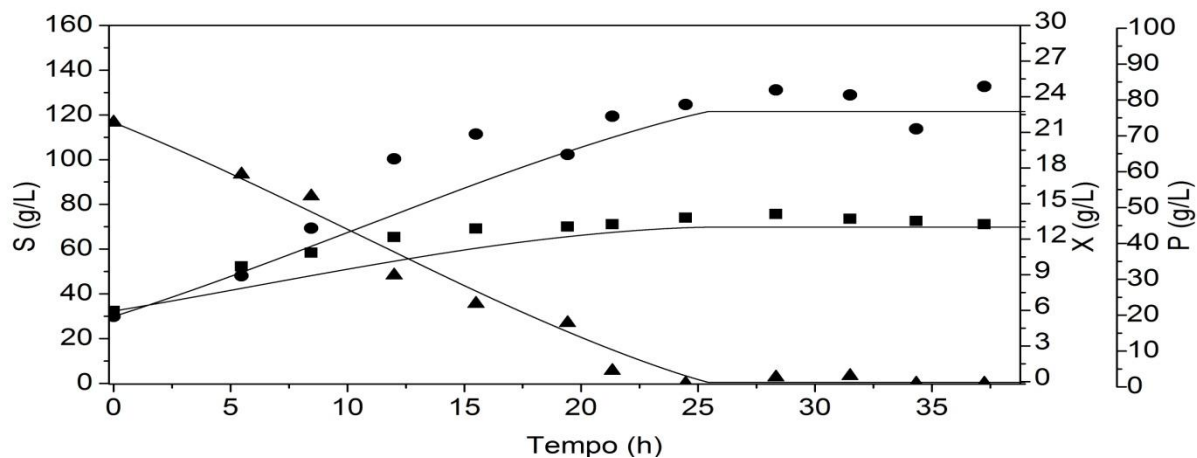


Figura 6.21 – Dados experimentais e simulados (QN —) da cinética para mistura de hidrolisado e melaço na temperatura de 30 °C, reciclo 3. Dados experimentais são para concentração de substrato, S (▲); biomassa, X (■) e etanol, P (●).

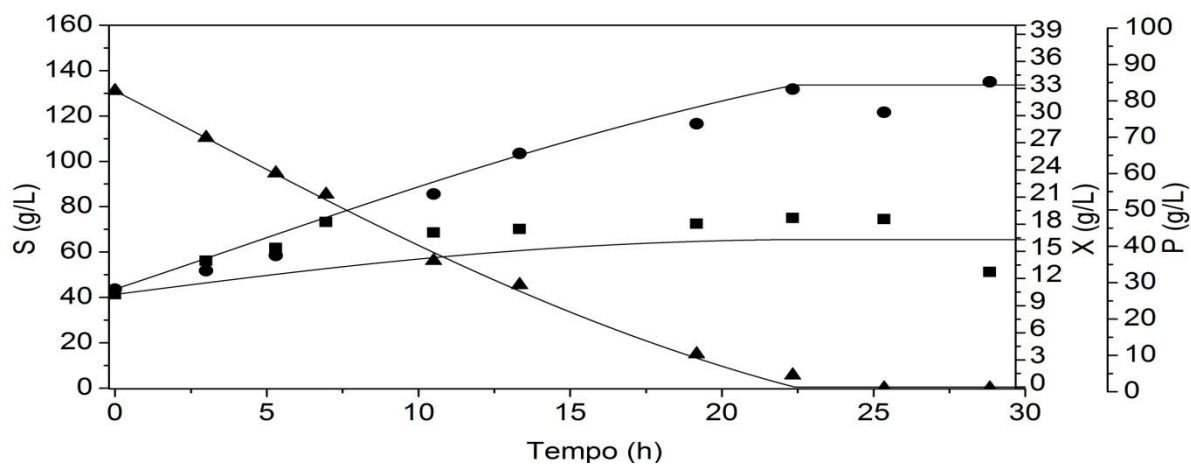


Figura 6.22 – Dados experimentais e simulados (QN —) da cinética para mistura de hidrolisado e melaço na temperatura de 30 °C, reciclo 5. Dados experimentais são para concentração de substrato, S (▲); biomassa, X (■) e etanol, P (●).

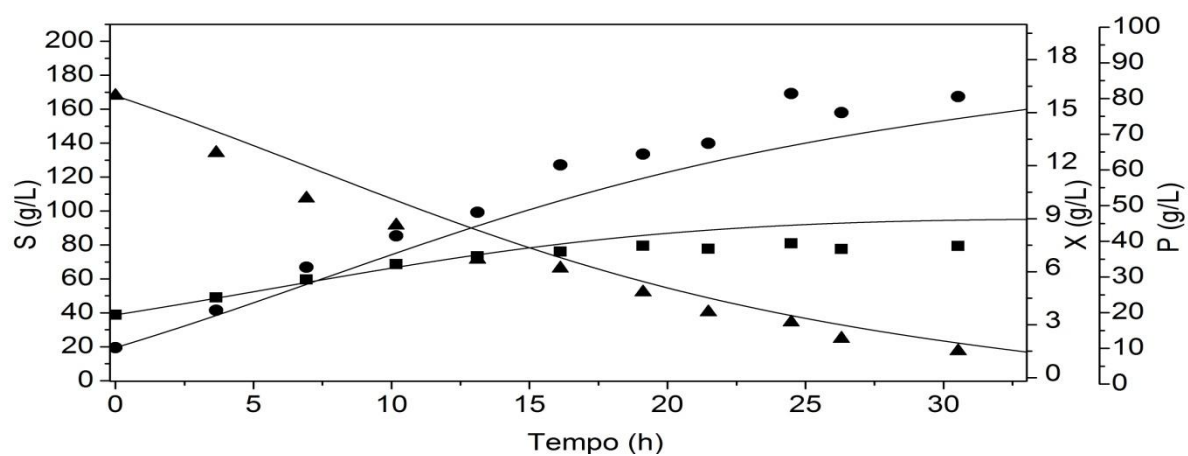


Figura 6.23 – Dados experimentais e simulados (QN —) da cinética para mistura de hidrolisado e melaço na temperatura de 32 °C, reciclo 2. Dados experimentais são para concentração de substrato, $S(\blacktriangle)$; biomassa, $X(\blacksquare)$ e etanol, $P(\bullet)$.

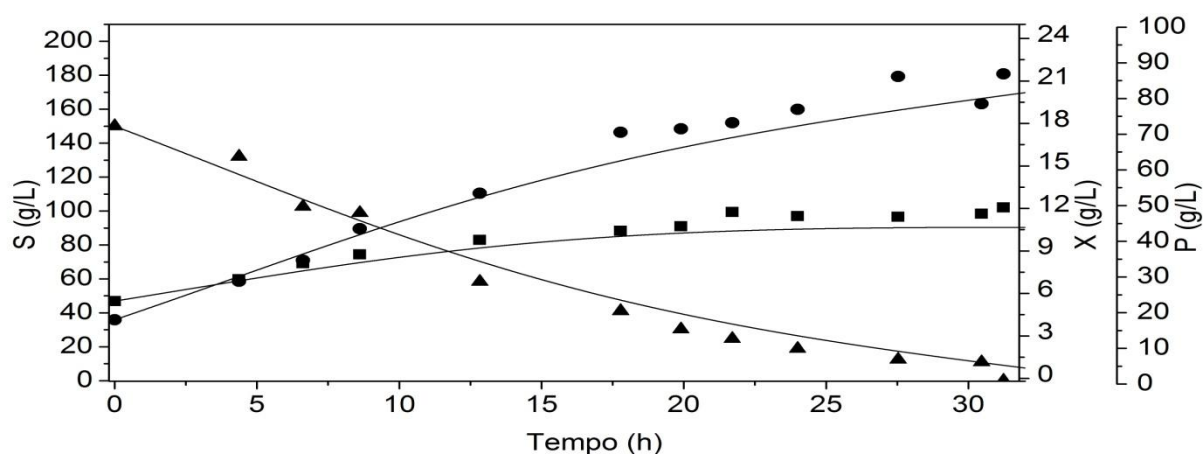


Figura 6.24 – Dados experimentais e simulados (QN —) da cinética para mistura de hidrolisado e melaço na temperatura de 32 °C, reciclo 4. Dados experimentais são para concentração de substrato, $S(\blacktriangle)$; biomassa, $X(\blacksquare)$ e etanol, $P(\bullet)$.

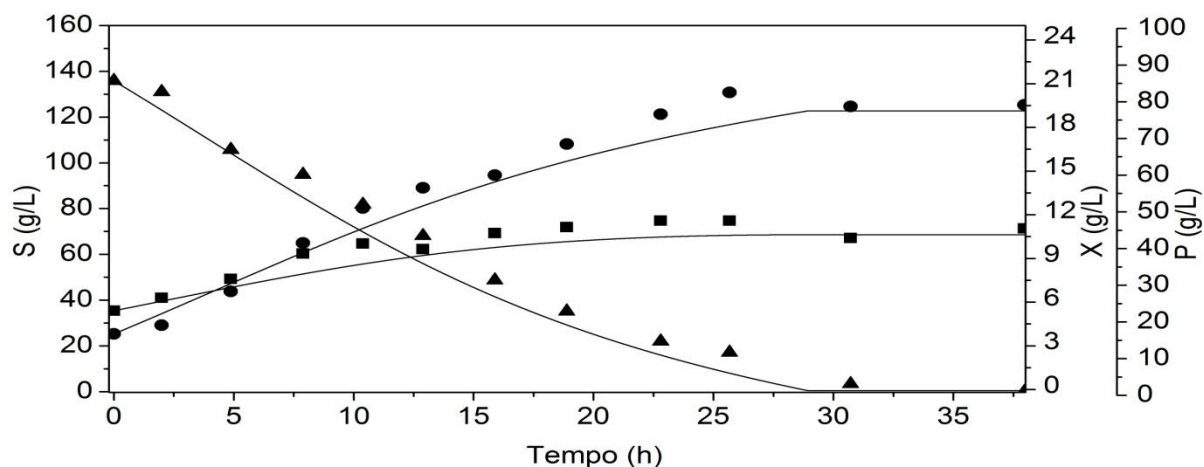


Figura 6.25 – Dados experimentais e simulados (QN —) da cinética para mistura de hidrolisado e melaço na temperatura de 32 °C, reciclo 5. Dados experimentais são para concentração de substrato, $S(\blacktriangle)$; biomassa, $X(\blacksquare)$ e etanol, $P(\bullet)$.

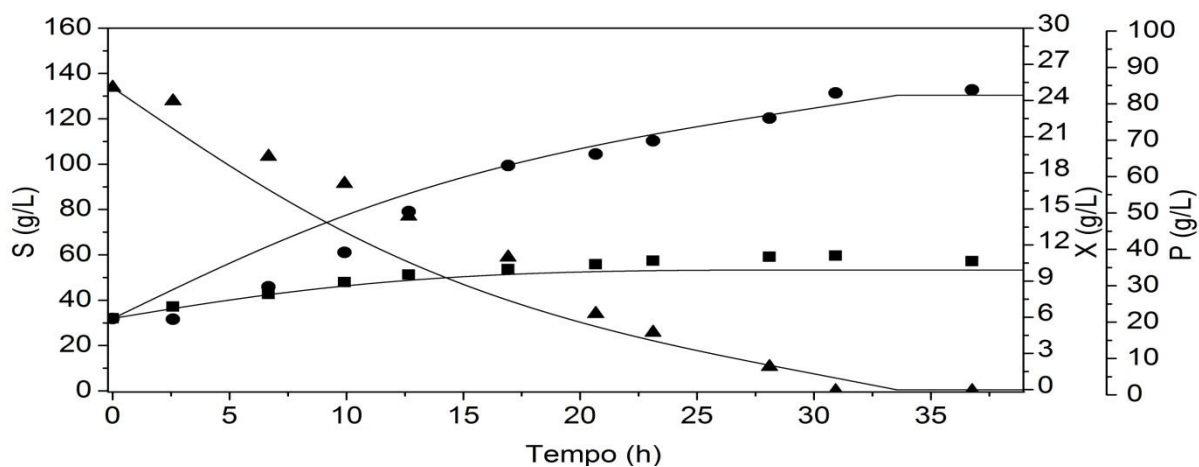


Figura 6.26 – Dados experimentais e simulados (QN —) da cinética para mistura de hidrolisado e melaço na temperatura de 34 °C, reciclo 3. Dados experimentais são para concentração de substrato, $S(\blacktriangle)$; biomassa, $X(\blacksquare)$ e etanol, $P(\bullet)$.

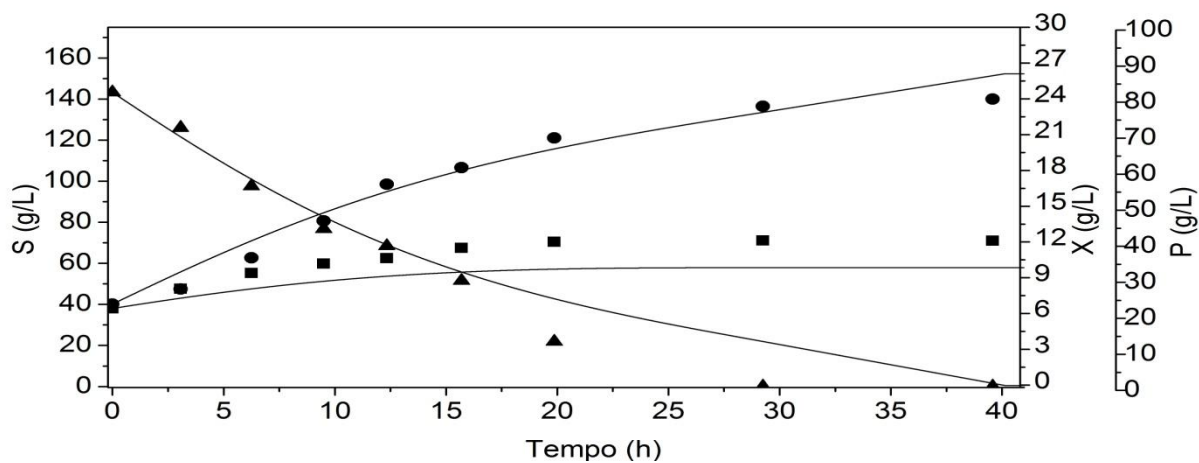


Figura 6.27 – Dados experimentais e simulados (QN —) da cinética para mistura de hidrolisado e melaço na temperatura de 34 °C, reciclo 4. Dados experimentais são para concentração de substrato, $S(\blacktriangle)$; biomassa, $X(\blacksquare)$ e etanol, $P(\bullet)$.

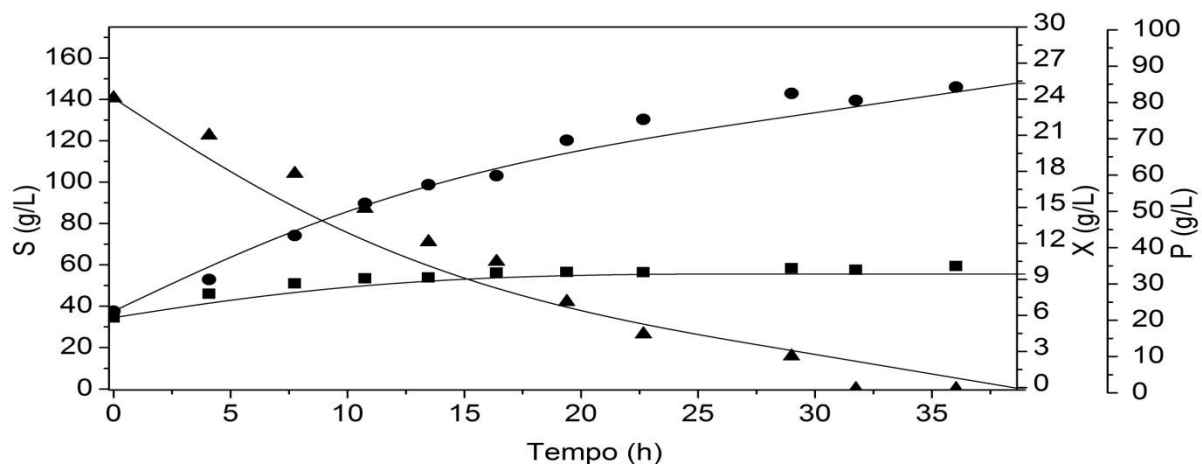


Figura 6.28 – Dados experimentais e simulados (QN —) da cinética para mistura de hidrolisado e melaço na temperatura de 34 °C, reciclo 6. Dados experimentais são para concentração de substrato, $S(\blacktriangle)$; biomassa, $X(\blacksquare)$ e etanol, $P(\bullet)$.

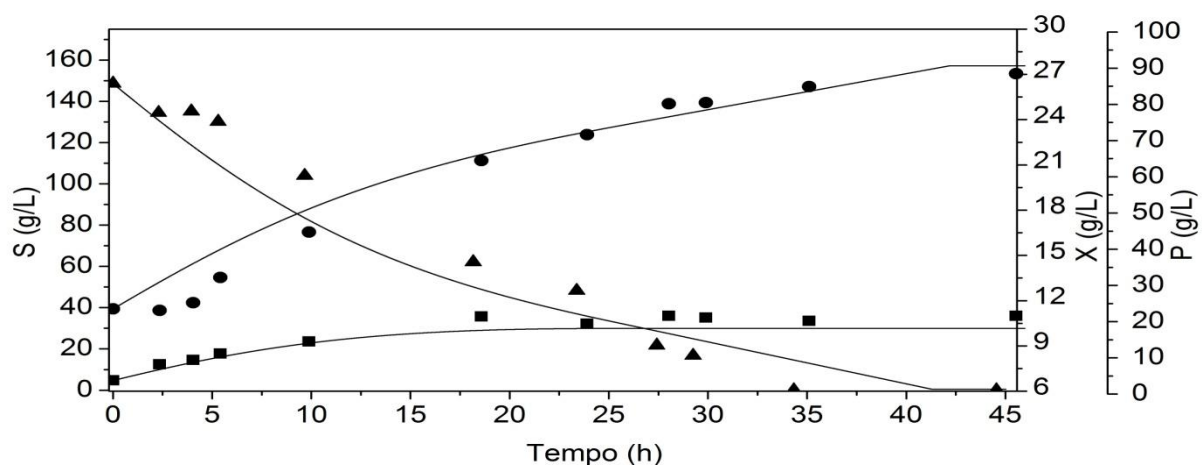


Figura 6.29 – Dados experimentais e simulados (QN —) da cinética para mistura de hidrolisado e melaço na temperatura de 34 °C, reciclo 7. Dados experimentais são para concentração de substrato, $S(\blacktriangle)$; biomassa, $X(\blacksquare)$ e etanol, $P(\bullet)$.

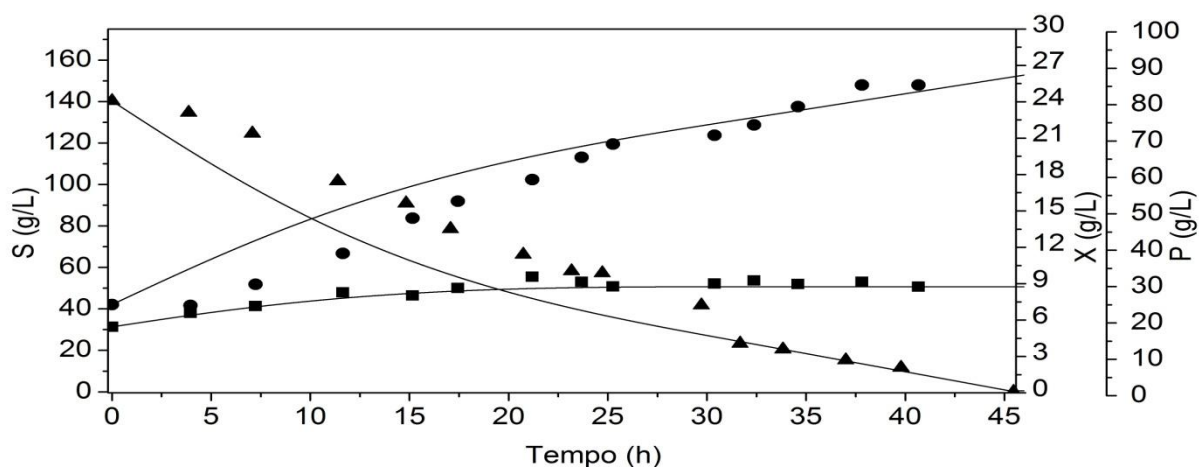


Figura 6.30 – Dados experimentais e simulados (QN —) da cinética para mistura de hidrolisado e melaço na temperatura de 34 °C, reciclo 8 (validação do modelo). Dados experimentais são para concentração de substrato, S (▲); biomassa, X (■) e etanol, P (●).

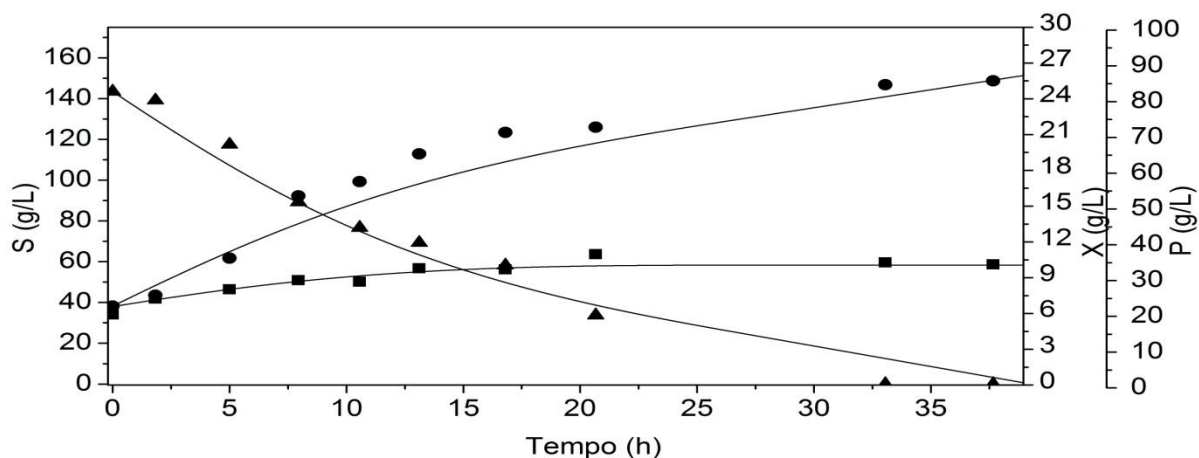


Figura 6.31 – Dados experimentais e simulados (QN —) da cinética para mistura de hidrolisado e melaço na temperatura de 34 °C, reciclo 9 (validação do modelo). Dados experimentais são para concentração de substrato, S (▲); biomassa, X (■) e etanol, P (●).

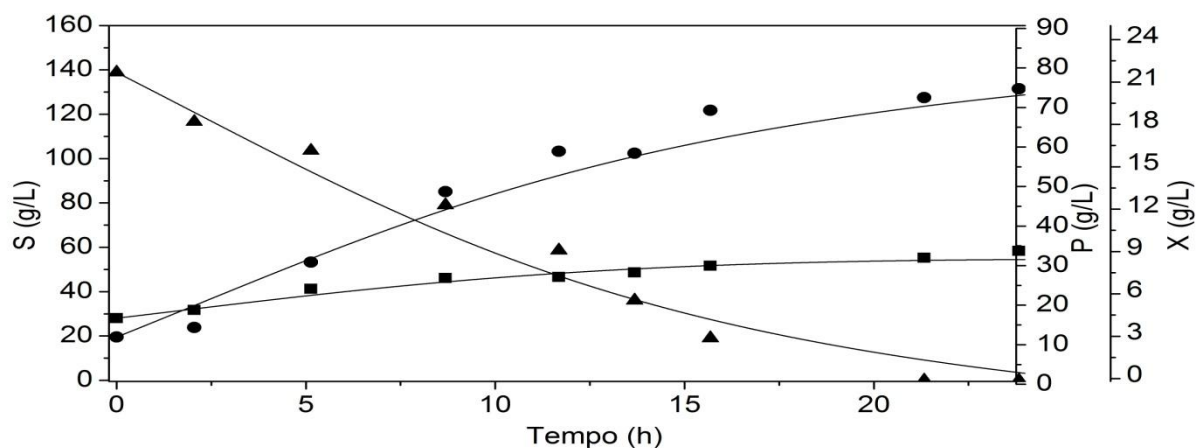


Figura 6.32 – Dados experimentais e simulados (QN —) da cinética para mistura de hidrolisado e melaço na temperatura de 36 °C, reciclo 2. Dados experimentais são para concentração de substrato, $S(\blacktriangle)$; biomassa, $X(\blacksquare)$ e etanol, $P(\bullet)$.

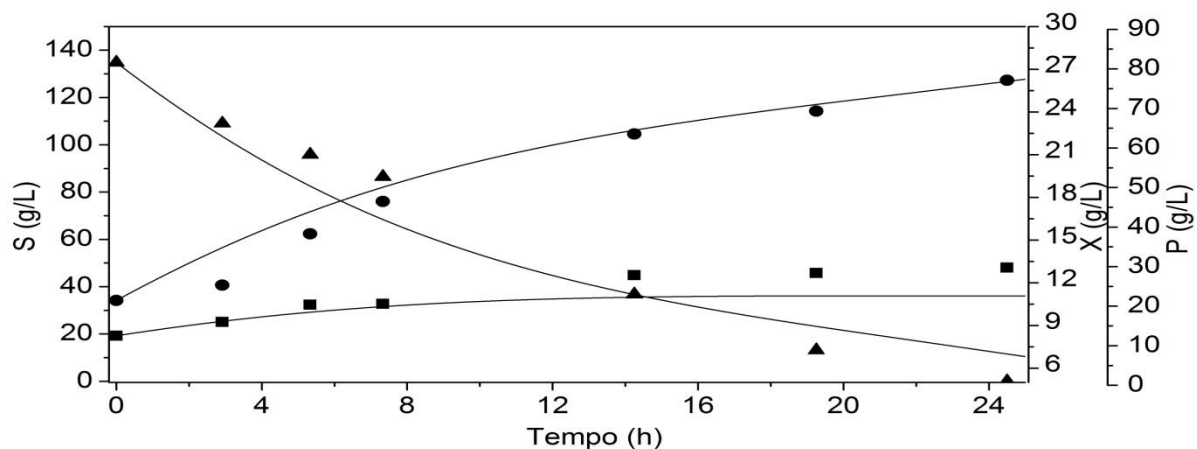


Figura 6.33 – Dados experimentais e simulados (QN —) da cinética para mistura de hidrolisado e melaço na temperatura de 36 °C, reciclo 4. Dados experimentais são para concentração de substrato, $S(\blacktriangle)$; biomassa, $X(\blacksquare)$ e etanol, $P(\bullet)$.

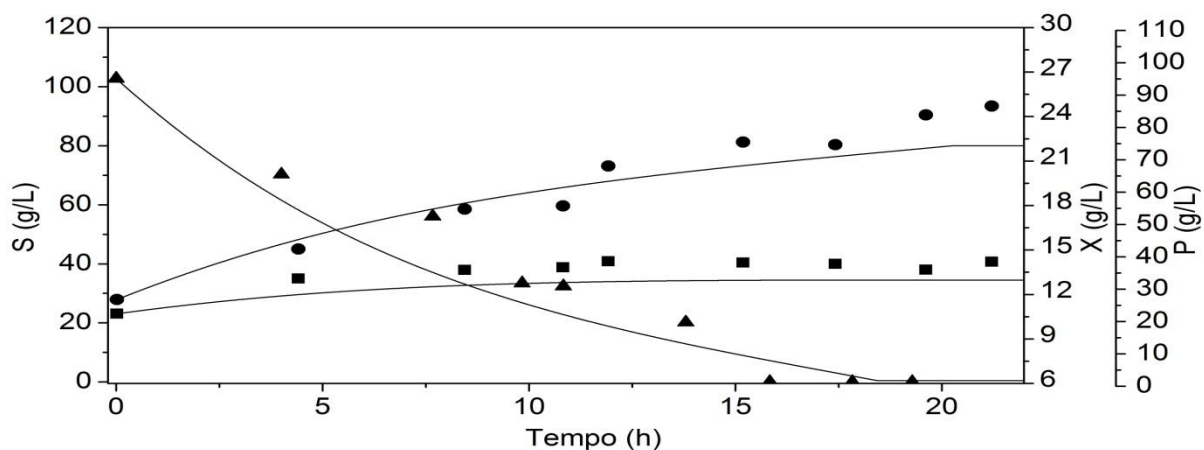


Figura 6.34 – Dados experimentais e simulados (QN —) da cinética para mistura de hidrolisado e melaço na temperatura de 36 °C, reciclo 5. Dados experimentais são para concentração de substrato, S (▲); biomassa, X (■) e etanol, P (●).

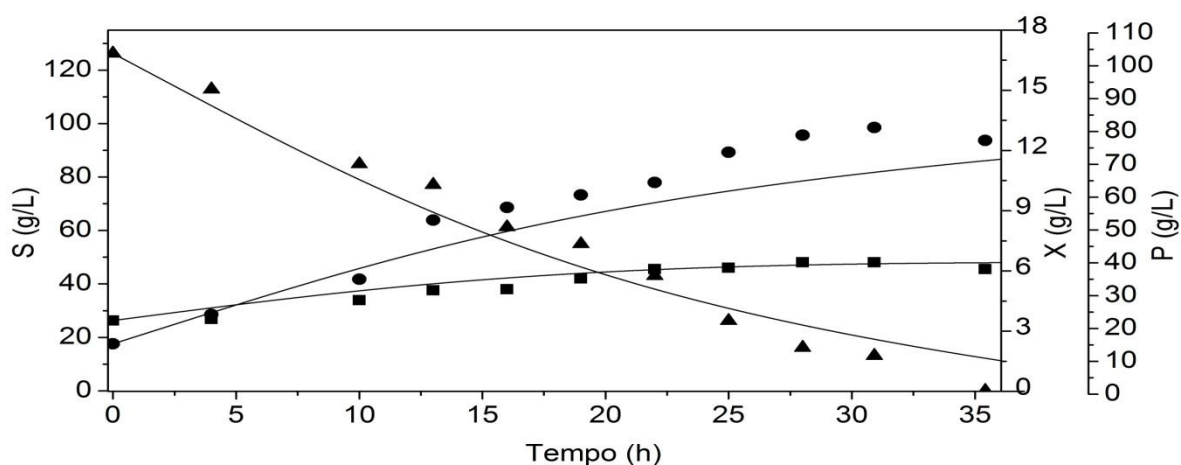


Figura 6.35 – Dados experimentais e simulados (QN —) da cinética para mistura de hidrolisado e melaço na temperatura de 38 °C, reciclo 2. Dados experimentais são para concentração de substrato, S (▲); biomassa, X (■) e etanol, P (●).

Para o experimento apresentado na Figura 6.35, o parâmetro $\mu_{m\acute{a}x}$ no qual apresentou melhor ajuste foi de $0,117 \text{ (h}^{-1}\text{)}$, sendo, portanto ligeiramente menor que encontrado para o experimento sem reciclo de células, na mesma temperatura de $38 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

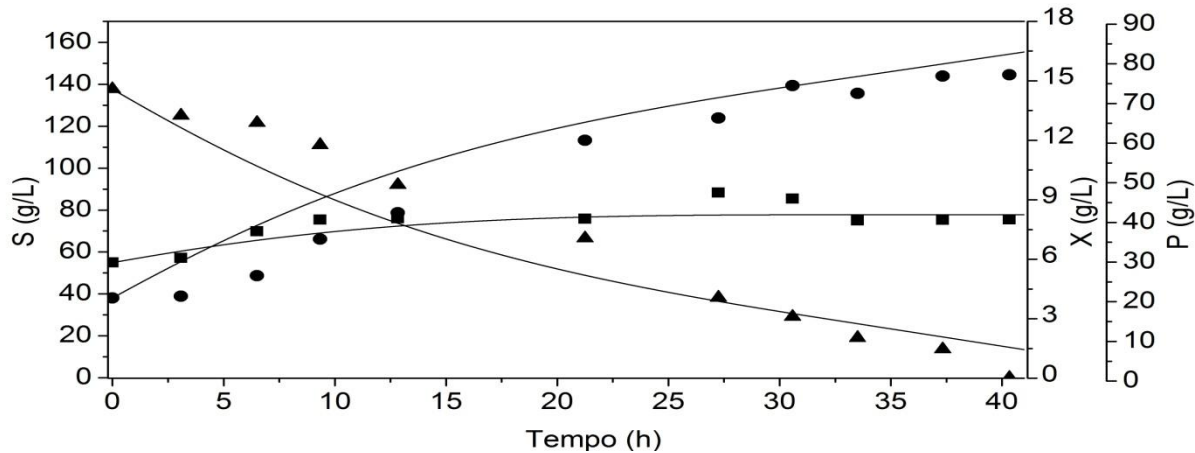


Figura 6.36 – Dados experimentais e simulados (QN —) da cinética para mistura de hidrolisado e melaço na temperatura de $38 \text{ }^{\circ}\text{C}$, reciclo 3. Dados experimentais são para concentração de substrato, $S(\blacktriangle)$; biomassa, $X(\blacksquare)$ e etanol, $P(\bullet)$.

Para ajuste dos dados experimentais apresentados na Figura 6.36, o valor do parâmetro $\mu_{m\acute{a}x}$ encontrado foi de $0,117 \text{ (h}^{-1}\text{)}$, apresentando a mesma tendência de queda do crescimento microbiano conforme se realizou o reciclo. O mesmo comportamento foi observado para o experimento apresentado na Figura 6.37. Para o experimento sem reciclo de células a $38 \text{ }^{\circ}\text{C}$, o valor de $\mu_{m\acute{a}x}$ ajustado foi de $0,145 \text{ h}^{-1}$, como apresentado na Tabela 6.28, ressaltando a queda do valor deste parâmetro com o reciclo de células, nesta temperatura, representando uma possível perda na capacidade fermentativa com bateladas sucessivas. Este comportamento é esperado para algumas linhagens microbianas quando submetidas à bateladas sucessivas envolvendo cultivos em caldo hidrolisado, como observado no trabalho de Sanda *et al.* (2011). Essa perda de capacidade fermentativa pode ser observada como aumento de tempo de fermentação, conforme as células são recicladas à temperatura de $38 \text{ }^{\circ}\text{C}$, como mostrado nas Figuras 6.35 a 6.37.

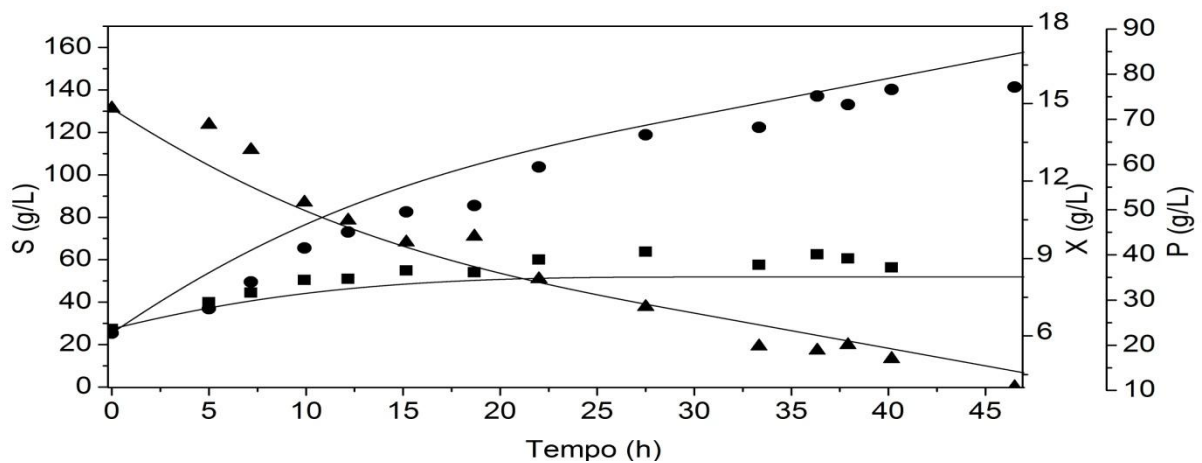


Figura 6.37 – Dados experimentais e simulados (QN —) da cinética para mistura de hidrolisado e melaço na temperatura de 38 °C, reciclo 4. Dados experimentais são para concentração de substrato, $S(\blacktriangle)$; biomassa, $X(\blacksquare)$ e etanol, $P(\bullet)$.

6.7 Desvios do modelo cinético em relação aos dados experimentais, sem e com reciclo de células

Para a caracterização da qualidade dos ajustes do modelo matemático aos dados experimentais e validação, foi calculado o desvio padrão residual (RSD). Este é representado pela Equação 6.3.

$$RSD (\%) = \left(\frac{\sqrt{RSD}}{\bar{d}_p} \right) 100 \quad (6.3)$$

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

Os valores de $RSDs$ (%) são mostrados na Tabela 6.32 para concentração de biomassa (X), substrato (S) e etanol (P), calculados pelo modelo. Pode-se perceber que o maior valor de

RSD alcançado foi em torno de 23,6 %, sendo que os demais ficaram abaixo deste, mostrando a boa qualidade do modelo ajustado. Uma maior acurácia poderia ter sido alcançada nos ajustes utilizando a metodologia de quasi-Newton, porém na etapa de ajuste, buscou-se valores de parâmetros cinéticos em comum que representasse a maior quantidade de experimentos para a mesma temperatura. Assim, para uma mesma temperatura, para os experimentos sem e com reciclo de células, foram variados somente os valores dos parâmetros Y_x e $Y_{p/x}$, sendo que os demais eram mantidos fixos para representar todos os reciclos. Já para a temperatura de 38 °C, o valor do $\mu_{m\acute{a}x}$ apresentou uma queda se comparado sem e com reciclo de células. O mesmo não ocorreu para as temperaturas inferiores.

Tabela 6.32 – Desvio padrão residual (*RSD*) para os experimentos, sem e com reciclo de células

Desvio padrão residual (%)			
Experimento	<i>X</i>	<i>S</i>	<i>P</i>
<i>T</i> = 30 °C	10,6	14,3	11,8
<i>T</i> = 32 °C	8,3	8,7	19,7
<i>T</i> = 34 °C	5,9	13,8	11,9
<i>T</i> = 36 °C	5,6	15,7	14,3
<i>T</i> = 38 °C	19,6	9,2	11,7
<i>T</i> = 30 °C (reciclo 2)	10,5	11,3	10,5
<i>T</i> = 30 °C (reciclo 3)	9,2	15,7	9,9
<i>T</i> = 30 °C (reciclo 4)	20,4	4,8	7,1
<i>T</i> = 32 °C (reciclo 2)	12,4	14,8	13,1
<i>T</i> = 32 °C (reciclo 4)	7,1	8,2	6,5
<i>T</i> = 32 °C (reciclo 5)	9,0	11,9	7,9
<i>T</i> = 34 °C (reciclo 3)	8,1	22,0	8,8
<i>T</i> = 34 °C (reciclo 4)	16,6	16,2	6,5
<i>T</i> = 34 °C (reciclo 6)	5,7	17,5	4,8
<i>T</i> = 34 °C (reciclo 7)	6,6	20,0	20,4
<i>T</i> = 34 °C (reciclo 8, validação)	4,8	25,7	10,8
<i>T</i> = 34 °C (reciclo 9, validação)	4,1	9,7	9,0
<i>T</i> = 36 °C (reciclo 2)	6,9	12,9	8,5
<i>T</i> = 36 °C (reciclo 4)	11,1	16,4	9,8
<i>T</i> = 36 °C (reciclo 5)	7,7	24,7	10,4
<i>T</i> = 38 °C (reciclo 2)	6,0	13,0	14,9
<i>T</i> = 38 °C (reciclo 3)	6,7	19,4	13,5
<i>T</i> = 38 °C (reciclo 4)	5,9	16,3	9,4

6.8 Análise de sensibilidade paramétrica do modelo aplicando a metodologia de Plackett-Burman

A análise de sensibilidade é uma técnica que quando aplicada a modelos matemáticos, pode indicar os parâmetros mais relevantes do mesmo. Esta avaliação é bastante útil para auxiliar no processo de re-estimação de parâmetros quando necessário, tornando essa tarefa mais fácil e rápida. A re-estimação é necessária sempre que ocorrem mudanças no lote da matéria-prima utilizada na fermentação e na linhagem da levedura.

Na adaptação do modelo matemático para misturas de melaço e hidrolisado os parâmetros a serem adaptados foram escolhidos com base na análise de sensibilidade feita no artigo apresentado no Capítulo 4 (ANDRADE *et al.*, 2009), usando modelo desenvolvido para fermentação de melaço diluído com água. É interessante avaliar se realmente os parâmetros mais significativos continuam sendo os mesmos para o novo modelo.

Neste trabalho, o modelo matemático para fermentação de caldo hidrolisado é formado por 13 parâmetros cinéticos que podem apresentar interação entre si. A utilização da metodologia de Plackett-Burman permite a análise de sensibilidade destes parâmetros, fazendo a variação de todos simultaneamente, evitando assim perda de informações que podem ser relevantes (KENNEDY; KROUSE, 1999). Esta característica torna esta técnica mais eficiente que as comumente usadas nessa tarefa.

As variáveis de resposta escolhidas para a análise de sensibilidade foram o tempo de fermentação requerido para o consumo total de substrato (t), concentração de produto (P) e células obtidas no final do experimento (X). Para realização das simulações, escolheram-se os valores de parâmetros na temperatura de 34 °C e sem reciclo, que são mostrados na Tabela 6.28, sendo esses tomados como nível central (0). Cada parâmetro foi variado subtraindo 10 % do seu valor original, obtendo os níveis inferiores (-) e adicionando 10 % para os superiores (+), como mostrado na Tabela 6.33.

Tabela 6.33 – Nível superior (+) e inferior (-) dos parâmetros cinéticos para a construção da matriz de delineamento de Plackett-Burman. Os parâmetros basearam-se nos valores ajustados para o modelo, considerando mistura de hidrolisado e melaço a 34 ° C.

Parâmetros	Nível (-1)	Nível (+1)
$\mu_{máx}$	0,171	0,209
$X_{máx}$	38,7	47,3
$P_{máx}$	67,5	82,5
Y_x	0,0306	0,0374
$Y_{p/x}$	12,897	15,763
K_s	3,69	4,51
K_i	0,0036	0,0044
m_x	0,18	0,22
m	0,9	1,1
n	1,35	1,65
m_p	0,09	0,11
nn	0,27	0,33
Ac_{max}	3,6	4,4

Na Tabela 6.34, é apresentada a matriz de delineamento de Plackett-Burman contendo as 13 variáveis. Neste caso, as variáveis inertes (“dummy variables”) que compõe as colunas restantes não foram mostradas neste trabalho. Os sinais (-) e (+) correspondem a cada nível apresentado na Tabela 6.33.

Tabela 6.34 – Matriz de delineamento de Plackett-Burman contendo 13 parâmetros cinéticos do modelo desenvolvido para mistura de hidrolisado e melaço (as variáveis inertes não foram apresentadas nesta Tabela).

exp	$\mu_{máx}$	$X_{máx}$	$P_{máx}$	$Y_{p/x}$	Y_x	K_s	K_i	n	m	m_p	m_x	nn	Ac_{max}
1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1
2	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1
3	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1
4	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1
5	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1
6	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1
7	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1
8	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1
9	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1
10	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1
11	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1
12	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1
13	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1
14	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1
15	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1
16	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1
17	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1
18	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1
19	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1
20	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

Com a matriz de delineamento de Plackett-Burman, foram realizadas 20 simulações com o modelo matemático, todas partindo das condições iniciais de X , S e P , fixadas em 2,69; 150,628 e 2,436 g/L, respectivamente. A combinação entre os parâmetros usados em cada

simulação corresponde aos valores codificados, apresentados em cada linha da Tabela 6.34. Os resultados das variáveis dependentes (t , X e P) são mostrados na Tabela 6.35.

Tabela 6.35 – Resultados das simulações das fermentações fazendo variar os valores de parâmetros cinéticos para nível inferior (-1) e superior (+1).

simulação	t (h)	X (g/L)	P (g/L)
1	18,8800	6,6210	73,2637
2	64,7800	5,8886	92,3369
3	25,8000	7,1373	72,5640
4	28,5200	6,4717	75,3196
5	70,0000	5,7631	84,8581
6	50,5200	6,3545	75,7715
7	18,3700	6,7699	65,3209
8	27,4400	6,3216	75,4061
9	42,4700	6,3875	81,6922
10	42,9600	6,6089	91,9215
11	58,7600	5,7479	84,8216
12	28,5800	6,9987	72,2925
13	57,0700	5,6633	75,7860
14	40,1700	6,7845	80,0852
15	50,4400	5,5641	75,8431
16	45,6900	6,2485	75,8214
17	30,3000	6,2047	65,4003
18	23,1800	6,4765	62,0659
19	24,2400	6,5957	66,5533
20	29,1800	6,4357	64,6050

Com os resultados gerados das simulações, mostrados na Tabela 6.35, e a matriz de planejamento (Tabela 6.34), utilizou-se o Software comercial Statistica versão 8.0, através da ferramenta de Planejamento Fatorial de Plackett-Burman para o cálculo dos efeitos dos parâmetros cinéticos nas variáveis dependentes t , X e P . O gráfico pareto dos efeitos dos parâmetros cinéticos na variável t (tempo de fermentação) são apresentadas na

Figura 6.38. Nota-se que os três maiores efeitos foram os de $P_{máx}$, Y_x , $Y_{p/x}$. É mostrado também o gráfico normal de probabilidade dos efeitos na Figura 6.39, onde se pode notar que os efeitos de $P_{máx}$, Y_x , $Y_{p/x}$ estão afastados de uma reta que passa pela origem, sendo os efeitos que possuem influência significativa na resposta.

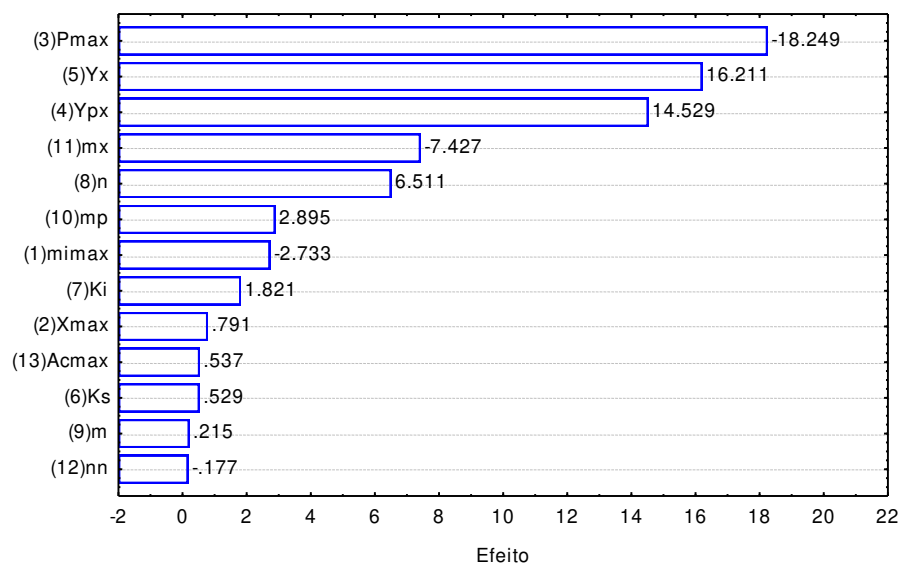


Figura 6.38 – Gráfico pareto dos efeitos dos parâmetros cinéticos no tempo de fermentação (t) para consumo total do substrato. Os resultados foram obtidos pela análise de sensibilidade utilizando a metodologia de Plackett-Burman (1946).

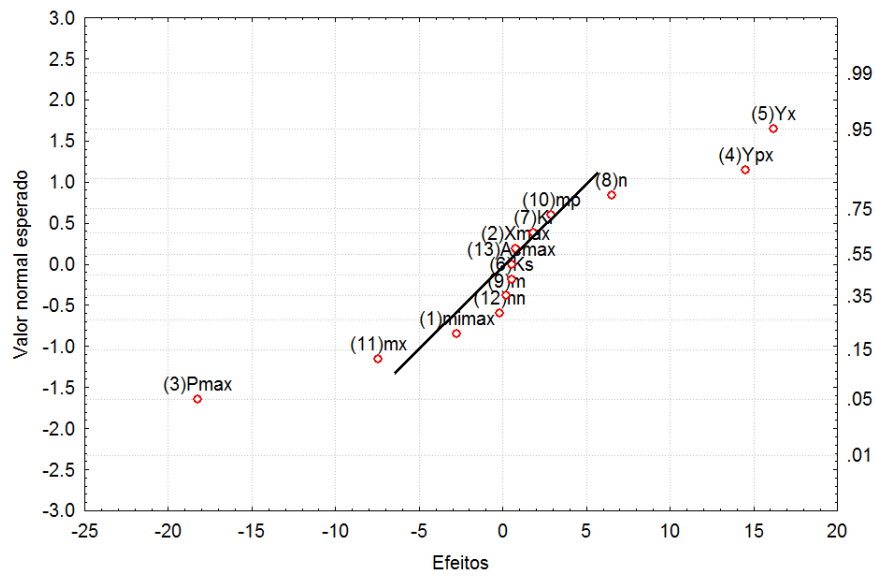


Figura 6.39 – Gráfico normal de probabilidade dos efeitos dos parâmetros cinéticos no tempo de fermentação (t) para consumo total do substrato.

Aplicando o mesmo procedimento, avaliou-se o efeito dos parâmetros cinéticos na variável X . O gráfico de pareto é mostrado na Figura 6.40, onde se pode notar que os parâmetros mais importantes foram P_{max} e $Y_{p/x}$. Na Figura 6.41 é mostrado o gráfico normal de probabilidade dos efeitos, onde nota-se que apenas estes dois parâmetros se afastam de uma reta que passa pela origem, sendo então os parâmetros significativos para esta resposta.

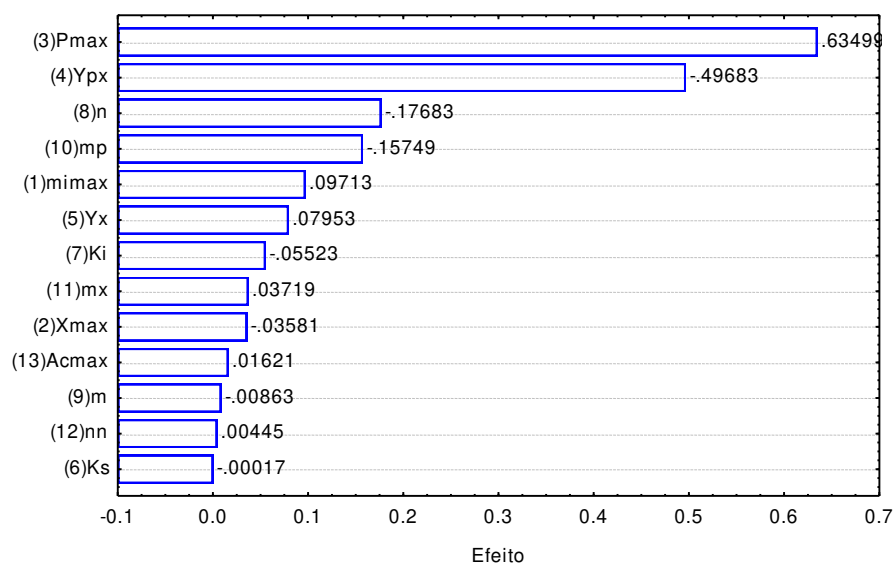


Figura 6.40 – Gráfico pareto dos efeitos dos parâmetros cinéticos na concentração final de células (X). Os resultados foram obtidos pela análise de sensibilidade utilizando a metodologia de Plackett-Burman (1946).

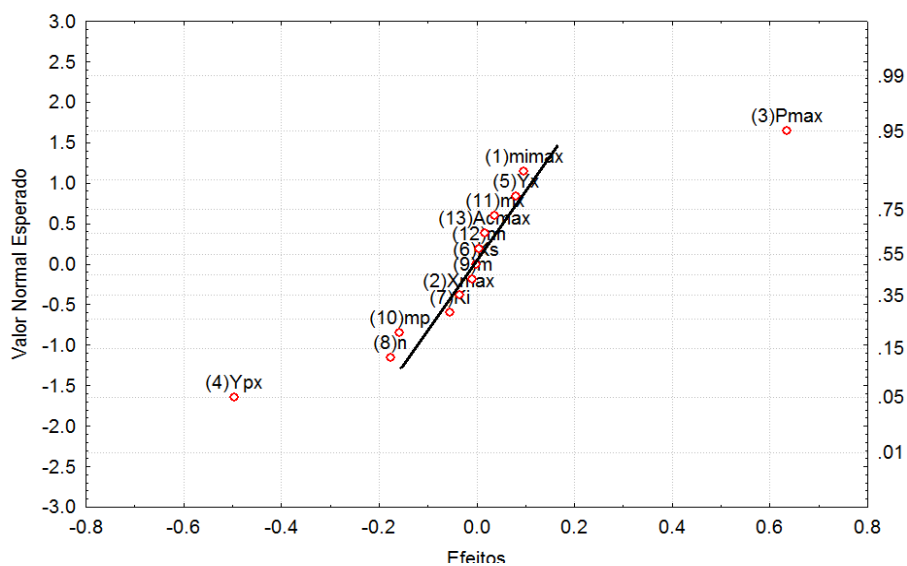


Figura 6.41 – Gráfico normal de probabilidade dos efeitos dos parâmetros cinéticos na concentração final de células (X).

Observando-se as Figuras 6.42 e 6.43, nota-se que os parâmetros Y_x , $Y_{p/x}$ são os significativos para a variável P .

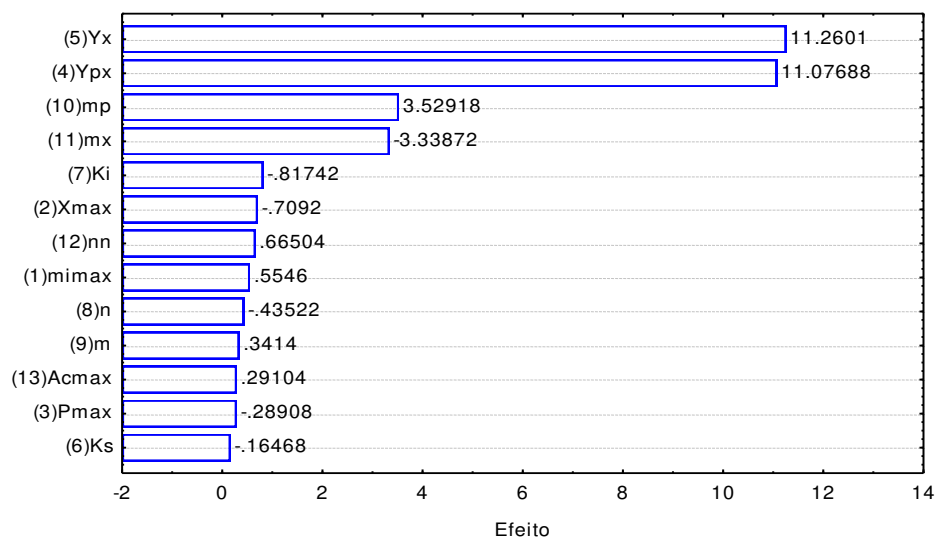


Figura 6.42 – Gráfico pareto dos efeitos dos parâmetros cinéticos na concentração final de etanol (P). Os resultados foram obtidos pela análise de sensibilidade utilizando a metodologia de Plackett-Burman (1946).

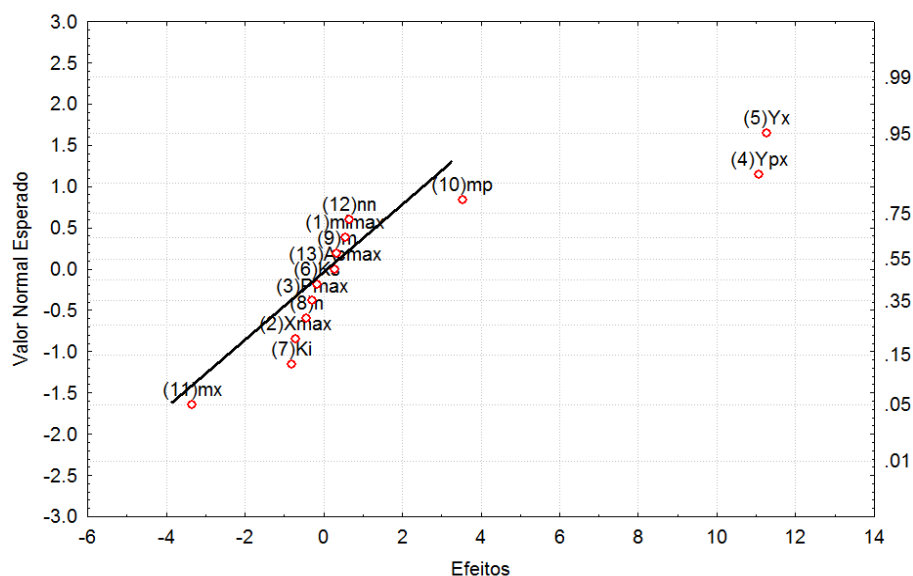


Figura 6.43 – Gráfico normal de probabilidades dos efeitos dos parâmetros cinéticos na concentração final de etanol (P).

Em geral, analisando-se a influência de todos os parâmetros cinéticos nos perfis de concentração de células, produto e tempo de fermentação, pode-se resumir que os parâmetros cinéticos mais importantes do modelo, na faixa testada foram $P_{m\acute{a}x}$, $Y_{p/x}$, Y_x . Os resultados da análise de sensibilidade para este novo modelo não são muito diferentes dos resultados de Andrade *et al.* (2009). No artigo do Capítulo 4 os parâmetros determinados como significativos para as 3 respostas consideradas foram $P_{m\acute{a}x}$, Y_x e $Y_{p/x}$. O $\mu_{m\acute{a}x}$ foi significativo para apenas uma resposta, o tempo de fermentação para consumo total do substrato (t). Para o modelo com parâmetros adaptados para descrever a fermentação de hidrolisado concentrado com melaço, o único parâmetro significativo para as 3 respostas foi $Y_{p/x}$. $P_{m\acute{a}x}$ e Y_x foram significativos para duas respostas e o $\mu_{m\acute{a}x}$ deixou de ser significativo. Como os 3 parâmetros significativos neste novo modelo estão entre os significativos determinados por Andrade *et al.* (2009) e escolhidos para serem re-estimados, foi possível desenvolver um modelo que descreveu a cinética da fermentação de mistura hidrolisado/melaço com precisão.

Essa análise de sensibilidade foi realizada para o final das fermentações, porém existe ainda a possibilidade de que alguns parâmetros considerados não significativos no final da fermentação apresentem maiores influências no início do processo. Para isso, foram realizadas análises de sensibilidade adicionais em diferentes tempos do processo em batelada (2, 5, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 h) considerando o mesmo modelo de hidrolisado concentrado com melaço, a 34 °C, partindo das mesmas condições iniciais de X , S e P . A matriz de delineamento de Plackett-Burman foi a mesma apresentada na Tabela 6.34. As variáveis de resposta para cada tempo, t foram concentração de células, X ; de produto, P ; e concentração de substrato, S , gerados através da simulação do modelo. Essa última foi utilizada para substituir a variável tempo de fermentação, t , da análise de sensibilidade anterior.

Os resultados das simulações de X , P e S para cada linha da Tabela 6.34, para os diferentes tempos, são apresentados nas Tabelas I1, I2 e I3 do Apêndice I. Assim, foram determinados os efeitos dos parâmetros cinéticos em cada variável resposta, X , S e P , cujos resultados são mostrados nas Figuras 6.44, 6.45 e 6.46, respectivamente.

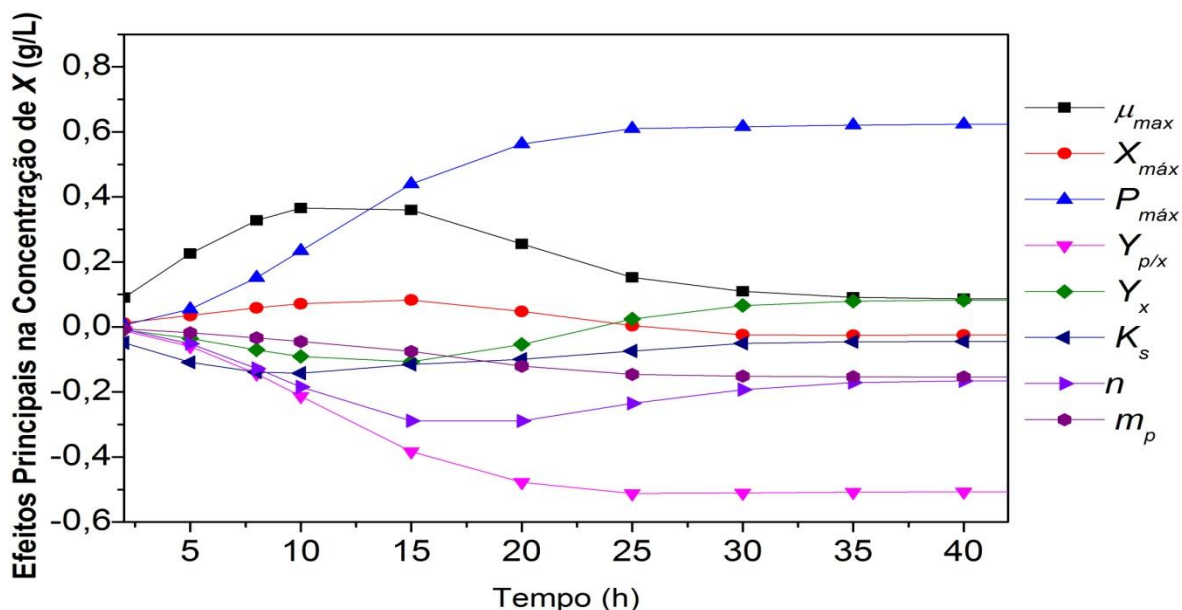


Figura 6.44 – Efeito dos parâmetros cinéticos na concentração de células, X .

Na Figura 6.44 pode-se observar que a influência dos parâmetros cinéticos do modelo na concentração celular, X , varia ao longo do tempo de fermentação para o cultivo em batelada. Os parâmetros mais sensíveis no global (0 até 40 horas), para a variável X , foram $Y_{p/x}$ e P_{max} , sendo esse resultado similar ao apresentado na Figura 6.41. É importante comentar que o parâmetro μ_{max} , apesar da fraca relevância no final do processo, foi o que apresentou maior influência nas primeiras 12 horas, seguido de n . Os demais parâmetros tais como X_{max} , K_i , Y_x e m_p mostraram ter pouca influência no perfil de concentração celular do modelo em todos os instantes da fermentação.

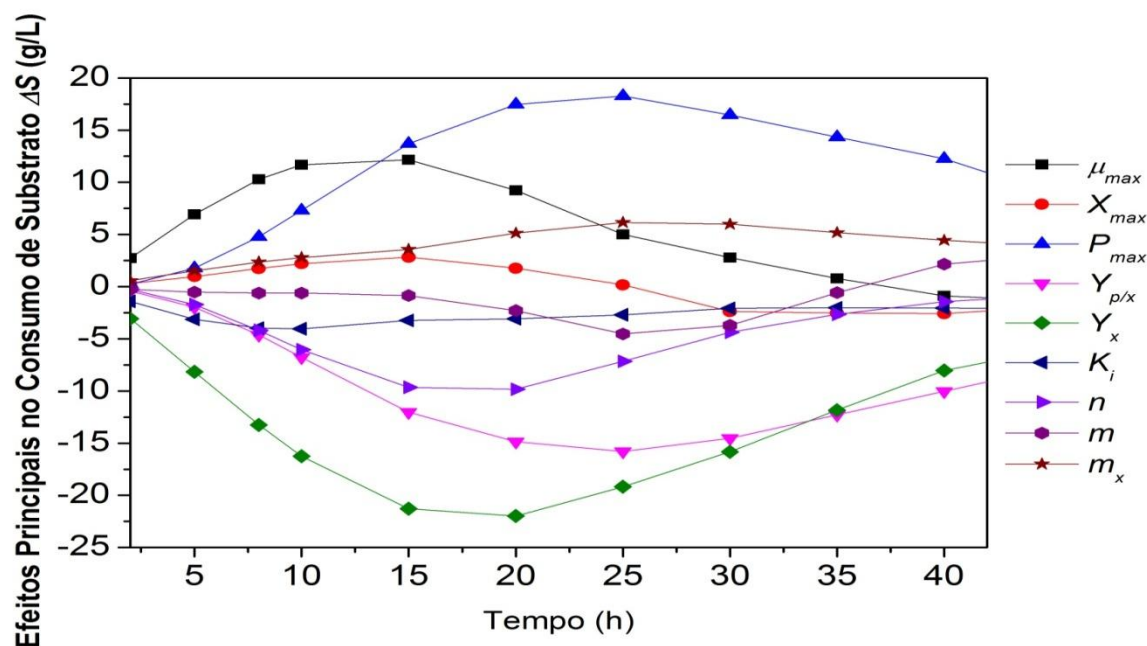


Figura 6.45 – Efeito dos parâmetros cinéticos no consumo de substrato, ΔS .

A influência dos parâmetros cinéticos no consumo de substrato foi representada pela variação de S em cada tempo correspondente, na Figura 6.45. Os parâmetros mais relevantes considerando até 30 horas foram Y_x , seguido de P_{max} e $Y_{p/x}$. Esses 3 parâmetros, na Figura 6.39 foram também os mais relevantes na variável tempo de fermentação, usada para representar o tempo gasto para consumo total de substrato em batelada. Novamente, o μ_{max} volta a aparecer

como um parâmetro com baixa relevância no tempo final (40 h), porém nas primeiras 12 h esse é o mais influente no processo, seguido por n .

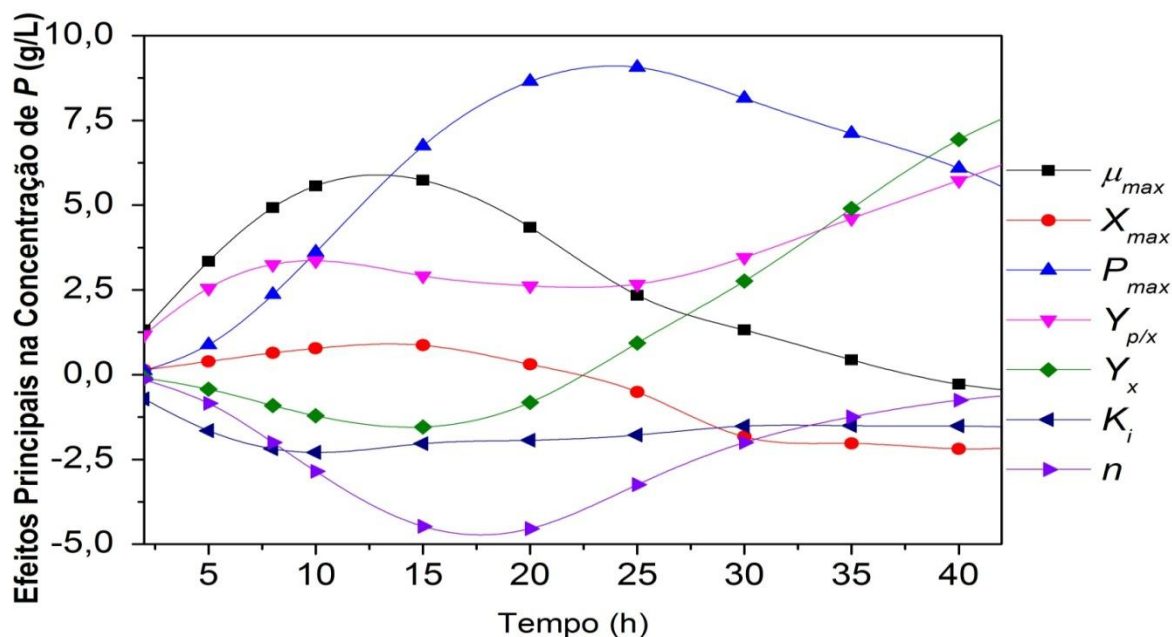


Figura 6.46 – Efeito dos parâmetros cinéticos na concentração de etanol, P .

Para a Figura 6.46, o parâmetro cinético mais relevante na concentração de etanol foi o $P_{máx}$, nas 22 h de fermentação, seguido de Y_x e $Y_{p/x}$, em 40 h. O parâmetro $\mu_{máx}$ em torno das 12 h apresenta alta relevância no perfil de etanol, e assim como a influência de $P_{máx}$, passa a cair conforme o tempo de 40 h é atingido.

Assim, em resumo, para os perfis de X , S e P , os parâmetros mais relevantes durante todo o tempo (t) de processo analisado foram Y_x , $Y_{p/x}$, P_{max} , μ_{max} e n . Apesar da relativa alta influência de n , esse parâmetro foi mantido fixo durante a etapa de re-estimação, já que inferir novos valores para n é uma tarefa arriscada, pois este é somente um parâmetro de ajuste para representar a forma de inibição por etanol, e métodos de determinação gráficos são poucos precisos nessa determinação. Por esse motivo, o valor do n foi mantido fixo em todos os ajustes.

É importante ressaltar que a rigor os resultados da análise de sensibilidade são válidos somente para a faixa de parâmetros avaliada e a princípio os resultados obtidos neste capítulo são particulares para a matéria-prima considerada, no caso uma mistura de aproximadamente 66,67 % de hidrolisado em melaço. A comparação com os resultados de Andrade *et al.* (2009), no entanto, sugere a análise pode ser usada no caso de novas composições da mistura melaço/hidrolisado, talvez considerando alguns dos parâmetros a mais, como foi feito ao usar os resultados de Andrade *et al.* (2009) para desenvolver o novo modelo.

Assim, para problemas de re-estimação de parâmetros envolvendo o uso de hidrolisado, esta análise poderá facilitar o trabalho, levando a um menor tempo gasto no ajuste de modelos cinéticos a dados experimentais. Vale a pena observar que os resultados sugerem que os demais parâmetros cinéticos, se mantidos fixos, não apresentarão grande diferença na precisão do modelo matemático.

6.9 Avaliação do rendimento em etanol baseado no substrato ($Y_{p/s}$), e produtividade para fermentações com reciclos de células

O objetivo desta secção é analisar o comportamento do rendimento em etanol, baseando-se na quantidade de açúcares redutores presentes inicialmente no reator ($Y_{p/s}$), e da produtividade em produto nas primeiras 20 horas de fermentação, para o processo em batelada. Ambas as variáveis são de extrema importância do ponto de vista industrial e apresentam forte impacto na viabilidade econômica do processo, sendo que a maximização de ambos os valores é desejável. O rendimento em etanol é citado como o parâmetro mais vital para avaliação de resultados de fermentação (CHEN, 2009). Na Figura 6.47, pode-se observar que para a primeira batelada a 34 °C, a produtividade em etanol foi a mais alta, chegando a 3 g/L.h, partindo de um inóculo. Para fermentação de melaço diluído em água (Tabela 6.27), a produtividade nas primeiras 20 h foi de aproximadamente 2,58 g/L.h, ou seja, a utilização de hidrolisado como meio de fermentação não levou a uma queda observada de produtividade. O valor de 3 g/L.h (com hidrolisado) pode ter sido superior devido à associação de alguns efeitos, sendo eles a maior concentração de açúcares e células no início da fermentação, e ao efeito do ácido acético no aumento do $Y_{p/x}$ (parâmetro aumentou de 13,293, considerando dados apresentados na Tabela

6.27, sem hidrolisado, para 14,330, para a fermentação com hidrolisado). Conforme se realizavam os ciclos de forma sucessiva, e as células eram submetidas a um longo tempo de exposição ao meio contendo hidrolisado, pode-se notar que em geral o comportamento da produtividade era reduzido, alcançando um valor mínimo, inferior a 2 no oitavo ciclo. Do ciclo 3 em diante, as produtividades não se reduziam de forma significativa. Essa perda de produtividade em produto com ciclos também foi observada por Pereira *et al.* (2012), e Choi *et al.* (2009). Os resultados dos ciclos 2 e 5 foram utilizados somente para aumentar o tempo de exposição da levedura ao hidrolisado e suas cinéticas não foram determinadas.

Na Figura 6.48, os rendimentos em etanol com relação ao substrato disponível decresciam conforme se reciclavam as células, porém este comportamento acontecia de forma bastante suave, estabilizando em um valor de 86 % do teórico, não afetando de forma significativa a quantidade de etanol produzida, mostrando a relativa estabilidade da linhagem microbiana usada nos experimentos. Provavelmente essa redução no rendimento em produto é devida à maior energia gasta para manutenção das células com longos períodos de estresse, quando exposto ao caldo hidrolisado, com redução do produto formado. Sanda *et al.* (2011) observaram comportamento semelhante realizando bateladas sucessivas com hidrolisado hemicelulósico, envolvendo várias linhagens de *S. cerevisiae* geneticamente modificadas. Foi notado que após 5 bateladas, o tempo de fermentação de xilose aumentava de 24 para 120 horas ou mais, impactando na produtividade, e o rendimento em etanol decrescia com os ciclos. Em outras linhagens mais resistentes, não se apreciava queda muito significativa de rendimento em produto em relação ao substrato ($Y_{p/s}$), como foi observado neste trabalho.

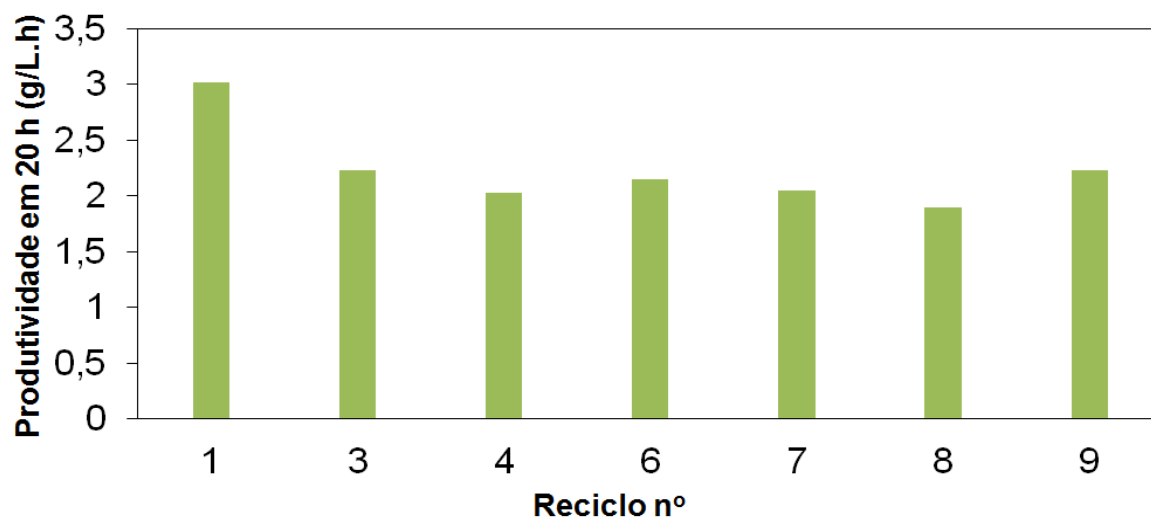


Figura 6.47 – Resultados de produtividade em etanol para as primeiras 20 h de fermentação em função do ciclo. Os experimentos foram realizados a 34 °C, e uma mistura de hidrolisado e melaço.

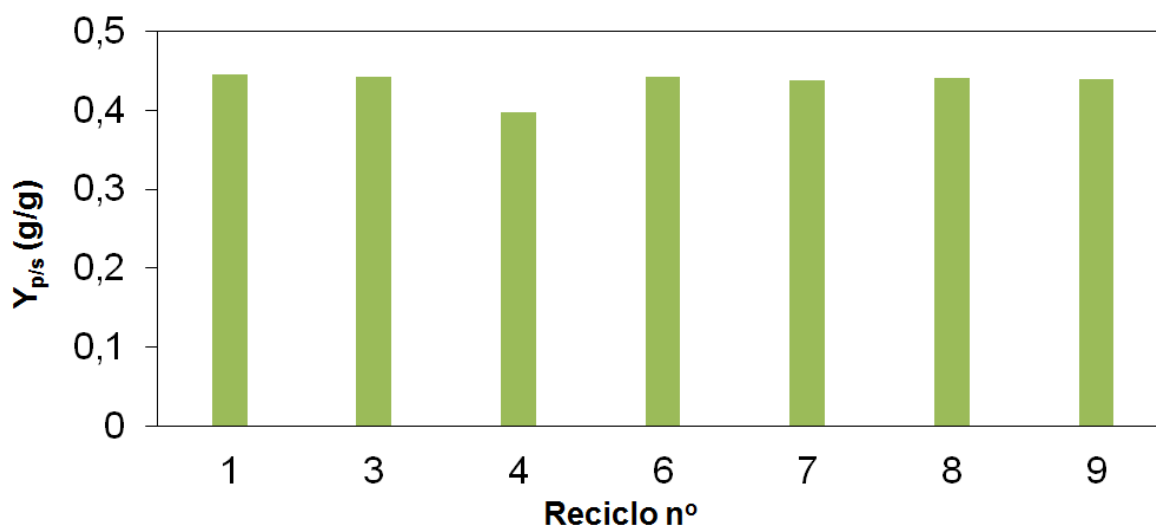


Figura 6.48 – Resultados de rendimento em etanol baseado na quantidade de açúcares fermentescíveis ($Y_{p/s}$), para as primeiras 20 h de fermentação em função do ciclo. Os experimentos foram realizados a 34 °C, e uma mistura de hidrolisado e melaço.

CONCLUSÃO

A utilização da porção total da cana-de-açúcar (bagaço e palha) é de extrema importância para se aumentar a produção de etanol em relação à área cultivada, no mundo, resolvendo questões de sustentabilidade e melhorando o aproveitamento da terra disponível, sem comprometer a produção de alimentos. Isto é possível através do desenvolvimento e pesquisa em etapas chaves para a conversão de matéria-prima lignocelulósica em biocombustíveis a baixo custo, bem como o estudo da fermentabilidade do caldo obtido para produção de etanol.

Tendo em vista a importância da etapa de fermentação no processo, este trabalho teve como objetivo principal a obtenção de um modelo matemático para descrever a cinética de fermentação de misturas de melaço/hidrolisado usando uma linhagem industrial de *S. cerevisiae*. Para isso, foram realizadas fermentações em batelada, usando como meio de cultivo uma mistura de hidrolisado (proporção de 66,67 %) e melaço de cana-de-açúcar. O hidrolisado obtido através do pré-tratamento de bagaço de cana por peróxido de hidrogênio seguido por hidrólise enzimática apresentou baixas concentrações de inibidores, sendo o ácido acético o principal deles, na ordem de 0,5 – 1,0 g/L, seguido pelo furfural, a 0,02 g/L e hidroximetilfurfural a 0,04 g/L.

O meio de cultivo contendo hidrolisado apresentou boa fermentabilidade devido às baixas concentrações de inibidores formadas na etapa de pré-tratamento por peróxido de hidrogênio alcalino, mesmo sem aplicação de métodos de detoxificação. Em todos os experimentos, obteve-se total consumo de sacarose, glicose e frutose pela *S. cerevisiae*, porém o tempo de fermentação aumentou significativamente se comparado com o trabalho de Andrade (2007), o qual utilizou meio contendo melaço diluído, para a mesma linhagem microbiana. No trabalho de Andrade (2007), no entanto, o inóculo não foi centrifugado, de forma que vários nutrientes foram adicionados ao meio de cultivo, diferentemente do presente trabalho. A fermentação realizada com melaço diluído em água com centrifugação do inóculo realizada neste trabalho mostra tempo de fermentação semelhante ao obtido na fermentação de caldo hidrolisado concentrado com melaço.

Os dados experimentais foram usados para ajuste dos parâmetros cinéticos do modelo matemático, e acrescentado um termo de inibição por ácido acético. A adição deste termo

aumentou a acurácia do ajuste. Assim, os parâmetros ajustados para as temperaturas de 30, 32, 34, 36 e 38 °C, utilizando caldo hidrolisado, foram significativamente distintos dos obtidos em Andrade (2007), com maior diferença nos valores de $\mu_{máx}$, Y_x e $Y_{p/x}$. Foi demonstrada grande diferença na cinética obtida com adição de hidrolisado, e a necessidade da utilização desde novo modelo em trabalhos de simulação, otimização de processos, e estudo de viabilidade econômica que integram a produção de etanol de primeira e segunda geração. No capítulo 5 é mostrado que a simulação de um modelo cinético desenvolvido para melaço, ao representar cinética de fermentação de segunda geração, apresenta desvios na ordem de 40 %, necessitando então ser aplicada a metodologia de re-estimação paramétrica quando se trabalha com novos meios de cultivo.

No Capítulo 6, foram apresentados resultados de fermentações de uma mistura de hidrolisado e melaço para temperaturas distintas, sem e com reciclo de células. Comparando uma fermentação cuja levedura parte de um inóculo, com uma anteriormente exposta ao hidrolisado, ocorre uma ligeira redução no rendimento em etanol em relação à quantidade de biomassa existente ($Y_{p/x}$). A queda de rendimento em etanol com relação ao substrato ($Y_{p/s}$) foi visível quando se realizou o segundo reciclo, porém após diversas bateladas sucessivas, este se manteve relativamente constante, mostrando certa estabilidade da levedura a meios tóxicos e rendimentos próximos ao teórico.

O modelo cinético desenvolvido mostrou representar com boa qualidade os experimentos para 23 bateladas, incluindo sem e com reciclo de células. Isso foi possível através da manutenção dos 11 dos 13 parâmetros (ajustados a partir de mistura de hidrolisado e melaço) em valores fixos, variando apenas Y_x e $Y_{p/x}$, conforme eram feitos os reciclos. O estudo e avaliação desses parâmetros em uma ampla faixa de concentração celular permite que o mesmo seja usado para descrever processos industriais de forma mais realista.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Aplicar o modelo cinético desenvolvido para hidrolisado a um processo contínuo extrativo por “flash” a vácuo, realizando simulações e otimização das variáveis operacionais, tais como concentração de substrato na alimentação do reator, taxa de diluição, temperatura do reator, pressão, temperatura e vazão de alimentação do “flash”. As variáveis respostas seriam produtividade em etanol, rendimento e conversão.
- Testar o modelo desenvolvido com aproximadamente 66 % de hidrolisado na mistura para predição da cinética da fermentação com outras proporções de hidrolisado e melaço.
- Realizar experimentos de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) utilizando bagaço de cana-de-açúcar como matéria-prima, e comparar resultados de rendimento em etanol e produtividade com o processo de sacarificação e fermentação separados (SHF).
- Realizar avaliação de custos do processo de SHF e SSF. Para isso poderia estudar para cada caso, a quantidade de energia envolvida na agitação, consumo de enzimas, gasto de vapor para manutenção da temperatura e produtividade global em etanol. A simulação da produtividade de cada do processo seria realizada em Fortran, considerando suas cinéticas de produção de etanol.
- Desenvolver um novo modelo matemático para crescimento microbiano incluindo furfural e hidroximetilfurfural como inibidores da etapa de fermentação.
- Avaliar a cinética da produção de etanol a partir de hidrolisado enzimático concentrado com melaço para co-culturas de *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia stipitis* para aumento da produtividade em etanol, possibilitando o metabolismo de pentoses e hexoses presentes no meio de cultivo.
- Determinar a cinética de fermentação alcoólica com reciclo de células a partir de caldo hidrolisado levando em conta a influência da pressão osmótica nos parâmetros. A pressão osmótica é um fator importante a ser considerado em processos de bateladas repetidas, já essa pode levar ao acúmulo de íons tais como Mg^{+2} , Fe^{+2} , K^{+} , Zn^{+2} e Cu^{+2} , os quais impactam na cinética do processo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-BANAT, B.; HOSHIDA, H.; ANO, A.; NONKLANG, S.; AKADA, R. High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 4, p. 861-867, 2010.

AGÊNCIA-ESTADO. **Setor sucroalcooleiro foi o maior gerador de vagas em abril, diz Fiesp**. Disponível em: <<http://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2011/05/fiesp-setor-sucroalcooleiro-foi-maior-gerador-de-vagas-em-abril.html>>. Acesso em: 09/08/2011 2011

AHMANN, D.; DORGAN, J. R. Bioengineering for Pollution Prevention through Development of Biobased Energy and Materials State of the Science Report. National Center for Environmental Research. Washington, DC, p.196. 2007

AIBA, S.; SHODA, M. Reassessment of the product inhibition in alcohol fermentation. **J. Ferment. Technol.**, v. 47, p. 790–803, 1969.

AIBA, S.; SHODA, M.; NAGATANI, M. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 10, n. 6, p. 845-864, 1968.

ALIZADEH, H.; TEYMOURI, F.; GILBERT, T.; DALE, B. Pretreatment of switchgrass by ammonia fiber explosion (AFEX). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 124, n. 1, p. 1133-1141, 2005.

ALMEIDA, J.; BERTILSSON, M.; GORWA-GRAUSLUND, M.; GORSICH, S.; LIDÉN, G. Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 4, p. 625-638, 2009.

ALMEIDA, J. R. M.; MODIG, T.; PETERSSON, A.; HÄHN-HÄGERDAL, B.; LIDÉN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, n. 4, p. 340-349, 2007.

ALVES, J. G. L. F. **Estudo da influência da temperatura na cinética de crescimento anaeróbico de *Saccharomyces cerevisiae***. 1996. 69 f. Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 1996.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.

ANDRADE, R.; RIVERA, E.; ATALA, D.; FILHO, R.; FILHO, F.; COSTA, A. Study of kinetic parameters in a mechanistic model for bioethanol production through a screening technique and optimization. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, n. 5, p. 673-680, 2009.

ANDRADE, R. R. **Procedimento para o desenvolvimento de um modelo matemático robusto para o processo de fermentação alcoólica**. 2007. Mestrado. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2007.

ANDREWS, J. F. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 10, n. 6, p. 707-723, 1968.

ANDRIETTA, S. R. **Modelagem, simulação e controle de fermentação alcoólica em escala industrial**. 1994. 178 f. Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 1994.

ATALA, D.; COSTA, A.; MACIEL, R.; MAUGERI, F. Kinetics of ethanol fermentation with high biomass concentration considering the effect of temperature. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91-93, n. 1, p. 353-365, 2001.

ATALA, D. I. P. **Fermentação alcoólica com alta densidade celular: Modelagem cinética, convalidação de parâmetros e otimização do processo**. 2000. Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2000.

ATALA, D. I. P. **Montagem, instrumentação, controle e desenvolvimento experimental de um processo de fermentação alcoólica extrativo**. 2004. Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2004.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. Second Edition ed. New York: Mc Graw-Hill

1986.

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

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos. Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Segunda edição ed. Campinas-SP: Editora da Unicamp, 2003.

BASSO, L. C.; DE AMORIM, H. V.; DE OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008.

BERES, D. L.; HAWKINS, D. M. Plackett-Burman technique for sensitivity analysis of many-parametered models. **Ecological Modelling**, v. 141, n. 1-3, p. 171-183, 2001.

BERNARDO NETO, O. **Integração das principais tecnologias de obtenção de etanol através do processamento de celulose (2a geração) nas atuais usinas de processamento de cana-de-açúcar (1a geração)**

2009. Mestrado. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, Departamento de Engenharia de Telecomunicações e Controle, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

BLANCH, H. W.; CLARK, D. S. **Biochemical Engineering**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1997.

BORZANI, W. Cinética de reações enzimáticas. In: W. Borzani, W. Schmidell, *et al.* **Biotecnologia Industrial** São Paulo, 2001. v. 1, p. 197-216

BOTERO, A.; GARHYAN, P.; ELNASHAIE, S. S. E. H. Non-linear characteristics of a membrane fermentor for ethanol production and their implications. **Nonlinear Analysis: Real World Applications**, v. 7, n. 3, p. 432-457, 2006.

BOYER, L. J.; VEGA, J. L.; KLASSON, K. T.; CLAUSEN, E. C.; GADDY, J. L. The effects of furfural on ethanol production by *saccharomyces cerevisiae* in batch culture. **Biomass and Bioenergy**, v. 3, n. 1, p. 41-48, 1992.

BRANDBERG, T.; FRANZ; EACUTE; N, C. J.; GUSTAFSSON, L. The Fermentation Performance of Nine Strains of *Saccharomyces cerevisiae* in Batch and Fed-Batch Cultures in Dilute-Acid Wood Hydrolysate. **The Society for Biotechnology, Japan**, v. 98, n. 2, p. 122-125, 2004.

BRAUNBECK, O. A.; CORTEZ, L. A. B. O cultivo da cana-de-açúcar e o uso dos resíduos. In: F. Rossillo-Calle, S. V. Bajay, *et al.* **Uso da biomassa para produção de energia na indústria brasileira** Campinas-SP, 2005. v., p. 215-246

BRETHAUER, S.; WYMAN, C. E. Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4862-4874, 2010.

CARLI, C. M. **Hidrólise e fermentação do bagaço de cana-de-açúcar em escala de bancada para produção de etanol 2 G.** 2011. Mestrado. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 2011.

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; GÍRIO, F. M. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. **J. Sci. Ind. Res**, v. 67, p. 849–864, 2008.

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

CHEN, Y. **Initial investigation on xylose fermentation for lignocellulosic bioethanol production.** 2009. 89 f. Master. Graduate Faculty of Auburn University, Auburn University Auburn- Alabama, 2009.

CHOI, G.-W.; KANG, H.-W.; MOON, S.-K. Repeated-batch fermentation using flocculent hybrid *Saccharomyces cerevisiae* CHFY0321 for efficient production of bioethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 2, p. 261-269, 2009.

CHUN, C.; GUIZHUAN, X. U.; XIAOJIAN, M. A. Optimization of process parameters for ethanol production from alkaline-pretreated wheat straw by fed-batch simultaneous saccharification and fermentation. **Advanced Materials Research**, v. 236-238, p. 922-925, 2011.

CIÊNCIA, J. D. **CTC busca elevar escala de etanol celulósico**. Disponível em: <<http://www.jornaldaciencia.org.br/Detalhe.jsp?id=78253>>. Acesso em: 29 Julho. 2011 2011

CONAB E MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. **Cana-de-açúcar: Safra cai 5,6% em 2011/2012**. Disponível em: <<https://www2.cead.ufv.br/espacoProdutor/scripts/verNoticia.php?codigo=1006&acao=exibir#>>. Acesso em: 13 de março 2012

CORTEZ, L. A. B.; LORA, E. E. S.; AYARZA, J. A. C. Biomassa no Brasil e no mundo. In: L. A. B. Cortez, E. E. S. Lora, *et al.* **Biomassa para energia** Campinas-SP, 2008a. v., p. 15-29

CORTEZ, L. A. B.; LORA, E. E. S.; GOMÉZ, E. O. Caracterização da biomassa. In: L. A. B. Cortez, E. E. S. Lora, *et al.* **Biomassa para energia** Campinas-SP, 2008b. v., p. 31-59

COSTA, A. C.; ATALA, D. I. P.; MAUGERI, F.; MACIEL, R. Factorial design and simulation for the optimization and determination of control structures for an extractive alcoholic fermentation. **Process Biochemistry (Amsterdam, Netherlands)**, v. 37, n. 2, p. 125-137, 2001.

COSTA, A. C.; MELEIRO, L. A. C.; MACIEL FILHO, R. Non-linear predictive control of an extractive alcoholic fermentation process. **Process Biochemistry (Amsterdam, Netherlands)**, v. 38, n. 5, p. 743-750, 2002.

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

DE ANDRADE, R.; CCOPA RIVERA, E.; COSTA, A.; ATALA, D.; FILHO, F.; FILHO, R. Estimation of temperature dependent parameters of a batch alcoholic fermentation process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137-140, n. 1, p. 753-763, 2007.

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

DUNLOP, A. P. Furfural formation and behavior. **Ind. Eng. Chem.**, v. 40, p. 204–209, 1948.

DUNN, I. J.; HEINZLE, E.; INGHAN, J.; PRENOSIL, J. E. **Biological Reaction Engineering**. Wiley-VCH, 1992.

DUTTA, R. **Fundamentals of Biochemical Engineering**. New Delhi, India: Ane Books India, 2008.

FEHR, M.; COSTA, A.; MARTINS, A.; OLIVEIRA, P.; SILVA, M. Pragmatic policy options for monitoring the movement of carbon dioxide derived from fossil and bio-fuels. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 13, n. 1, p. 63-69, 2011.

FINGUERUT, J.; MEIRELLES, A. J. A.; GUIRARDELLO, R.; COSTA, A. C. Fermentação, hidrólise e destilação. In: L. A. B. Cortez, E. E. S. Lora, *et al.* **Biomassa para energia** Campinas-SP, 2008. v., p. 435-474

GARCIA, D. R. **Determinação de dados cinéticos do pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com peróxido de hidrogênio alcalino e da hidrólise enzimática posterior**. 2009. Mestrado. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2009.

GARZÓN FUENTES, L. L. **Determinação de dados cinéticos da deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar e da hidrólise enzimática no pré- tratamento com hidróxido de cálcio**. 2009. Mestrado. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2009.

GHOSE, T. K.; TYAGI, R. D. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. II. Product and substrate inhibition and optimization of fermentor design. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 21, n. 8, p. 1401-1420, 1979.

GODOY, A.; AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, A. J. Continuous and batch fermentation processes: advantages and disadvantages of these processes in the Brazilian ethanol production. . **Int. Sugar J.**, v. 110 (1311), p. 175–182, 2008.

GOLDEMBERG, J. **Brazilian Energy Initiative**. World summit on sustainable development. Johannesburg, South Africa, 2002.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T.; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. **Energy Policy**, v. 36, n. 6, p. 2086-2097, 2008.

GOLIAS, H.; DUMSDAY, G. J.; STANLEY, G. A.; PAMMENT, N. B. Evaluation of a recombinant *Klebsiella oxytoca* strain for ethanol production from cellulose by simultaneous saccharification and fermentation: comparison with native cellobiose-utilising yeast strains and performance in co-culture with thermotolerant yeast and *Zymomonas mobilis*. **Journal of Biotechnology**, v. 96, n. 2, p. 155-168, 2002.

GOULD, J. M. Alkaline peroxide delignification of agricultural residues to enhance enzymatic saccharification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, n. 1, p. 46-52, 1984.

GOULD, J. M. Studies on the mechanism of alkaline peroxide delignification of agricultural residues. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, n. 3, p. 225-231, 1985.

GUPTA, R.; SHARMA, K. K.; KUHAD, R. C. Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of *Prosopis juliflora*, a woody substrate, for the production of cellulosic ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*-NCIM 3498. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 3, p. 1214-1220, 2009.

HAN, K.; LEVENSPIEL, O. Extended monod kinetics for substrate, product, and cell inhibition. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 32, n. 4, p. 430-447, 1988.

HEER, D.; SAUER, U. Identification of furfural as a key toxin in lignocellulosic hydrolysates and evolution of a tolerant yeast strain. **Microbial Biotechnology**, v. 1, n. 6, p. 497-506, 2008.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 10-18, 2009.

HINDMARSH, A. C. **ODEPACK, A Systematized Collection of ODE Solvers, in Scientific Computing**. North-Holland, Amsterdam 1983.

HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In: W. Schmidell, U. A. Lima, *et al.* **Biotecnologia Industrial** São Paulo, 2001. v. 2, p. 93-122

HOYER, K.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Effects of enzyme feeding strategy on ethanol yield in fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of spruce at high dry matter. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3(14), p. 1-11, 2010.

HSU, T. Pretreatment of biomass. In: C. E. Wyman. **Handbook on bioethanol: Production and utilization** Washington DC, 1996. v., p. 179-212

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

KALIL, S. J.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. **Process Biochemistry (Amsterdam, Netherlands)**, v. 35, n. 6, p. 539-550, 2000.

KALIYAN, N.; MOREY, R. V.; TIFFANY, D. G. Reducing life cycle greenhouse gas emissions of corn ethanol by integrating biomass to produce heat and power at ethanol plants. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 3, p. 1103-1113, 2011.

KENNEDY, M.; KROUSE, D. Strategies for improving fermentation medium performance: a review. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 456-475, 1999.

KUMAR, R.; WYMAN, C. E. Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. **Biotechnology Progress**, v. 25, n. 2, p. 302-314, 2009.

LARSSON, S.; PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. R.; TENGBORG, C.; STENBERG, K.; ZACCHI, G.; NILVEBRANT, N.-O. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, n. 3-4, p. 151-159, 1999.

LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S. G.; LICHWA, J.; ANTAL JR, M. J.; LYND, L. R. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**, v. 81, n. 1, p. 33-44, 2002.

LEE, J. M.; POLLARD, J. F.; COULMAN, G. A. Ethanol fermentation with cell recycling: Computer simulation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, n. 2, p. 497-511, 1983.

LEVENSPIEL, O. The monod equation: A revisit and a generalization to product inhibition situations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 22, n. 8, p. 1671-1687, 1980.

LINDE, M.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated barley straw at low enzyme loadings and low yeast concentration. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1100-1107, 2007.

LUDOVICO, P. S., M. J.; SILVA, M. T.; LEÃO, C.; CÔRTE-REAL, M. *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. **Microbiology**, v. 147, p. 2409–2415, 2001.

LUEDEKING, R.; PIRET, E. L. A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. **Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering**, v. 1, n. 4, p. 393-412, 1959.

MACEDO, I. C.; SEABRA, J. E. A.; SILVA, J. O. E. A. R. Green house gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, n. 7, p. 582-595, 2008.

MAIORELLA, B.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, n. 1, p. 103-121, 1983.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar, primeiro levantamento, maio 2011**. Disponível em: <Erro! A referência de hiperlink não é válida.. Acesso em: Julho/ 2011 2011

MARIANO, A. P.; COSTA, C. B. B.; DE ANGELIS, D. D. F.; MAUGERI FILHO, F.; ATALA, D. I. P.; WOLF MACIEL, M. R.; MACIEL FILHO, R. Optimisation of a continuous flash

fermentation for butanol production using the response surface methodology. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 88, n. 5-6, p. 562-571, 2010.

MARTÍN, C.; MARCET, M.; ALMAZÁN, O.; JÄNNSSON, L. J. Adaptation of a recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain to a sugarcane bagasse hydrolysate with high content of fermentation inhibitors. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 9, p. 1767-1773, 2007.

MAUGERI, F.; HERNALSTEENS, S. Screening of yeast strains for transfructosylating activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 49, n. 1-4, p. 43-49, 2007.

MEGEE, R. D.; DRAKE, J. F.; FREDRICKSON, A. G.; TSUCHIYA, H. M. Studies in intermicrobial symbiosis. *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus casei*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 18, n. 11, p. 1733-1742, 1972.

MEN, X.; YANG, X.; TIAN, S. Ethanol production from non-detoxified steam-exploded corn stover subsequent enzymatic hydrolysis by two toxin-tolerant yeast strains. **Advanced Materials Research**, v. 365, p. 145-149, 2012.

MIKULÁŠOVÁ, M.; VODNÝ, Š.; PEKAROVIČOVÁ, A. Influence of phenolics on biomass production by *Candida utilis* and *Candida albicans*. **Biomass**, v. 23, n. 2, p. 149-154, 1990.

MIRANDA, E. E.; DORADO, A. J.; ASSUNÇÃO, J. V. Doenças respiratórias crônicas em quatro municípios paulistas (Chronic respiratory disease in four São Paulo municipalities). Ecoforça. São Paulo 1994.

MIRANDA JÚNIOR, M.; BATISTOTE, M.; CILLI, E. M.; ERNANDES, J. R. Sucrose fermentation by Brazilian ethanol production yeasts in media containing structurally complex nitrogen sources. **J. Inst. Brew**, v. 115, n. 3, p. 191-197, 2009.

MODIG, T.; ALMEIDA, J. R. M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDÉN, G. Variability of the response of *Saccharomyces cerevisiae* strains to lignocellulose hydrolysate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, n. 3, p. 423-429, 2008.

MONOD, J. La technique de culture continue; théorie et applications. **Annales de l'Institut Pasteur**, v. 79, n. 4, p. 390-410, 1950.

MORALES-RODRIGUEZ, R.; MEYER, A. S.; GERNAEY, K. V.; SIN, G. R. Dynamic model-based evaluation of process configurations for integrated operation of hydrolysis and co-fermentation for bioethanol production from lignocellulose. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1174-1184, 2011.

MOREIRA NETO, J. **Modelagem matemática do processo de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar submetido a diferentes pré-tratamentos**. 2011. Mestrado. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2011.

MORENO, A. **Safra brasileira cai 8,4% em 2011**. Disponível em: <<http://www.jornalcana.com.br/noticia/Jornal-Cana/43989+Safra-brasileira-cai-8-4-em-2011>>. Acesso em: 08 de dezembro de 2011

MOSER, A. Kinetics of batch fermentation In: H. J. Rehn, G. Reed, *et al.* **Biotechnology - A comprehensive treatise in 8 volumes** Verlagsgesellschaft, 1985. v. 2, p. 243 - 283

MOSER, H. **The dynamics of bacterial populations maintained in the chemostat**. Washington 1958.

MOSIER, N.; HENDRICKSON, R.; HO, N.; SEDLAK, M.; LADISCH, M. R. Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 18, p. 1986-1993, 2005.

NARAYANASWAMY, N.; FAIK, A.; GOETZ, D. J.; GU, T. Supercritical carbon dioxide pretreatment of corn stover and switchgrass for lignocellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 13, p. 6995-7000, 2011.

NARENDRANATH, N. V.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 171-177, 2001.

OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 5, p. 312-331, 1996.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 17-24, 2000.

PAN, X.; ARATO, C.; GILKES, N.; GREGG, D.; MABEE, W.; PYE, K.; XIAO, Z.; ZHANG, X.; SADDLER, J. Biorefining of softwoods using ethanol organosolv pulping: Preliminary evaluation of process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and co-products. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 90, n. 4, p. 473-481, 2005.

PARK, I.; KIM, I.; KANG, K.; SOHN, H.; RHEE, I.; JIN, I.; JANG, H. Cellulose ethanol production from waste newsprint by simultaneous saccharification and fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377. **Process Biochemistry (Amsterdam, Netherlands)**, v. 45, n. 4, p. 487-492, 2010.

PASQUINI, D.; PIMENTA, M. T. B.; FERREIRA, L. H.; CURVELO, A. A. S. Sugar cane bagasse pulping using supercritical CO₂ associated with co-solvent 1-butanol/water. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, n. 2, p. 125-131, 2005.

PEREIRA, F.; GOMES, D.; GUIMARÃES, P.; TEIXEIRA, J.; DOMINGUES, L. Cell recycling during repeated very high gravity bio-ethanol fermentations using the industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain PE-2. **Biotechnology Letters**, v. 34, n. 1, p. 45-53, 2012.

PHISALAPHONG, M.; SRIRATTANA, N.; TANTHAPANICHAKOON, W. Mathematical modeling to investigate temperature effect on kinetic parameters of ethanol fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 28, n. 1, p. 36-43, 2006.

PINHEIRO, C. Usinas de açúcar reduzem queimadas e consumo de água. Disponível em: <<http://www2.senado.gov.br/bdsf/item/id/13152>>. Acesso em: 05/06 2007

PIRT, S. J. **The maintenance requirement of bacteria in growing cultures**. Proceedings of the Royal Society of London, 1966.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The Design of Optimum Multifactorial Experiments. **Biometrika**, v. 33, n. 4, p. 305-325, 1946.

PROCANA. ProCana Brasil lança Anuário da Cana 2011 no Ethanol Summit. Disponível em: <http://www.jornalcana.com.br/conteudo/noticia.asp?id_materia=43251>. Acesso em: 10/01/2012 2012

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar.** 2007. Mestrado. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2007.

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração.** 2010. 403 f. Doutorado. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP
2010.

RABELO, S. C.; AMEZQUITA FONSECA, N. A.; ANDRADE, R. R.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A. C. Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 7, p. 2600-2607, 2011.

REDDY, L. V. A.; REDDY, O. V. S. Effect of fermentation conditions on yeast growth and volatile composition of wine produced from mango (*Mangifera indica* L.) fruit juice. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 4, p. 487-491, 2011.

RIVERA, E. C.; RABELO, S. C.; DOS REIS GARCIA, D.; FILHO, R. M.; DA COSTA, A. C. Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for bioethanol production: determining optimal enzyme loading using neural networks. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, n. 7, p. 983-992, 2010.

ROCHA, G. J. M.; GONÇALVES, A. R.; OLIVEIRA, B. R.; OLIVARES, E. G.; ROSSELL, C. E. V. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 35, n. 1, p. 274-279, 2012.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos.** Campinas-SP: Casa do Pão Editora, 2005.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos.** Campinas-SP: Casa do Pão Editora, 2009.

RONQUIM, C. C. **Queimada na colheita da cana-de-açúcar: impactos ambientais, sociais e econômicos.** Disponível em: <http://www.cnpm.embrapa.br/publica/download/Doc_77.pdf>. Acesso em: Dezembro 2010

SAHA, B. C.; COTTA, M. A. Enzymatic saccharification and fermentation of alkaline peroxide pretreated rice hulls to ethanol. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 4, p. 528-532, 2007.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 185-194, 2009.

SANCHEZ, S.; BRAVO, V.; MOYA, A. J.; CASTRO, E.; CAMACHO, F. Influence of temperature on the fermentation of d-xylose by *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol and xylitol. **Process Biochemistry (Amsterdam, Netherlands)**, v. 39, n. 6, p. 673-679, 2004.

SANDA, T.; HASUNUMA, T.; MATSUDA, F.; KONDO, A. Repeated-batch fermentation of lignocellulosic hydrolysate to ethanol using a hybrid *Saccharomyces cerevisiae* strain metabolically engineered for tolerance to acetic and formic acids. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 17, p. 7917-7924, 2011.

SANTOS, A. L. F.; KAWASE, K. T. Y. F.; COELHO, G. L. V. Enzymatic saccharification of lignocellulosic materials after treatment with supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 56, n. 3, p. 277-282, 2011.

SANTOS, C. **Combustível verde em crise.** Disponível em: <<http://www.jornalopcao.com.br/posts/reportagens/combustivel-verde-em-crise>>. Acesso em: 13 de março 2012

SANTOS, J. R. A.; LUCENA, M. S.; GUSMÃO, N. B.; GOUVEIA, E. R. Optimization of ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1238 in simultaneous saccharification and fermentation of delignified sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 36, n. 1, p. 584-588, 2012.

SASSNER, P.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Bioethanol production based on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated *Salix* at high dry-matter content. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 4, p. 756-762, 2006.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. Biorreatores e processos fermentativos. In: U. A. Lima, E. Aquarone, *et al.* **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica** São Paulo, 2001. v. 2, p. 179-192

SENDICH, E.; LASER, M.; KIM, S.; ALIZADEH, H.; LAUREANO-PEREZ, L.; DALE, B.; LYND, L. Recent process improvements for the ammonia fiber expansion (AFEX) process and resulting reductions in minimum ethanol selling price. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8429-8435, 2008.

SLININGER, P. J.; THOMPSON, S. R.; WEBER, S.; LIU, Z. L.; MOON, J. Repression of xylose-specific enzymes by ethanol in *Scheffersomyces* (*Pichia*) *stipitis* and utility of repitching xylose-grown populations to eliminate diauxic lag. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 8, p. 1801-1815, 2011.

STANLEY, D.; BANDARA, A.; FRASER, S.; CHAMBERS, P. J.; STANLEY, G. A. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 1, p. 13-24, 2010.

STECKELBERG, C. **Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas**. 2001. 215 f. Doutorado. Faculdade de Engenharia Química Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2001.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.

SZCZODRAK, J.; FIEDUREK, J. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v. 10, n. 5-6, p. 367-375, 1996.

TAHERZADEH, M.; KARIMI, K. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 9, p. 1621-1651, 2008.

TAHERZADEH, M. J.; GUSTAFSSON, L.; NIKLASSON, C.; LIDÅN, G. Inhibition effects of furfural on aerobic batch cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* growing on ethanol and/or acetic acid. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 90, n. 4, p. 374-380, 2000.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. **Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review**. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/2320/2959>>. Acesso em:

TEERI, T. T. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 5, p. 160-167, 1997.

TORIJA, M. J. S.; ROZÁÑS, N.; POBLET, M.; GUILLAMÁN, J. M.; MAS, A. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80, n. 1, p. 47-53, 2003.

TSAO, G. T.; HANSON, T. P. Extended Monod equation for batch cultures with multiple exponential phases. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 17, n. 11, p. 1591-1598, 1975.

VALLE, S. **Consumo de etanol cai e de gasolina sobe**. Disponível em: <<http://blogs.estadao.com.br/jt-seu-bolso/tag/cana-de-acucar/>>. Acesso em: 16/02 2012

VERDUYN, C.; POSTMA, E.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. P. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: A continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. **Yeast**, v. 8, n. 7, p. 501-517, 1992.

VISUAL NUMERICS INC. **IMLS - Fortran subroutines for mathematical applications**. Houston-USA: Visual Numerics Inc., 1997.

WANG, M. Q.; HAN, J.; HAQ, Z.; TYNER, W. E.; WU, M.; ELGOWAINY, A. Energy and greenhouse gas emission effects of corn and cellulosic ethanol with technology improvements and land use changes. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 5, p. 1885-1896, 2011.

WYMAN, C. E. Ethanol production from lignocellulosic biomass: Overview. In: C. E. Wyman. **Handbook on bioethanol: Production and Utilization** Washington, D. C, 1996. v., p. 1-18

XU, Q.; SINGH, A.; HIMMEL, M. E. Perspectives and new directions for the production of bioethanol using consolidated bioprocessing of lignocellulose. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 364-371, 2009.

YOSHIDA, N.; MINAMIMURA, T.; YOSHIDA, T.; OGAWA, K. Effect of hypergravitational stress on microbial cell viability. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, n. 3, p. 342-344, 1999.

ZHANG, S.; XU, Y.; HANNA, M. Pretreatment of Corn Stover with Twin-Screw Extrusion Followed by Enzymatic Saccharification. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 2, p. 458-469, 2012.

ZHAO, B.; WANG, L.; LI, F.; HUA, D.; MA, C.; MA, Y.; XU, P. Kinetics of d-lactic acid production by *Sporolactobacillus* sp. strain CASD using repeated batch fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 16, p. 6499-6505, 2010.

ZHENG, Y.; LIN, H. M.; TSAO, G. T. Pretreatment for Cellulose Hydrolysis by Carbon Dioxide Explosion. **Biotechnology Progress**, v. 14, n. 6, p. 890-896, 1998.

ZHENG, Y.; PAN, Z.; ZHANG, R.; JENKINS, B. M. Kinetic modeling for enzymatic hydrolysis of pretreated creeping wild ryegrass. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 6, p. 1558-1569, 2009.

ZHENG, Y.; ZHANG, R. Lignocellulosic biomass pretreatment for bioethanol production. In: J. B. Erbaum. **Bioethanol: Production, benefits and economics** New York, 2009. v., p. 1-48

APÊNDICE I

Resultados do Planejamento de Plackett-Burman para as concentrações de células, etanol e variação de substrato obtidos por simulação ao longo da fermentação. Os resultados são mostrados nas Tabelas I.1 a I.10.

Tabela I.1 – Resultado das simulações de fermentação no tempo de 2 h para nível inferior (-) e superior (+) dos parâmetros utilizados no planejamento Plackett – Burman. As variáveis X , ΔS e P denotam a concentrações de células, diferença entre concentração de substrato inicial e no tempo t , e concentração de produto em t , respectivamente.

Tempo Simulação	2 horas		
	X (h)	ΔS (g/L)	P(g/L)
1	3.255	19.760	11.872
2	3.238	15.720	11.727
3	3.164	13.955	9.073
4	3.092	14.191	9.299
5	3.168	13.841	10.501
6	3.229	15.474	9.919
7	3.198	17.669	9.638
8	3.188	17.571	10.934
9	3.133	13.128	9.944
10	3.180	14.170	10.813
11	3.095	12.104	9.458
12	3.178	14.334	9.255
13	3.078	13.706	9.066
14	3.091	11.763	8.244
15	3.117	15.230	9.805
16	3.082	11.742	8.122
17	3.231	18.997	10.070
18	3.190	17.636	9.415
19	3.153	16.178	9.048
20	3.146	15.958	8.844

Tabela I.2 – Resultado das simulações de fermentação no tempo de 5 h para nível inferior (-) e superior (+) dos parâmetros utilizados no planejamento Plackett – Burman. As variáveis X , ΔS e P denotam a concentrações de células, diferença entre concentração de substrato inicial e no tempo t , e concentração de produto em t , respectivamente.

Tempo Simulação	5 horas		
	X (h)	ΔS (g/L)	P(g/L)
1	4.137	51.031	26.776
2	4.034	38.962	25.471
3	3.931	36.805	19.923
4	3.734	36.987	20.328
5	3.846	33.857	22.132
6	4.018	38.527	21.073
7	4.044	47.251	21.735
8	3.949	44.789	24.104
9	3.795	33.126	21.321
10	3.947	36.583	24.067
11	3.705	30.644	20.187
12	3.948	37.279	20.151
13	3.644	34.035	18.903
14	3.718	30.367	17.454
15	3.723	37.307	20.493
16	3.692	30.285	17.106
17	4.030	47.494	21.569
18	3.987	46.056	20.665
19	3.881	41.861	19.595
20	3.860	41.167	18.992

Tabela I.3 – Resultado das simulações de fermentação no tempo de 8 h para nível inferior (-) e superior (+) dos parâmetros utilizados no planejamento Plackett – Burman. As variáveis X , ΔS e P denotam a concentrações de células, diferença entre concentração de substrato inicial e no tempo t , e concentração de produto em t , respectivamente.

Tempo Simulação	8 horas		
	X (h)	ΔS (g/L)	P(g/L)
1	4.955	80.779	40.905
2	4.702	59.203	37.455
3	4.712	60.538	31.162
4	4.379	60.266	31.595
5	4.418	51.380	32.262
6	4.704	59.245	31.108
7	4.918	78.247	34.492
8	4.648	70.484	36.548
9	4.406	52.171	32.059
10	4.678	58.456	37.013
11	4.268	48.342	30.385
12	4.702	60.287	31.039
13	4.153	52.778	27.981
14	4.339	49.151	26.795
15	4.244	56.965	30.022
16	4.289	48.907	26.135
17	4.724	73.074	31.970
18	4.759	74.171	31.802
19	4.592	67.413	30.175
20	4.548	65.949	29.012

Tabela I.4 – Resultado das simulações de fermentação no tempo de 10 h para nível inferior (-) e superior (+) dos parâmetros utilizados no planejamento Plackett – Burman. As variáveis X , ΔS e P denotam a concentrações de células, diferença entre concentração de substrato inicial e no tempo t , e concentração de produto em t , respectivamente.

Tempo Simulação	10 horas		
	X (h)	ΔS (g/L)	P(g/L)
1	5.416	98.110	49.097
2	5.050	70.255	44.008
3	5.205	75.921	38.422
4	4.785	75.192	38.823
5	4.726	61.270	37.945
6	5.081	71.086	36.851
7	5.464	97.945	42.671
8	5.047	85.641	43.897
9	4.765	63.793	38.547
10	5.108	71.735	44.879
11	4.596	59.066	36.532
12	5.161	74.745	37.854
13	4.446	63.898	33.372
14	4.730	61.224	32.828
15	4.532	68.294	35.521
16	4.659	60.764	31.889
17	5.100	87.537	37.906
18	5.213	91.191	38.551
19	5.028	83.365	36.846
20	4.962	81.166	35.198

Tabela I.5 – Resultado das simulações de fermentação no tempo de 15 h para nível inferior (-) e superior (+) dos parâmetros utilizados no planejamento Plackett – Burman. As variáveis X , ΔS e P denotam a concentrações de células, diferença entre concentração de substrato inicial e no tempo t , e concentração de produto em t , respectivamente.

Tempo Simulação	15 horas		
	X (h)	ΔS (g/L)	P(g/L)
1	6.198	130.102	64.057
2	5.597	89.701	55.577
3	6.222	109.425	54.119
4	5.623	107.283	54.385
5	5.261	80.100	48.641
6	5.743	93.682	47.836
7	6.485	136.752	59.160
8	5.761	114.972	58.150
9	5.465	88.157	51.890
10	5.907	98.094	60.526
11	5.209	80.873	48.902
12	6.073	105.346	52.159
13	5.001	86.295	44.250
14	5.558	88.024	46.354
15	5.048	90.464	46.308
16	5.414	86.505	44.403
17	5.738	114.365	49.125
18	6.023	123.891	51.546
19	5.893	116.596	51.029
20	5.752	111.850	47.818

Tabela I.6 – Resultado das simulações de fermentação no tempo de 20 h para nível inferior (-) e superior (+) dos parâmetros utilizados no planejamento Plackett – Burman. As variáveis X , ΔS e P denotam a concentrações de células, diferença entre concentração de substrato inicial e no tempo t , e concentração de produto em t , respectivamente.

Tempo Simulação	20 horas		
	X (h)	ΔS (g/L)	P(g/L)
1	6.527	147.916	72.134
2	5.824	100.923	62.303
3	6.850	133.447	65.177
4	6.150	129.810	65.345
5	5.549	92.670	55.615
6	6.099	108.538	55.096
7	6.768	150.128	65.333
8	6.137	133.820	67.358
9	5.908	106.278	61.440
10	6.337	115.107	70.675
11	5.550	95.924	57.244
12	6.634	127.350	62.259
13	5.337	101.958	51.888
14	6.136	108.757	57.034
15	5.338	105.666	53.741
16	5.892	105.531	53.690
17	6.049	131.052	56.396
18	6.399	143.061	59.210
19	6.413	139.132	61.128
20	6.195	131.734	56.234

Tabela I.7 – Resultado das simulações de fermentação no tempo de 25 h para nível inferior (-) e superior (+) dos parâmetros utilizados no planejamento Plackett – Burman. As variáveis X , ΔS e P denotam a concentrações de células, diferença entre concentração de substrato inicial e no tempo t , e concentração de produto em t , respectivamente.

Tempo Simulação	25 horas		
	X (h)	ΔS (g/L)	P(g/L)
1	6.546	150.129	73.085
2	5.884	107.824	66.486
3	7.123	148.468	71.857
4	6.408	143.925	72.254
5	5.689	101.485	60.358
6	6.269	118.670	60.082
7	6.768	150.128	65.333
8	6.295	145.854	73.283
9	6.165	119.803	68.213
10	6.520	125.799	77.104
11	5.702	106.197	62.745
12	6.920	142.480	69.009
13	5.523	112.934	57.268
14	6.489	123.898	65.071
15	5.484	116.391	59.020
16	6.139	118.763	60.190
17	6.173	141.826	61.358
18	6.474	150.128	62.066
19	6.593	150.129	66.569
20	6.389	143.723	61.564

Tabela I.8 – Resultado das simulações de fermentação no tempo de 30 h para nível inferior (-) e superior (+) dos parâmetros utilizados no planejamento Plackett – Burman. As variáveis X , ΔS e P denotam a concentrações de células, diferença entre concentração de substrato inicial e no tempo t , e concentração de produto em t , respectivamente.

Tempo Simulação	30 horas		
	X (h)	ΔS (g/L)	P(g/L)
1	6.546	150.129	73.085
2	5.886	113.169	69.751
3	7.135	150.128	72.558
4	6.469	150.128	75.320
5	5.747	108.178	63.842
6	6.336	126.149	63.790
7	6.768	150.128	65.333
8	6.319	150.128	75.407
9	6.301	130.313	73.170
10	6.569	133.008	81.481
11	5.745	113.650	66.575
12	6.995	150.128	72.284
13	5.616	120.971	61.234
14	6.678	134.891	71.138
15	5.545	124.467	63.023
16	6.232	128.079	64.804
17	6.202	149.583	65.136
18	6.474	150.128	62.066
19	6.593	150.129	66.569
20	6.433	150.128	64.613

Tabela I.9 – Resultado das simulações de fermentação no tempo de 35 h para nível inferior (-) e superior (+) dos parâmetros utilizados no planejamento Plackett – Burman. As variáveis X , ΔS e P denotam a concentrações de células, diferença entre concentração de substrato inicial e no tempo t , e concentração de produto em t , respectivamente.

Tempo Simulação	35 horas		
	X (h)	ΔS (g/L)	P(g/L)
1	6.546	150.129	73.085
2	5.886	118.466	72.988
3	7.135	150.128	72.558
4	6.469	150.128	75.320
5	5.761	113.747	66.662
6	6.352	132.267	66.841
7	6.768	150.128	65.333
8	6.319	150.128	75.407
9	6.363	138.942	77.000
10	6.570	138.953	85.113
11	5.746	120.002	69.753
12	6.995	150.128	72.284
13	5.653	127.264	64.359
14	6.761	143.149	75.901
15	5.561	131.105	66.332
16	6.245	135.281	68.399
17	6.202	150.128	65.408
18	6.474	150.128	62.066
19	6.593	150.129	66.569
20	6.433	150.128	64.613

Tabela I.10 – Resultado das simulações de fermentação no tempo de 40 h para nível inferior (-) e superior (+) dos parâmetros utilizados no planejamento Plackett – Burman. As variáveis X , ΔS e P denotam a concentrações de células, diferença entre concentração de substrato inicial e no tempo t , e concentração de produto em t , respectivamente.

Tempo Simulação	40 horas		
	X (h)	ΔS (g/L)	P(g/L)
1	6.546	150.129	73.085
2	5.886	123.764	76.226
3	7.135	150.128	72.558
4	6.469	150.128	75.320
5	5.761	118.941	69.260
6	6.352	137.988	69.702
7	6.768	150.128	65.333
8	6.319	150.128	75.407
9	6.383	146.472	80.173
10	6.570	144.866	88.727
11	5.746	126.323	72.913
12	6.995	150.128	72.284
13	5.661	132.624	67.034
14	6.781	149.799	79.894
15	5.562	137.240	69.399
16	6.245	142.150	71.833
17	6.202	150.128	65.408
18	6.474	150.128	62.066
19	6.593	150.129	66.569
20	6.433	150.128	64.613

ANEXO A

ARTIGO COMPLEMENTAR AO CAPÍTULO 3: ESTIMATION OF TEMPERATURE DEPENDENT PARAMETERS OF A BATCH ALCOHOLIC FERMENTATION PROCESS

Nesse artigo foram apresentados resultados da cinética de fermentações em batelada usando melaço de cana-de-açúcar para temperaturas na faixa de 30 a 38 °C. Os dados experimentais foram ajustados a um modelo cinético através de uma rotina de otimização paramétrica desenvolvida em linguagem FORTRAN. Testou-se a capacidade de predição do modelo matemático para fermentações com melaço de safra distinta do utilizado no desenvolvimento do modelo original, obtendo-se baixa capacidade de predição caracterizada pelo alto desvio padrão residual obtido entre dados experimentais e simulados, na ordem de 40 %. A partir da re-estimação de somente os parâmetros dependentes da temperatura, pode-se reduzir esse desvio para no máximo 17 %, obtendo um modelo com maior acurácia. Concluiu-se que a re-estimação paramétrica é necessária sempre que ocorrerem mudanças nas condições operacionais de fermentação alcoólica para obtenção de um modelo matemático robusto.

Trabalho publicado no periódico **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2007.
v. 136-140, p. 753-763. Rafael Ramos de Andrade, Elmer C. Rivera, Aline C. Costa, Daniel I. P.
Atala, Francisco Maugeri Filho e Rubens Maciel Filho.

Estimation of Temperature Dependent Parameters of a Batch Alcoholic Fermentation Process

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

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

Abstract

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

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

Introduction

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

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

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

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

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

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

Materials and Methods

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

Table 1
Initial Substrate Concentrations and Temperature
for Experiments

Experiments	T(°C)	S ₀ (kg/m ³)
1	30	127.6
2	31.2	86.8
3	34	119.1
4	36.8	84.6
5	38	118.8
6	34	168.1

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

Viable cells were counted with the methylene blue staining technique (5). In this work the cell viability during batch fermentation was always close to 100%. Total reducing sugar and ethanol concentrations were determined by high-performance liquid chromatography (Varian 9010 model, Varian, Inc. Scientific Instruments, Palo Alto, CA). A SHODEX KS 801 column (Showa Denko, Tokyo, Japan) at 30°C was used. Ultrapure water obtained from Milli-Q Purification System (Millipore Corporation, Billerica, MA) containing Millipak membrane of 0.22 µm (diameter of pore) was mixed with H₂SO₄ (pH 1.4) and used as the eluent at a flow rate of 0.7 mL/min. The standards were mixed solutions of sucrose, glucose, fructose, and ethanol at concentrations from 0.1 to 40.0 kg/m³. The experiments were performed following the initial substrate concentrations and temperatures depicted in Table 1.

Parameter Estimation Problem

Batch Model

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Optimization Using the Quasi-Newton Algorithm

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

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

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

Minimize Eq. 8

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

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

Influence of Temperature on the Kinetics

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

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

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

Results

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

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

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

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

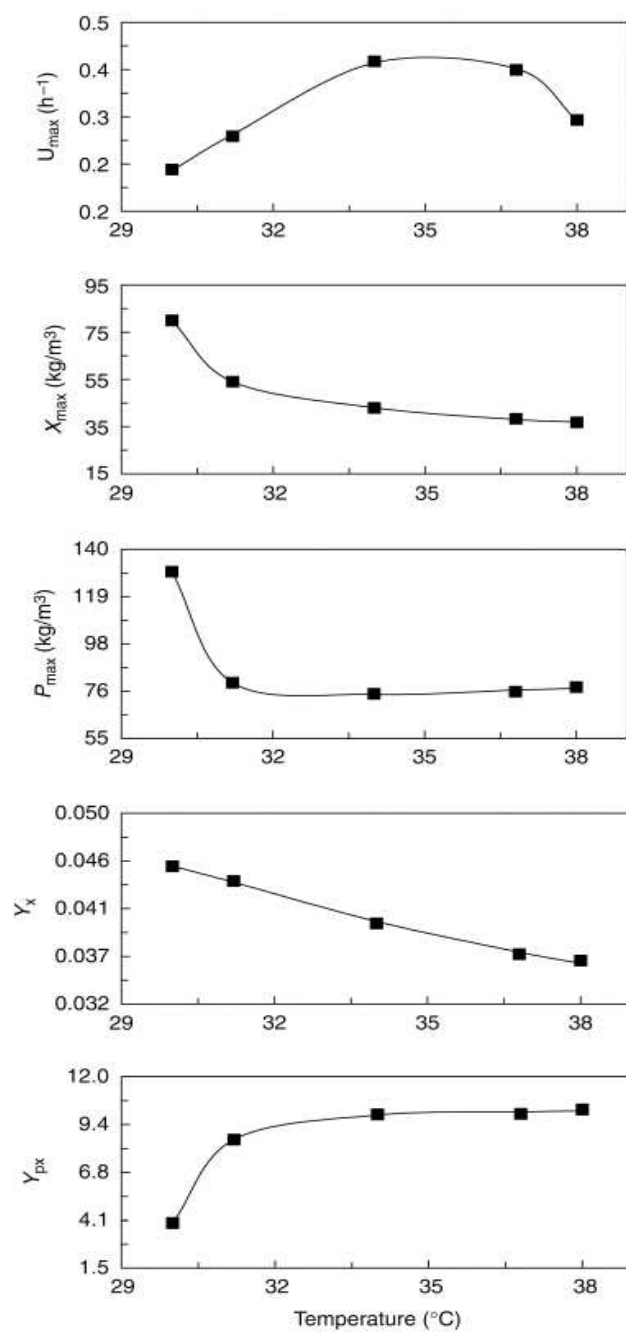


Fig. 1. Kinetic parameters optimized by QN algorithm at 30, 31.2, 34, 36.8, and 38°C, respectively.

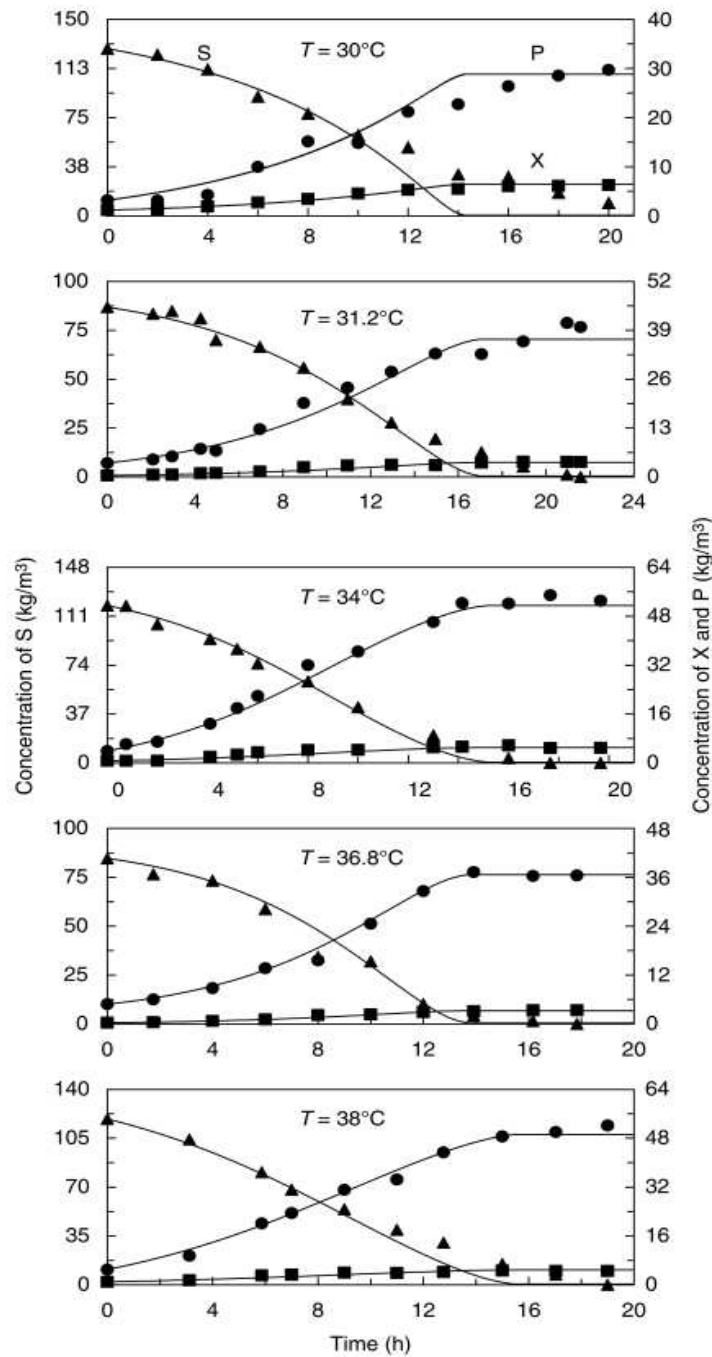


Fig. 2. Experimental and simulated data (QN—) from 30 to 38°C. Experimental data are for concentration of substrate, S ($\blacktriangle$); cell mass, X ($\blacksquare$); and ethanol, P ($\bullet$).

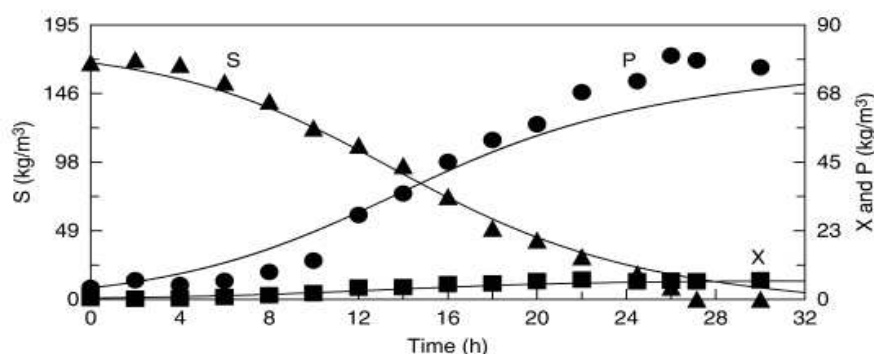


Fig. 3. Validation of the model. Experimental and simulated data for experiment 6 in Table 1. Experimental data are for concentration of substrate, S (▲); cell mass, X (■); and ethanol, P (●).

Table 3
RSDs (%) for the Batch Model

Output variable	RSD (%)					
	$T = 30^{\circ}\text{C}$	$T = 31.2^{\circ}\text{C}$	$T = 34^{\circ}\text{C}$	$T = 36.8^{\circ}\text{C}$	$T = 38^{\circ}\text{C}$	$T = 34^{\circ}\text{C}$ (validation)
X	9.5	15.6	18.6	9.6	12.1	16.6
S	23.3	10.4	8.2	12.9	14.1	8.0
P	14.6	11.0	6.3	4.9	4.9	8.4

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

Discussion

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

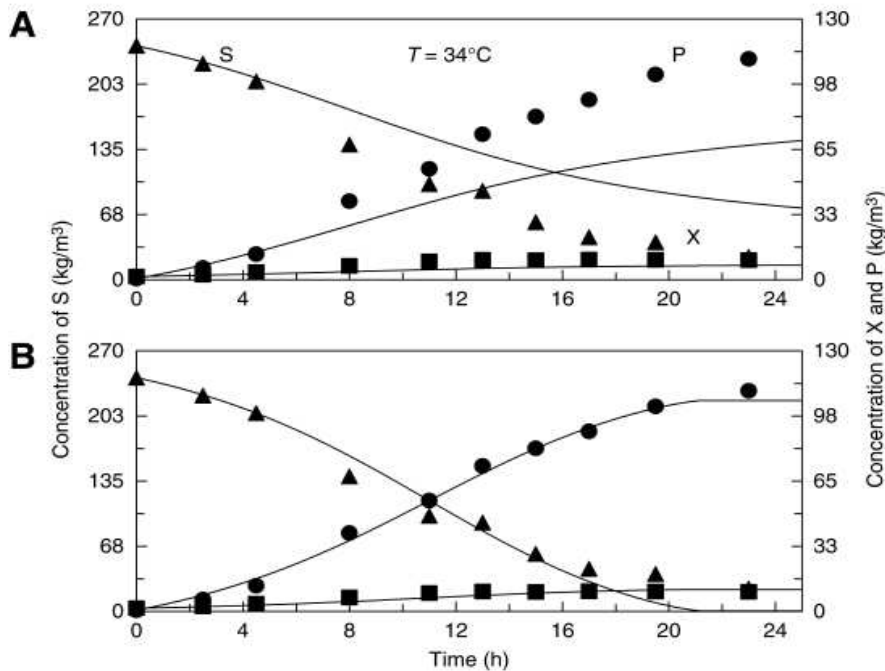


Fig. 4. Model performance in the presence of fluctuation in raw material composition. **(A)** Model without parameters re-estimation. **(B)** Model with parameters re-estimation. Experimental data are for concentration of substrate, S ($\blacktriangle$); cell mass, X ($\blacksquare$); and ethanol, P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

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

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

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

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

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

Acknowledgments

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

Nomenclature

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

References

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

