

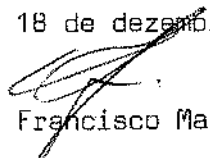
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**EFEITO DA TEMPERATURA NA CINÉTICA DE MORTE
CELULAR E EM FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA CONTÍNUA
COM RECICLO DE CÉLULAS**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por BRUNO SIQUEIRA DE CARVALHO e aprovada pela Comissão Julgadora em 18.12.96.

Campinas, 18 de dezembro de 1996.


Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
Presidente da Banca

Bruno Siqueira de Carvalho
Engenheiro Químico, UNICAMP, 1990

Prof. Francisco Maugeri Filho
ORIENTADOR

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

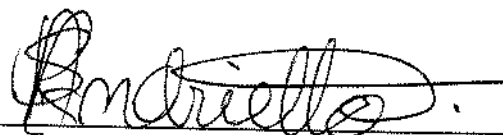
CAMPINAS
DEZEMBRO/1996



BANCA EXAMINADORA

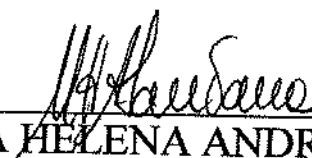


DR. FRANCISCO MAUGERI FILHO
(MEMBRO)



DR. SÍLVIO ROBERTO ANDRIETTA
(MEMBRO)

DRA. LÚCIA REGINA DURRANT
(MEMBRO)



DRA. MARIA HELENA ANDRADE SANTANA
(SUPLENTE)

Campinas , 18/12/96

*A meu pai (in memoriam),
a quem dedico este trabalho.*

*A minha mãe,
pelo amor e carinho.*

*A Marta e Mariana,
pela luz desta vida.*

AGRADECIMENTOS

- Agradeço ao Prof. Francisco Maugeri Filho, pela ajuda nos momentos difíceis e pelas valiosas discussões, sem as quais este trabalho não seria possível.
- A Usina São Francisco (Capivari) pela doação do melaço utilizado e a Labogen (Indaiatuba) pelo apoio técnico.
- Aos colegas do DEA pela amizade e companhia...
- A Fátima pela constante e incansável ajuda...
- A todos que de alguma forma colaboraram com a elaboração deste trabalho.
- A CAPES pelo suporte financeiro, na forma de bolsa de estudo.
- A FAPESP pelo financiamento do projeto.

ÍNDICE

Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
Relação de Figuras.....	ix
Relação de Tabelas.....	xi
Nomenclatura.....	xii
1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 - Bioquímica da fermentação alcoólica.....	4
2.2 - Processos fermentativos para produção de etanol.....	5
2.2.1 - Processos clássicos.....	5
2.2.1 - Processo batelada alimentada ou Melle-Boinot.....	6
2.2.3 - Processo contínuo.....	6
2.3 - Cinética da fermentação alcoólica.....	9
2.3.1 - Modelos cinéticos.....	9
2.3.2 - Modelos cinéticos para alta densidade celular.....	13
2.3.3 - Viabilidade celular.....	16
2.3.4 - Efeito da temperatura nos parâmetros cinéticos.....	19
2.4 - Experimentos com alta densidade celular.....	22
2.5 - Eficiência da membrana.....	28
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1 - Materiais.....	30
3.1.1 - Microorganismo.....	30
3.1.2 - Meio de cultura.....	30
3.1.3 - Microfiltro tangencial.....	31

3.1.4 - Fermentador.....	34
3.1.5 - Sistema microfiltro / fermentador.....	35
3.1.6 - Calibrações do sistema microfiltro / fermentador.....	42
3.2 - Procedimentos Experimentais.....	43
3.2.1 - Preparo do inóculo.....	43
3.2.2 - Fermentação descontínua.....	43
3.2.3 - Preparação do conjunto microfiltro / fermentador.....	44
3.2.4 - Modelagem matemática para fermentação contínua com alta densidade celular.....	45
3.2.5 - Fermentação contínua.....	48
3.3 - Métodos analíticos.....	49
3.3.1 - Concentração de açúcares redutores totais.....	49
3.3.2 - Concentração de células.....	49
3.3.3 - Concentração de etanol.....	50
3.3.4 - Viabilidade.....	50
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1 - Constantes cinéticas de morte celular.....	51
4.2 - Fermentação contínua com reciclo de células.....	66
4.2.1 - Desempenho do conjunto microfiltro / fermentador.....	66
4.2.2 - Regime estacionário em fermentação contínua com reciclo de células.....	69
4.2.3 - Análise dos parâmetros obtidos a 28 ^o C.....	72
5 - CONCLUSÕES.....	75
6 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	77
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram os de estudar a influência da temperatura e da concentração de etanol nos parâmetros cinéticos que quantificam a reprodução e morte celular, o consumo de substrato e a produção de etanol para *Saccharomyces cerevisiae* e avaliar o comportamento de um fermentador piloto com reciclo de células, utilizando-se meio de cultura industrial. A constante busca por produtividade nas destilarias tem instigado pesquisadores a desenvolver novas técnicas para fermentação alcoólica. Uma das mais promissoras é a operação contínua com altas concentrações celulares no meio de cultura, obtida com o reciclo de células por microfiltração tangencial. Entretanto, constantes oscilações de temperatura nos fermentadores industriais, causadas por fortes variações climáticas, podem alterar o comportamento previsto destes processos. Assim, uma melhor avaliação desta influência pode ser útil em estudos futuros de otimização e controle.

Para o estudo da influência da temperatura e da concentração de etanol na taxa de morte celular foram realizados ensaios em batelada dentro das faixas pré-determinadas de 28 a 37 °C e 65 a 110 g etanol/l. Os resultados obtidos indicam uma tendência ao aumento da constante de morte celular $K_d(T,P)$ conforme aumentam a temperatura e a concentração de etanol. O modelo matemático obtido para o decaimento do número de células viáveis em função do tempo, temperatura e concentração de etanol é :

$$\frac{N_v}{N_0} = \exp \left\{ \left[-9,00227 \cdot 10^{23} \cdot \exp \left(\frac{-39666}{R \cdot T} \right) \cdot \exp (0,07425 \cdot P) \right] \cdot t \right\}$$

O conjunto montado para a realização dos experimentos com reciclo de células, consistindo de um elemento filtrante inorgânico e do fermentador, operou por 1500 horas consecutivas, no experimento mais prolongado, demonstrando a sua eficiência. No intervalo de tempo de maior estabilidade, entre 650 e 1350 horas de operação, obteve-se os valores de 0,369 para o coeficiente de rendimento para produção de etanol por substrato consumido ($Y_{P/S}$), 0,00582 h⁻¹ para a taxa específica de crescimento (μ) e 2,97 g/l.h para a produtividade.

ABSTRACT

The aims of this work were to study the temperature and ethanol concentration effect on the kinetics parameters of the cell growth and death, as well as the glucose consumption and the ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. Also the behavior of a pilot bioreactor with cell recycle, using industrial feed was evaluate. The constant searching for productivity in the distilleries has been leading the researches to develop new techniques to the alcoholic fermentation. One of the most promissor is the continuous operation with high cell concentration in the culture medium, obtained by cell recycle through tangencial microfiltration. Therefore, many temperature oscilations in the industrial bioreactors, caused by strong climate variations, can alter the foreseen behavior of these processes. Thus, a better evaluation af these effect can be useful in future optimization an control studies.

The studies on the influency of temperature and ethanol concentration in the cell death rate were performed at temperatures from 28 to 37°C and 65 to 110 g ethanol/l. The results obtained showed that the death constant $K_d(T,P)$ increase as the temperature end ethanol concentration raise. The mathematic model obtained for the cell viability as function of temperature, ethanol concentration and time is :

$$\frac{N_v}{N_0} = \exp \left\{ \left[-9,00227 \cdot 10^{23} \cdot \exp \left(\frac{-39666}{R \cdot T} \right) \cdot \exp (0,07425 \cdot P) \right] \cdot t \right\}$$

The equipment for the experiments with cell recycle, consisted of one external inorganic membrane and the fermentator, it functioned for 1500 hours in the longest experiment. During a period of time, between 650 and 1350 operation hours, when the equipment showed good stability, was possible to obtain values of 0,369 for ethanol yield ($Y_{P/S}$), 0,00582 h⁻¹ for specific growth rate (μ) and 2,97 g/l.h to the productivity.

RELAÇÃO DE FIGURAS

1. Figura 2.1 : Fluxograma processo contínuo.
2. Figura 2.2 : Perfil de temperatura para tolerância ao etanol em cultura de *S. cerevisiae*. (SÁ-CORREIA e VAN UDEN, 1983)
3. Figura 2.3 : Diagrama esquemático de um fermentador com reciclo de células.
4. Figura 2.4 : Comportamentos previstos para reator com reciclo e purga de células.
5. Figura 3.1 : Esquema de equipamento para microfiltração tangencial.
6. Figura 3.2 : Filtração por fluxo tangencial.
7. Figura 3.3 : Esquema de equipamento para reciclo de células em fermentação contínua.
8. Figura 3.4 : Visão frontal do conjunto fermentador/microfiltro.
9. Figura 3.5 : Visão lateral do conjunto fermentador/microfiltro.
10. Figura 3.6 : Detalhe do fermentador.
11. Figura 3.7 : Detalhe do microfiltro.
12. Figura 3.8 : Curva de calibração da bomba de circulação.
13. Figura 3.9 : Fermentador CSTR com reciclo de células.
14. Figura 3.10 : Curva de secagem de leveduras no microondas.
15. Figura 4.1 : Número de células viáveis a 28°C.
16. Figura 4.2 : Viabilidade a 28°C.
17. Figura 4.3 : Número de células viáveis a 31°C.
18. Figura 4.4 : Viabilidade a 31°C.
19. Figura 4.5 : Número de células viáveis a 34°C.
20. Figura 4.6 : Viabilidade a 34°C.
21. Figura 4.7 : Número de células viáveis a 37°C.
22. Figura 4.8 : Viabilidade a 37°C.
23. Figura 4.9 : LN (N_v/N_0) a 28°C.
24. Figura 4.10 : LN (N_v/N_0) a 31°C.
25. Figura 4.11 : LN (N_v/N_0) a 34°C.
26. Figura 4.12 : LN (N_v/N_0) a 37°C.
27. Figura 4.13 : Determinação da energia de ativação E_1 e dos coeficientes lineares α .
28. Figura 4.14 : Determinação dos parâmetros A_1 e K_{dp} .
29. Figura 4.15 : Comparação entre os dados de viabilidade e os obtidos experimentalmente a 28°C.

30. Figura 4.16 : Comparação entre os dados de viabilidade e os obtidos experimentalmente a 31^oC.
31. Figura 4.17 : Comparação entre os dados de viabilidade e os obtidos experimentalmente a 34^oC.
32. Figura 4.18 : Comparação entre os dados de viabilidade e os obtidos experimentalmente a 37^oC.
33. Figura 4.19 : Evolução das variáveis operacionais durante a fermentação contínua com reciclo de células a 28^oC.
34. Figura 4.20 : Evolução das variáveis de estado durante a fermentação contínua com reciclo de células a 28^oC.

RELAÇÃO DE TABELAS

1. Tabela 1.1 : Produção brasileira de etanol (fonte : FUNDAÇÃO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA)
2. Tabela 2.1 : Constantes cinéticas para fermentação alcoólica com alta densidade celular.
3. Tabela 2.2 : Vantagens e desvantagens de técnicas de cultura com alta densidade celular (CHANG, YOO e KIM, 1994).
4. Tabela 2.3 : Resultados experimentais com reciclo de células
5. Tabela 2.4 : Estados estacionários obtidos por LEE e CHANG (1987) a 30°C.
6. Tabela 3.1 : Meio de cultura para ativação
7. Tabela 3.2 : Meio de Cultura para manutenção
8. Tabela 4.1 : Morte celular na presença de etanol a 28 °C.
9. Tabela 4.2 : Morte celular na presença de etanol a 31 °C.
10. Tabela 4.3 : Morte celular na presença de etanol a 34 °C.
11. Tabela 4.4 : Morte celular na presença de etanol a 37 °C.
12. Tabela 4.5 : Constante de morte K_d (h^{-1}) em função da temperatura e conc. de etanol.
13. Tabela 4.6 : Coeficientes angulares ($E1/R$), lineares (α) e de regressão.
14. Tabela 4.7 : Variáveis operacionais obtidas a 28°C.
15. Tabela 4.8 : Variáveis de estado obtidas a 28°C.
16. Tabela 4.9 : Parâmetros calculados a 28°C.

NOMENCLATURA

a	parâmetro na equação 21
A_1	fator de frequência da equação de Arrhenius
b	parâmetro na equação 21
B	razão de purga
c,d	parâmetros na equação 10
D	taxa de diluição
E_1	energia de ativação de Arrhenius
F	vazão, de alimentação
$F_X(P,T)$	função de inibição pelo produto para cresc. celular
$F_P(P,T)$	função de inibição pelo produto para prod. etanol
$G_X(P,T)$	função de inibição pelo substrato para cresc. celular
$G_P(P,T)$	função de inibição pelo substrato para prod. etanol
h	constante de Plank
I_X	termo de contribuição da inibição pela concentração celular
k_B	constante de Boltzmann
K_1	constante na equação 4
K_2	constante nas equações 4 e 5
K_d	constante na equação 2
K_S	constante de Monod
K_a, K_b, K_c	constantes
K_d	constante de morte
K_{dp}	constante na equação da taxa de morte por etanol
m_s	coeficiente de manutenção
m e n	potências
N_v	número de células vivas
N_0	número de células totais no instante $t=0$
P	concentração de etanol
P_0	concentração de etanol na alimentação
P_m	máxima conc. de etanol acima da qual não há crescimento celular
Prod.	produtividade de etanol
r_d	taxa de morte celular
r_p	taxa de produção de etanol

r_s	taxa de consumo de substrato
r_x	taxa de produção de células
R	constante dos gases
S	concentração de substrato
S_0	concentração de substrato na alimentação
t	tempo
T	temperatura
v	viabilidade
V	volume
X	concentração celular
X_d	concentração células mortas
X_{d0}	concentração células mortas na alimentação
X_m	concentração celular máxima
X_T	concentração total de células
X_v	concentração células viáveis
X_{v0}	concentração células viáveis na alimentação
$Y_{X/S}$	rendimento celular por substrato consumido
$Y_{P/S}$	rendimento etanol por substrato consumido
$Y_{X/P}$	rendimento celular por etanol produzido

LETRAS GREGAS

α	constante para crescimento associado
ΔH^*	entalpia de ativação de morte celular
ΔS^*	entropia de ativação de morte celular
τ_c	tempo de retenção celular
μ	taxa específica de crescimento
μ_i	taxa esp. de crescimento na presença de etanol
$\mu_{m\acute{a}x}$	taxa esp. máxima de crescimento à conc zero de etanol
v	taxa esp. de produção de etanol

1 - INTRODUÇÃO :

Apesar de já existirem projetos de adaptação de motores para funcionamento à álcool datados de 1923 e a adição deste à gasolina ter se tornado obrigatória em 1931 (CLETO, 1995), foi somente com a crise do petróleo no início da década de 70 que se incentivou a setor açucareiro a produzir etanol via fermentativa para utilização em veículos automotores.

A elevação do preço do petróleo de US\$ 2,5 / barril em 1973, US\$ 10,5/barril em 1974 e para US\$ 34,4 / barril em 1981 (BERTELLI, 1992), aliado a uma estrutura existente adequada (capacidade ociosa na indústria açucareira; disponibilidade de mão-de-obra de baixa qualificação; terras aptas; clima adequado; setor açucareiro desenvolvido; experiência brasileira na produção de etanol para fins industriais), favoreceram a criação em novembro de 1975 do Programa Nacional do Alcool. Este incrementou a produção alcooleira em uma primeira fase, de cerca de 600 milhões de litros/ano em 1975/76 para 3,4 bilhões de litros/ano na safra de 1979/80.

A segundo fase registrou um pico de 11,8 bilhões de litros/ano em 1985/86, demonstrando crescimento ainda mais acentuado, tornando o Brasil o maior produtor mundial de etanol via fermentativa (MAGALHÃES et alii, 1991). Os anos seguintes, correspondentes a terceira fase, foram de semi-estagnação.

Tabela 1.1 : Produção brasileira de etanol (fonte : FUNDAÇÃO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA)

safra	produção de etanol (bilhões de litros / ano)
1970 / 71	0,64
1979 / 80	3,4
1983 / 84	7,9
1984 / 85	9,2
1985 / 86	11,8
1987 / 88	11,5
1989 / 90	11,9
1991 / 92	12,7
1993 / 94	12,3
1995 / 96	12,6

A estabilização do preço internacional do petróleo à níveis abaixo do que se previa no auge da crise, reduziu drasticamente o investimento de capital no setor alcooleiro. Se no início do Proálcool a corrida era intensa atrás de capacidade produtiva, atualmente a busca da produtividade, com a redução dos custos de produção, tornou-se a meta principal. A própria sobrevivência do programa depende da aproximação da relação custo/benefício do álcool ao da gasolina.

Se a evolução dos preços da gasolina estão sujeitos a fatores externos e empíricos, o aumento da competitividade do álcool deve se dar via ganhos de produtividade na indústria alcooleira. Este aumento de rendimento é notado com a evolução do setor, porém outras técnicas modernas podem vir a somar esforços para se otimizar a produção nacional.

A evolução do processo de fermentação alcoólica no Brasil foi marcada pela substituição, na década de 60, do processo clássico de batelada, com a utilização dos pés de cuba, pelo processo Melle-Boinot (batelada alimentada com reciclo de células), segundo DREWS (1964). O sucesso deste processo generalizou rapidamente sua utilização pelas destilarias nacionais.

A fermentação alcoólica contínua leva a uma redução do custo de produção e, conforme FINGUERUT et alii (1992), é a seqüência natural de aprimoramento do processo Melle-Boinot. Entretanto, as adaptações empíricas feitas nas dornas construídas para batelada alimentada causaram problemas de ordem técnica e operacional.

O pleno aproveitamento da fermentação alcoólica contínua envolve a etapa intermediária de estudo do comportamento cinético do processo e a aplicação destes conhecimentos na elaboração de uma estratégia de controle eficiente nas usinas. A operação com altas densidades celulares no meio de cultura tem se tornado uma técnica promissora no ganho de produtividade e redução dos custos de produção. Motivados por bons resultados, diversos pesquisadores tem se dedicado a estes desenvolvimentos, com diferentes enfoques sobre o assunto.

Entretanto, a maioria dos estudos tem como base um processo isotérmico, o que em condições reais de operação nem sempre é observado. O estudo do efeito da temperatura nos parâmetros cinéticos que quantificam a reprodução e morte celular, o consumo de substrato e a produção de etanol foi o principal objetivo deste trabalho, visto a enorme dificuldade encontrada em

se manter constante a temperatura nas dornas de fermentação alcoólica com as condições adversas do clima brasileiro. Como consequência, em uma unidade industrial para produção de etanol considerável proporção de biomassa é não viável, e a desconsideração deste fato no projeto e operação destas plantas pode ocasionar alterações no comportamento previsto das mesmas.

Assim, foi necessário trabalhar com reciclo de células para se atingir altas concentrações celulares e de produto no reator, o que foi conseguido com o acoplamento ao fermentador de um sistema de microfiltração tangencial. Foi proposto um modelo matemático que simulou o comportamento do reator em função dos parâmetros cinéticos e da temperatura. Paralelamente foi realizado um estudo, em shaker rotativo, para determinação da constante de morte celular em função da temperatura e da concentração de etanol.

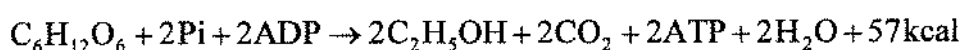
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA :

2.1 - BIOQUÍMICA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA :

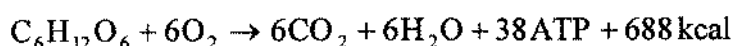
As leveduras são organismos eucarióticos e formam uma das subclasses mais importantes dos fungos. As células de *Saccharomyces cerevisiae* apresentam-se normalmente na forma unicelular e com 2 a 8 micrômetros de diâmetro. Estas se reproduzem basicamente por gemação (brotamento), onde a célula-mãe, após um período de união entre os citoplasmas, dá origem a uma nova célula.

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

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



- Equação de Gay-Lussac



- Ciclo de Krebs

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

Além da presença (ou ausência) de oxigênio, a disponibilidade de açúcar pode afetar o metabolismo das leveduras. OKADA (1981) cita o efeito Crabtree, que é o incremento na produção de etanol em concentrações de glicose superiores a 0,5-1,0 g/l (independentemente da concentração de oxigênio) como prejudicial ao processo de produção de leveduras de panificação, pois parte do açúcar disponível é convertida a etanol e dióxido de carbono em detrimento à biomassa, reduzindo o rendimento. Em contrapartida, o efeito Pasteur, citado por UCHOA (1992), prediz um elevado rendimento celular em condições de aerobiose e concentração de glicose inferiores a 1,5 g/l.

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

2.2 - PROCESSOS FERMENTATIVOS PARA PRODUÇÃO DE ETANOL :

2.2.1 - Processos clássicos:

Os processos de fermentação alcoólica convencionais, utilizando-se inoculação nova a cada batelada ou o sistema de cortes, foram amplamente utilizado pelas destilarias nacionais até o início dos anos 60 (DREWS, 1964). Nestes processos, um certo volume de mosto contendo 100-200 g/l de açúcar é inoculado por parte de uma dorna em estágio final de fermentação (corte) ou por uma cultura nova, recém ativada em laboratório. A fermentação é considerada concluída quando a cuba “morre”, ou seja, quando cessa a atividade biológica por falta de nutrientes ou por excesso de produto inibidor (etanol). Neste ponto o etanol é recuperado por destilação e o reator sanitizado para nova batelada.

A batelada convencional tem com principal desvantagem a baixa produtividade (10,0-14,0 g etanol/l.h), teor alcoólico no mosto fermentado na ordem de 8,0-10,0 °GL, tempo de processamento elevado e dificuldade operacional nas dornas (tempos de preparação prolongados, sanificação periódica e manuseio de inóculo constante).

2.2.2 - Processo batelada alimentada ou Melle-Boinot :

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

Entretanto, apesar dos ganhos obtidos em rendimento, operacionalidade da planta e tempos de processamento, estudos realizados com fermentação contínua demonstraram um grande potencial para a automação de processos e redução de custos de produção.

2.2.3 - Processo contínuo :

Com o esgotamento tecnológico do processo Melle-Boinot, a fermentação alcoólica contínua se firmou como uma alternativa industrialmente viável. A figura 2.1 mostra um fluxograma geral da fermentação alcoólica em escala industrial.

A alimentação do sistema pode ser feita por melaço diluído, por caldo de cana ou por uma mistura destes. Em todos os casos é realizado um pré-tratamento com a finalidade de se eliminar impurezas grosseiras, partículas coloidais e minimizar contaminantes microbianos. A esta corrente se adiciona a corrente vinda da cuba de tratamento ácido, contendo creme de leveduras. O tratamento ácido é feito em uma, ou mais cubas, pela adição de ácido sulfúrico e água até pH 2,0-2,5 e com 1-2 horas de tempo de residência.

A razão entre a vazão de fermento tratado e a vazão total de alimentação dos fermentadores é chamada de taxa de reciclo. Neste ponto, a corrente resultante inicia o processo de fermentação alcoólica na primeira dorna, com consumo de substrato e produção de etanol e mais massa celular.

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

Após a passagem pela n-ésima dorna, o mosto fermentado segue até o conjunto de separadoras centrífugas de pratos e/ou bicos ejetores. A fase pesada, ou creme de leveduras, é enviada à cuba de tratamento ácido e a fase leve, ou vinho de levedurado, é enviada para a dorna volante, ou tanque pulmão, e então enviada para o conjunto de colunas de destilação. A perda de célula no vinho centrifugado situa-se na faixa de no máximo 1 %.

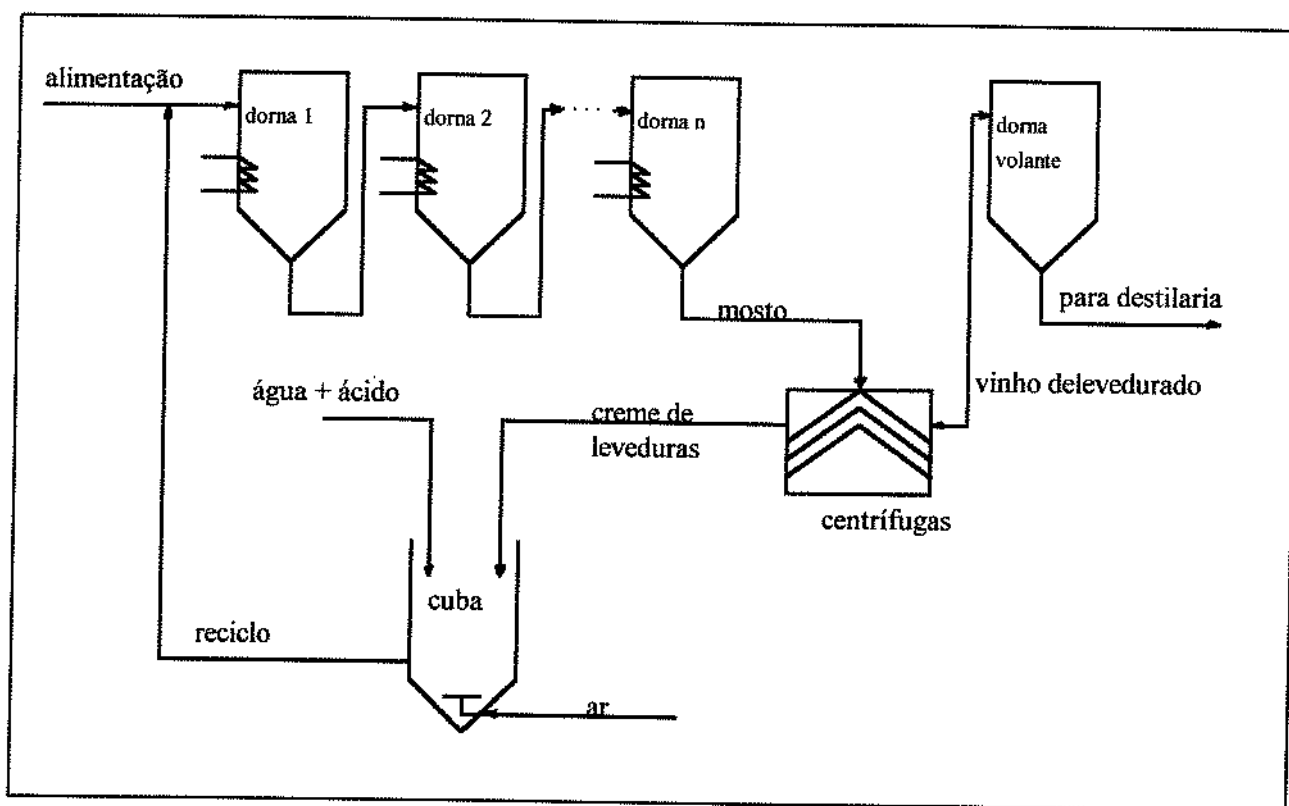


Figura 2.1 : Fluxograma processo contínuo.

GUERREIRO (1995) cita que o avanço tecnológico gerado pela adoção de técnicas modernas (cinética microbiana adequada, otimização, simulação de processos via computador e projetos específicos) aliados à fermentação contínua, pode trazer os seguintes benefícios:

- modernização da usina;
- aumento da produção;
- redução dos gastos de mão-de-obra;
- redução de gastos em análises;
- aumento de produtividade;
- redução de tempos não produtivos (carga, descarga, limpeza);
- trabalho em estado estacionário;
- redução de insumos;
- uniformidade do produto;
- maior controle operacional do processo.

CYSEWSKI e WILKE (1978) e MAIORELLA et alii (1984) realizaram estudos comparativos e avaliações econômicas dos diversos processos existentes para a produção de etanol via fermentativa. Ambos os trabalhos citam que os gastos com matérias primas (principalmente melação) representam cerca de 70 % do custo total de produção do etanol, mas melhorias são observados em relação ao processo tradicional de batelada. MAIORELLA et alii (1984) simulando uma destilaria para produção de 10^9 l/ano de etanol 95 % peso, concluíram que o custo total de produção na fermentação contínua com reciclo de células ($X = 100$ g/l e Prod. = 42,5 g/l.h) é de \$0,49/l, enquanto que para a fermentação contínua ($X = 20$ g/l e Prod. = 14,1 g/l.h) está em \$0,51/l, um pouco inferior quando comparados à fermentação batelada tradicional ($X_{inicial} = 2,1$ g/g, $X_{final} = 21,3$ g/l e Prod. = 11,8 g/l.h) que é de \$0,53/l. Porém, ganhos significantes no investimento de capital fixo são demonstrados por CYSEWSKI e WILKE (1978). Estes demonstraram uma redução de 57 % no capital investido em destilarias contínuas quando comparadas ao processo de batelada tradicional. Reduções maiores, na ordem de 68 e 71 %, são conseguidos respectivamente para os processos via fermentação contínua com reciclo de células e de operação à vácuo.

2.3 - CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA :

O objetivo básico do estudo da cinética de processos microbianos é o de quantificar as taxas de crescimento celular, de consumo de substrato, formação de produtos e demais parâmetros relacionados, além da influência de outros fatores (pH, temperatura, inibidores, etc.) nestas taxas. No caso da fermentação alcoólica, estes valores são essenciais para o projeto adequado de uma unidade industrial de produção de etanol e para melhor entender o comportamento desta.

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

2.3.1 - Modelos cinéticos :

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

$$\mu = \mu_{\text{má}} \times \frac{S}{K_s + S} \quad (1)$$

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

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

alterações no comportamento do meio. Entretanto, a equação de Monod somente é aplicável quando não há presença de inibidores de crescimento no meio de cultura, ou quando estes estão em quantidades que não afetem a taxa de crescimento celular.

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

$$\mu = \mu_{\text{máx}} \times \frac{S}{\left(K_s + S + \frac{S^2}{K_4} \right)} \quad (2)$$

enquanto que THATHIPAMALA (1992) utiliza :

$$\mu = \mu_{\text{máx}} \times \left(\frac{S_{\text{máx}} - S}{S_{\text{máx}} - S_{\text{min}}} \right) \quad (3)$$

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

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

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

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

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

Para a presença de um produto inibidor P, HOLZBERG et alii (1967) e GHOSE e TYAGI (1979) utilizaram uma relação linear para descrever a dependência de μ_i , velocidade específica máxima de crescimento na presença de etanol, com a concentração deste produto :

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

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

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

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

$$\mu_i = \mu_{má} \times \left[\frac{1}{1 + \frac{P}{K_c}} \right] \quad (8)$$

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

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

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

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

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

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

$$r_X = \mu X = \mu_{má} \times \left[1 - \frac{P}{P_m} \right]^n \left[\frac{S}{K_S + S} \right] X \quad (11)$$

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

$$r_X = \mu X = \mu_{má} \times \left[\frac{S}{K_S + S} \right] X \quad (12)$$

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

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

caracterizando uma cinética puramente inibitória.

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

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

A relação linear do tipo (6) somente é aplicável quando não há limitação de crescimento pelo substrato ou algum nutriente. As equações (7) e (8) predizem o crescimento celular e produção

de etanol indefinidamente. Este fato não é observado na prática, conforme experimentos de LEE, POLLARD e COULMANN (1983), LEE e CHANG (1987) e JARZEBSKI, MALINOWSKI e GOMA (1989), que demonstraram haver um limite acima do qual cessa o crescimento celular e a produção de etanol.

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

2.3.2 - Modelos cinéticos para alta densidade celular :

A utilização de altas taxas de diluição na fermentação alcoólica tradicional diminui a produtividade do sistema, aumenta o tamanho e custo de equipamentos como bombas, tanques, trocadores de calor e colunas de destilação (CYSEWSKY e WILKE, 1977). A redução do custo de produção pode ser conseguida com o aumento da concentração celular no meio de cultura, aumento da concentração de alimentação de açúcar e conseqüente incremento da taxa de fermentação por unidade de volume do fermentador.

Vários autores (LEE, POLLARD e COULMANN, 1983; LAFFORGUE et alii, 1987; LEE e CHANG, 1987; MONBOUQUETTE, 1987 e 1992; JARZEBSKI, MALINOWSKI e GOMA, 1989; MELZUCH et alii, 1991 e CHANG, LEE e KIM, 1993) trabalharam ou vem trabalhando na busca de um modelo cinético que melhor expresse o crescimento celular em altas densidades no meio fermentativo. Entretanto, nestas condições, a reprodução e o metabolismo são menos favoráveis devido a dificuldade de acesso aos nutrientes, a limitação no espaço e as interações entre as células (JARZEBSKI, MALINOWSKI e GOMA, 1989) . Estes fatos, aliados ao elevado tempo de retenção das células, fez com que um modelo cinético apropriado fosse desenvolvido.

CYSEWSKY e WILKE (1977) foram os pioneiros no estudo de fermentação com reciclo de células e conseguiram aumentar a produtividade à pressão atmosférica em cerca de 4 vezes. Estes utilizaram um tanque de sedimentação para realizar o reciclo, alcançando 50 g célula base seca/l no fermentador . Notaram a baixa eficiência do tanque de sedimentação, que para taxas de diluição

acima de $0,75 \text{ h}^{-1}$ provocava arraste de células. Estes mostraram em trabalho seguinte (CYSEWSKY e WILKE, 1978) que para altas concentrações celulares no fermentador, a relação linear entre a taxa específica de crescimento e a concentração celular estava incorreta. A partir deste estudo, um termo de inibição celular, análogo ao termo de inibição pelo produto, foi introduzido:

$$I_x = \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)^m \quad (15)$$

onde I_x é o termo de contribuição da inibição pela concentração celular, X_m é a concentração máxima na qual cessa o reprodução celular e 'm' a potência que indica o grau de inibição da taxa específica de crescimento.

Substituindo-se o termo para inibição pelo produto (equação 9), proposto por BAZUA e WILKE (1977), e o termo para inibição celular proposto por CYSEWSKY e WILKE (1977), na equação de Monod, obtêm-se:

$$\mu = \mu_{má} \times \left(1 - \frac{P}{P_m}\right)^m \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)^n \frac{S}{S + K_s} \quad (16)$$

A equação acima foi utilizada por LEE, POLLARD e COULMANN (1983), que realizaram estudo de simulação em computador. Trabalharam com diferentes sistemas (CSTR simples, duplo ou estágios múltiplos, com ou sem reciclo) e concluíram que a produtividade é maior em sistemas de estágios múltiplos. Demonstraram também que a produtividade de um CSTR com reciclo de células aumenta conforme a razão B/F diminui (vazão de purga do sistema dividido pela vazão de alimentação, B/F=0 indica reciclo total de células e B/F=1 indica sistema sem reciclo) ,até a concentração celular no fermentador chegar ao valor limite máximo de X_m . Valores de B/F menores que este causariam queda brusca na produtividade.

Um modelo cinético intrínseco foi proposto por MONBOUQUETTE (1987). Este supôs que estimativas realizadas para culturas com baixa concentração celular, onde a fase biótica (celular) e a fase abiótica (meio fermentativo) podem ser consideradas um único soluto monocomponente,

acumulam um erro se extrapoladas para altas concentrações celulares. Sugeri a utilização de um modelo intrínseco quando a concentração adimensional “ C ”, definido como o volume ocupado pela biomassa no fermentador, for maior que 0,1.

Em trabalho seguinte, MONBOUQUETTE (1992) reforça sua tese sobre a importância em manter uma distinção entre as fases biótica e substrato, e que a não observação deste fato pode causar sérios erros, não somente na modelagem à altas concentrações celulares, mas também na amostragem, análise e avaliações de concentrações de substrato. Acrescentou ao seu modelo uma diferenciação entre a concentração de etanol intracelular e a concentração de etanol no meio de cultura, o que poderia levar a um erro na determinação da concentração total de etanol, visto a sua não contribuição para o peso total da célula em base seca. Este fato, aliado a exposição das células a uma fonte interna de etanol, sugere que as avaliações realizadas para cinética de crescimento à altas concentrações celulares podem não ser precisas quanto a tolerância ao etanol (GAO e FLEET, 1988).

JARZEBSKI, MALINOWSKI e GOMA (1989) tiveram como enfoque principal de seu trabalho a diminuição da viabilidade celular a altas taxas de concentrações de células e a altas concentrações de etanol, segundo teoria desenvolvida por NAGODAWITHANA e STEINKRAUS (1976). Utilizaram um modelo cinético dito convencional de LEE, POLLARD e COULMANN (1983) e um modelo proposto modificado:

$$r_x = \mu X = \mu_{má} \times \left[1 - \left(\frac{P}{P_m} \right)^n \right] \left[1 - \left(\frac{X_t}{X_m} \right)^m \right] \left[\frac{S}{K_s + S} \right] X_v \quad (17)$$

e

$$X_t = X_v + X_d \quad (18)$$

onde X_t indica a concentração total de células, X_v a concentração de células viáveis e X_d a concentração de células mortas.

A velocidade de morte celular foi expressa por:

$$r_d = (K_1\mu + K_2)X_v \quad (19)$$

A velocidade de consumo de substrato por:

$$r_s = \frac{r_x}{Y_{x/s}} - m_s X_v \quad (20)$$

e a velocidade de produção de álcool por:

$$r_p = (aX_v)^{-bX_v} \quad (21)$$

Os resultados das simulações foram comparados com os dados experimentais de LAFFORGUE et alii (1987), utilizando o conjunto de dados apresentados na tabela 2.1. Verificaram uma grande concordância entre estes, o que demonstra o bom ajuste dos parâmetros e a eficiência do modelo cinético proposto. Para o caso analisado em computador, as simulações atingiram uma produtividade máxima de etanol com $B/F = 0,03$. Os autores concluíram que a utilização da equação convencional de Monod, acrescida dos termos para inibição celular e pelo etanol, modela adequadamente o crescimento à altas concentrações celulares e que as abordagens intrínsecas e não-intrínsecas resultam em predições similares para fermentações alcoólicas. A tabela 2.1 mostra outros valores para algumas constantes cinéticas obtidos por vários autores.

2.3.3 - Viabilidade celular :

Os fatores que influenciam a viabilidade celular são, de uma forma geral:

- a quantidade de oxigênio dissolvido,
- a temperatura da fermentação,
- a quantidade de inóculo,
- a concentração celular, de substrato e de etanol,
- a velocidade de produção de etanol e
- o tempo de contato entre as células e o etanol.

Tabela 2.1 : Constantes cinéticas para fermentação alcoólica com alta densidade celular.

	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	n	m	K_S (Kg/m ³)	$Y_{x/s}$	m_s (Kg/Kg.h)	P_m (Kg/m ³)	X_m (Kg/m ³)
GHOSE e TYAGI (1979)	0,40	5,0	-	0,48	-	-	87	-
LEE et alii (1983)	0,24	1	1	1,6	0,06	-	90	100
LEE e CHANG (1987)	0,21	-	-	-	0,136	-	90	300
JARZEBSKI et alii (1989)	0,24	0,85	1,1	0,5	0,12	0,27	90	320
ANDRIETTA e STUPIELLO (1990)	0,41	3,0	0,9	1,6	-	-	103	100
MONBOUQUETTE (1992)	0,24	0,85	1,1	0,5	-	-	90	150

A taxa de morte celular foi estudada por NAGODAWITHANA e STEINKRAUS (1976) em fermentação rápida utilizando mel diluído a 25 Brix e leveduras de cervejaria. Concluíram que o etanol produzido intracelularmente de maneira rápida a 30°C não se difundiu satisfatoriamente para fora da célula, como aconteceu a 15°C com uma produção mais lenta, contribuindo fortemente para a alta taxa de mortalidade. Assim, o etanol adicionado ao meio foi menos letal que o etanol produzido via intracelular na fermentação rápida.

O limite de 90,0 g etanol/l parece ser o mais aceito (LEE, POLLARD e COULMANN, 1983; LEE e CHANG, 1987 e JARZEBSKI, MALINOWSKI e GOMA, 1989) para a interrupção do crescimento celular. Particularmente, o experimento de LEE e CHANG (1987) demonstra que o etanol produzido internamente pela célula de levedura é mais tóxico que o etanol adicionado ao meio. O mesmo foi observado por NOVAK, STREHALANO, MORENO e GOMA (1981). Esta teoria é baseada na baixa velocidade de transporte na membrana da célula para o meio de cultura, resultando em altas concentrações intracelulares de etanol. Segundo HUANG e CHEN (1988), um efeito desidratante ou uma inibição específica do etanol sobre algumas enzimas como álcool-desidrogenase e piruvato-descarboxilase causariam a morte celular .

Não apenas o etanol intracelular pode acelerar a taxa de morte. A diminuição da viabilidade celular pode também ser afetada por uma gama de fatores, tais como radiação, calor, pH, contaminação iônica, drogas, falta de micronutrientes, pressão osmótica adversa, altas concentrações celulares, etc. A altas densidades celulares é natural supor que as condições ambientais, normalmente críticas de um caldo de fermentação, se agravem, favorecendo a mortalidade de microrganismos.

SINCLAIR e TOPIWALA (1970) enfatizaram que sob certas condições, uma considerável proporção de massa é não-viável. Assim, processos naturais e industriais, como as plantas de lodo ativado, podem ter uma parte substancial de células mortas, alterando o comportamento previsto das mesmas. Estes propuseram um modelo matemático simples no qual assumiram que a mesma quantidade de massa viável perdida era convertida em células mortas e que a taxa total de produção de células era igual a taxa de reprodução celular menos a taxa de morte e a taxa de metabolismo. O balanço de massa utilizado em termos de células viáveis, células mortas e substrato, para o estado transiente, foi o seguinte:

$$\text{taxa de morte de células viáveis : } \gamma X_v \quad (22)$$

$$\text{taxa de geração de células mortas : } \gamma X_v \quad (23)$$

$$\text{taxa de metabolismo endógeno : } KX_v \quad (24)$$

$$e, \quad \frac{dX_v}{dt} = \mu X_v - KX_v - \gamma X_v - DX_v \quad (25)$$

$$\frac{dX_d}{dt} = \gamma X_v - DX_d \quad (26)$$

$$\frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \frac{\mu X_v}{Y_{X/S}} \quad (27)$$

ou, no estado estacionário, a viabilidade foi deduzida como:

$$\text{viabilidade "v"} = \frac{X_v}{X_v + X_d} = \frac{D}{D + \gamma} \quad (28)$$

Porém, somente mais recentemente, em estudo detalhado desenvolvido por JARZEBSKI, MALINOWSKI e GOMA (1989), o conceito de viabilidade celular foi introduzido em um modelo tipo Monod (equação 17).

2.3.4 - Efeito da temperatura nos parâmetros cinéticos :

O efeito da temperatura no processo tem se mostrado como um importante fator a ser estudado para a otimização e aumento da produtividade em destilarias de álcool. É visível a impossibilidade de se manter constante a temperatura nas dornas de fermentação com as condições adversas do clima brasileiro, agravado pela falta de equipamentos adequados e em número suficiente para suprir os fermentadores com capacidade de refrigeração necessária, principalmente no verão.

As taxas de crescimento celular, produção de etanol, consumo de açúcar e inibição pelo produto e substrato são afetadas pela temperatura de fermentação (BAJPAI e MARGARITIS, 1987; HUANG e CHEN, 1988). Entretanto autores anteriormente citados trabalharam com temperatura constante em 30°C (GHOSE e TYAGI, 1979; LAFFORGUE et alii, 1987; LEE e CHANG, 1987; MELZUCH et alii, 1991) ou 35°C (CYSEWSKY e WILKE, 1977). Portanto, um modelo matemático que expresse a cinética de fermentação alcoólica em função da temperatura é necessário para se determinar as condições ótimas de operação.

É conhecido o efeito negativo que o aumento da temperatura provoca na tolerância das leveduras ao álcool. Uma concentração de 3 % v/v de etanol começa a afetar o crescimento celular de *S. cerevisiae*. SÁ-CORREIA e VAN UDEN (1983) mostraram que existe um patamar máximo de tolerância ao etanol estabelecido na faixa de 13-27°C e 11 % v/v de etanol e que para concentrações de etanol superiores a esta, não há crescimento celular. A figura 2.2 mostra a relação existente entre a temperatura e a concentração de etanol e, sob a área desta curva, a taxa específica de crescimento é função desta duas variáveis. Este estudo foi confirmado posteriormente por GAO e FLEET (1988).

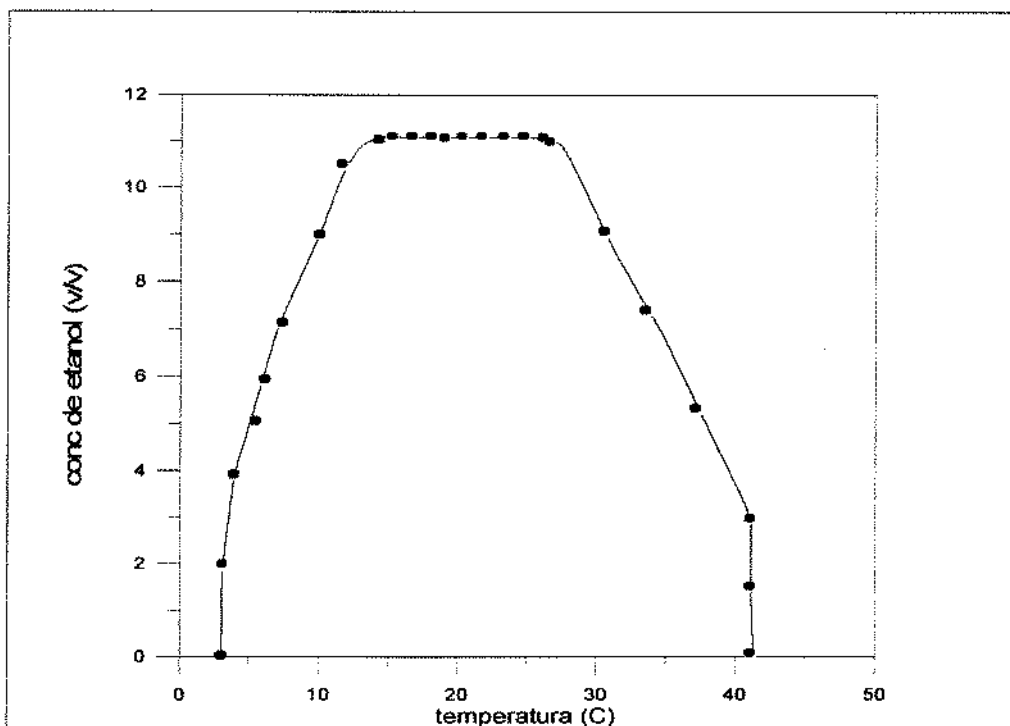


Figura 2.2 : Perfil de temperatura para tolerância ao etanol em cultura de *S. cerevisiae*. (SÁ-CORREIA e VAN UDEN, 1983)

MOHR e KRAVIEC (1980) estudaram o comportamento de 12 espécies bacterianas frente a variações de temperatura, e concluíram que os valores obtidos para as taxas específicas de crescimento seguem a relação de Arrhenius ou variações desta equação. LEÃO e VAN UDEN (1982) testaram uma relação matemática na forma da equação de Arrhenius para a taxa de morte celular K_d em função da temperatura absoluta T :

$$\ln N_v = \ln N_0 - K_d t \quad (29)$$

$$\ln \frac{K_d}{T} = \ln \frac{k_B}{h} + \frac{\Delta S^*}{R} - \frac{\Delta H^*}{R T} \quad (30)$$

onde k_B é a constante de Boltzmann, h a constante de Plank, R a constante dos gases, ΔS^* a entropia de ativação de morte térmica e ΔH^* a entalpia de ativação de morte térmica. Esta relação matemática foi utilizada por DALE, CHEN e OKOS (1990) para modelar o comportamento de um reator de células imobilizadas utilizando *Kluyveromyces fragilis*, na seguinte forma:

$$\frac{N_v}{N_0} = \exp[-K_d(T,P).t] \quad (31)$$

$$K_d(T,P) = K_d(T).K_d(P) \quad (32)$$

$$K_d(T) = A_1 \exp\left(\frac{-E_1}{RT}\right) \quad \text{e} \quad K_d(P) = \exp(K_{\phi} P) \quad (33) \text{ e } (34)$$

Em trabalho seguinte SÁ-CORREIA e VAN UDEN (1986) sugeriram que a influência do etanol no crescimento celular a baixas e médias temperaturas são a soma de dois tipos de taxas, uma potencializada pelo etanol, que tem seu peso relativo aumentado com o aumento da temperatura, e a outra induzida pelo etanol, que tem seu peso relativo aumentado com o decréscimo da temperatura.

Outro modelo matemático para cinética da fermentação alcoólica com *Zymomonas mobilis*, considerando o efeito da temperatura, foi testado por HUANG e CHEN (1988) utilizando a faixa entre 30 e 40°C para o estudo. Sugeriram o conceito de função inibidora para definir a taxa de crescimento celular e a taxa de produção de etanol:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} F_X(P, T).G_X(S, T).X \quad (35)$$

$$\frac{dP}{dt} = Q_{\max} \frac{S}{K_s + S} F_P(P, T).G_P(S, T).X \quad (36)$$

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{P/S}} \frac{dP}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt} + m_s X \quad (37)$$

onde $F_X(P,T)$ e $F_P(P,T)$ são funções expressando a inibição do etanol e da temperatura sobre o crescimento celular e sobre a produção de etanol respectivamente e $G_X(P,T)$ e $G_P(P,T)$ são funções expressando a inibição do substrato sobre o crescimento celular e sobre a produção de etanol. HUANG e CHEN (1988) demonstraram que μ_{\max} aumenta na faixa de 30 a 37 °C e diminui para

temperaturas maiores que 37 °C, que o valor da taxa máxima de produção de etanol aumenta com a temperatura e que os valores de P_m e P'_m diminuem com o incremento da temperatura entre 30 e 40 °C.

2.4 - EXPERIMENTOS COM ALTA DENSIDADE CELULAR :

A obtenção de altas taxas de produtividade em fermentadores para produção de etanol, está diretamente relacionada com os custos de instalação, manutenção e operação da planta. Para tornar o processo de produção de etanol a partir de cana-de-açúcar mais competitivo, técnicas como batelada ou batelada alimentada, com baixa produtividade volumétrica, estão sendo substituídas.

Uma maneira de se otimizar a produtividade de etanol é o aumento da concentração de células viáveis no meio de cultura, aumento da concentração de alimentação de substrato e conseqüente incremento da taxa de produtividade por unidade de volume de reator.

Muitos trabalhos tem sido publicados, com significativo avanço tecnológico, no sentido de manter uma maior massa de células viáveis em reatores contínuos, sem provocar arraste destas células. CHANG, YOO e KIM (1994) compararam os vários sistemas para se obter alta densidade celular no meio de cultura (tabela 2.2).

CYSEWSKI e WILKE (1977) utilizaram um tanque de sedimentação para efetuar o reciclo de células de *Saccharomyces cerevisiae* e obtiveram uma concentração de 50 g/l célula base seca. CHANG, LEE e KIM (1993) estudaram o comportamento de um filtro interno de aço inoxidável poroso (10 µm) em uma fermentação contínua de *S. cerevisiae* tendo glicose com substrato (100 g/l). Operaram por 10 dias consecutivos com uma concentração média de células na ordem de 56 g/l, não avaliando porém a viabilidade no período.

Uma membrana polimérica sintética externa (hollow fiber) foi utilizada por NISHIZAWA et alii (1983), KHORAKIWALA et alii (1985), LEE e CHANG (1987), MELZUCH et alii (1991) e MEHAIA e CHERYAN (1991). Alguns dos resultados obtidos por estes autores em fermentações contínuas são mostrados na tabela 2.3. KHORAKIWALA et alii (1985) compararam o

Tabela 2.2 : Vantagens e desvantagens de técnicas de cultura com alta densidade celular (CHANG, YOO e KIM, 1994).

	Vantagens	Desvantagens
Imobilização	<ul style="list-style-type: none"> • não ocorre lavagem sobre qualquer taxa de diluição. • proteção das células contra tensões de cisalhamento. • alto empacotamento. 	<ul style="list-style-type: none"> • baixa transferência de nutrientes e oxigênio. • instabilidade da matriz de imobilização. • dificuldade de ampliação de escala. • baixa eficiência.
Reciclo de células		
sedimentação/floculação	<ul style="list-style-type: none"> • equipamentos simples. • baixa necessidade energética. • facilidade de ampliação de escala. 	<ul style="list-style-type: none"> • aplicável somente a culturas floculentas. • taxa de diluição limitada pela velocidade de sedimentação. • baixa densidade celular.
centrifugação	<ul style="list-style-type: none"> • aplicação industrial. • aplicável para substrato rico em material particulado. • utilizável em sistemas de grande porte. 	<ul style="list-style-type: none"> • dificuldade de manter condições assépticas. • custo alto. • complexidade operacional.
membrana interna	<ul style="list-style-type: none"> • sem necessidade de circulação de líquido. • operação simples. • alta densidade celular. • homogeneidade no reator. • facilmente esterelizável. 	<ul style="list-style-type: none"> • diminuição no fluxo de filtrado devido a incrustações. • limitação na área por volume de trabalho. • não flexível.
membrana externa	<ul style="list-style-type: none"> • grande área de filtração por volume de trabalho. • facilidade de manutenção durante operação. • alta densidade celular. 	<ul style="list-style-type: none"> • necessidade de bomba na recirculação. • esterelização difícil. • diminuição no fluxo de filtrado devido a incrustações. • danos na célula por excesso de tensão. • não-homogeneidade no reator.

comportamento entre *Z. mobilis* e *S. cerevisiae* em reatores contínuos, utilizando lactose e glicose com meio de cultura. Concluiu que as leveduras apresentam melhor comportamento em longos períodos de operação no fermentador.

Um interessante equipamento foi montado por LEE e CHANG (1987) utilizando membranas poliméricas fibrosas para o reciclo celular. O volume do meio de cultura foi mantido constante, pois tanto a saída do fermentador quanto a de filtrado passam pelo frasco de controle de nível, fixado por um controlador. Assim, o total de líquido que sai do sistema é igual ao total alimentado por uma bomba peristáltica de cabeça dupla. Para manter a viabilidade celular, uma pequena quantidade de ar foi fornecida ao meio. A figura 2.3 mostra um diagrama esquemático do sistema utilizado. Obtiveram uma produtividade 3 vezes superior à obtida por CYSEWSKY e WILKE (1977), operando com uma concentração celular média de 100-150 g célula base seca /l e uma concentração máxima de 210 g célula base seca /l. As equações 38 a 40 definem o modelo matemático para o sistema utilizado, em regime transiente.

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - BD)X \quad (38)$$

$$\frac{dP}{dt} = vX - DP \quad (39)$$

$$\frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \frac{1}{Y_{X/S}} X \quad (40)$$

onde μ e v são as taxas específicas de crescimento e de produção de etanol. Supondo-se regime estacionário, LEE e CHANG (1987) deduziram, a partir das equações 38 a 40, que:

$$\mu = BD \quad , \quad v = \frac{DP}{X} \quad (41) \text{ e } (42)$$

$$Y_{X/S} = \frac{BX}{S_0 - S} \quad (43)$$

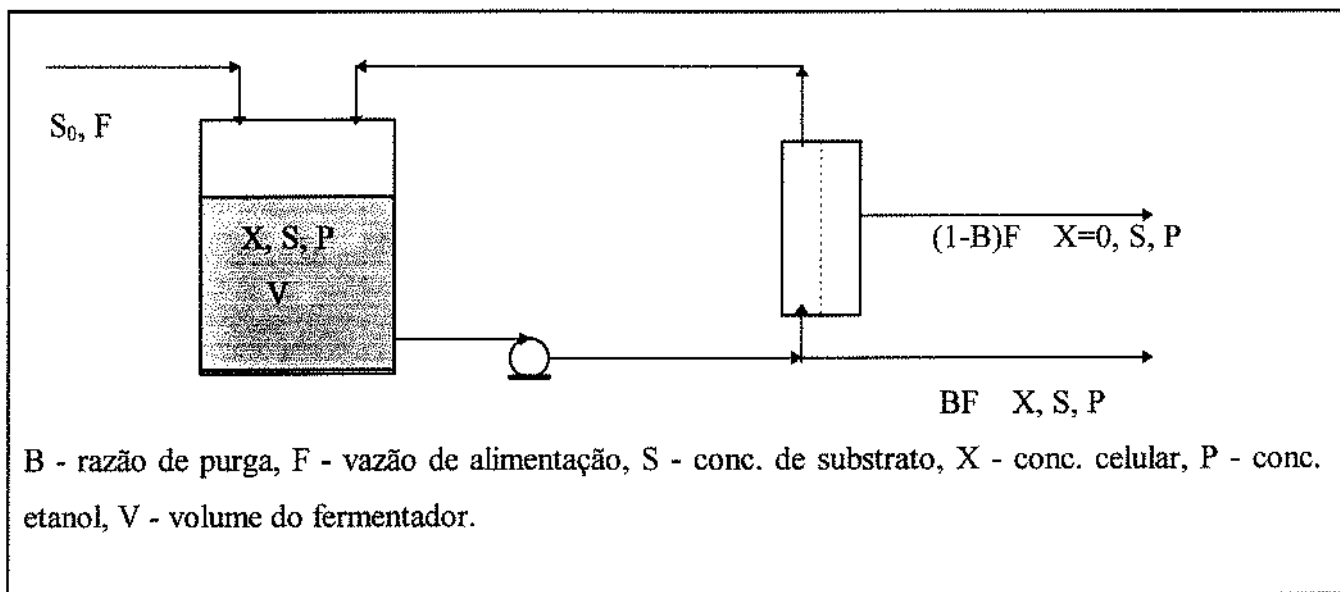


Figura 2.3 : Diagrama esquemático de um fermentador com reciclo de células.

$$Y_{P/S} = \frac{P}{S_0 - S} \quad (44)$$

MEHAIA e CHERYAN (1991) estudaram a conversão de extrato de tâmaras, rico em glicose e frutose, em etanol por *S. cerevisiae* e posterior oxidação do etanol por acetobactérias a ácido acético. Neste trabalho utilizaram fermentadores com reciclo de células via membrana polimérica, tanto na fermentação etanólica como na acética. Obtiveram uma produtividade de 25 g/l.h e 10,8 g/l.h, respectivamente, para uma concentração final de 68 g/l de etanol e 45 g/l de ácido acético ao final de cada etapa.

MATSUMOTO et alii (1988) estudaram o comportamento dinâmico de uma membrana cerâmica microporosa em uma fermentação contínua. LAFFORGUE et alii (1987) utilizaram uma membrana inorgânica na avaliação de fermentação sem purga (reciclo total), utilizando *S. cerevisiae* e um meio artificial de glicose (150 Kg/m³). Fixou a taxa de diluição em 0,5 h⁻¹ e realizou dois experimentos idênticos, com tempo de duração médio de 150 horas, obtendo uma concentração celular na base seca próxima a 300 Kg/m³ e uma produtividade média de 33 Kg/m³.h (vide tabela 2.3).

LAFFORGUE et alii (1987) observaram um decréscimo na taxa específica de crescimento (de $2,0 \text{ h}^{-1}$ para perto de 0 h^{-1}) e na viabilidade celular (de 100% para cerca de 75%) no decorrer dos experimentos e proporcional ao aumento da massa celular. Este supôs que a altas concentrações celulares, modificações no tamanho e morfologia da partícula poderiam agravar a queda da viabilidade. O efeito da tensão de cisalhamento durante o bombeamento na recirculação, também pode aumentar a taxa de morte celular (CHANG, 1994).

Tabela 2.3 : Resultados experimentais com reciclo de células

	área (cm^2)	S_0 (Kg/m^3)	X (Kg/m^3)	Y_p/s	P (Kg/m^3)	D (h^{-1})	Prod. ($\text{Kg/m}^3 \cdot \text{h}$)
CYSEWSKI e WILKE (1977)	-	334	50	-	44,0	0,58	29,0
CHANG, LEE e KIM (1993)	440	100	56	0,47	47,4	0,41	20,0
NISHIZAWA et alii (1983)	1000	150	85	0,43	85,0	0,32	27,0
KHORAKIWALA et alii (1985)	680	100	100	-	-	-	100,0
LEE e CHANG (1987)	600	140	100-150	0,454	65,0	1,31	85,0
LAFFORGUE et alii (1987)	-	150	300	0,47	66,0	0,50	33,0
MELZOCH et alii (1991)	250	100-300	46	-	81,0	0,185	15,0
MEHAIA e CHERYAN (1991)	650	50-300	150	-	47-68	0,36	25-32

CYSEWSKI e WILKE (1977) citam que traços de oxigênio no meio fermentativo são um importante suplemento para a fermentação alcoólica. CHANG, LEE e KIM (1993), LEE e CHANG (1987) e LAFFORGUE et alii (1987) utilizaram ar filtrado e esterilizado, insuflado no reator à $0,1 \text{ VVM}$, para manter a viabilidade celular. MELZOCH et alii (1991) conseguiram resultados satisfatórios em condições anaeróbias, mantendo a viabilidade celular sempre acima de 80%. As destilarias industriais somente utilizam injeção de ar na etapa de tratamento do creme de leveduras, futuro inóculo, operando de forma anaeróbia nos reatores de fermentação alcoólica.

Um possível estado estacionário à altas concentrações celulares é citado por diversos autores (LAFFORGUE et alii ,1987; LEE e CHANG, 1987; MELZOCH et alii, 1991 e CHANG,

LEE e KIM, 1993). Supondo um modelo clássico, onde o crescimento celular é limitado pelo substrato S , e um sistema operando com uma concentração celular inicial X_0 , uma concentração de substrato na alimentação S_0 , uma taxa de diluição constante D e um tempo inicial t_1 (onde se inicia a purga celular), PIRT (1975) definiu três tipos de comportamento para um reator com reciclo de células. Com base na equação 40, pode-se deduzir que:

1- Quando a taxa de purga é maior que a taxa máxima de crescimento celular, ocorrerá uma diluição da biomassa e um aumento na concentração do substrato (situação 'a' na figura 2.4).

2 - Quando a taxa de purga é igual a taxa máxima de crescimento celular, ocorrerá um equilíbrio onde as concentrações de biomassa e substrato permanecerão constantes (situação 'b' na figura 2.4).

3 - Quando a taxa de purga é inicialmente menor que a taxa máxima de crescimento celular, ocorrerá um aumento da concentração de biomassa (situação 'c' na figura 2.4). Neste caso, o aumento da concentração celular causará uma diminuição da taxa específica de crescimento celular (LAFFORGUE et alii ,1987) até que ocorra a igualdade entre as taxas de purga e de crescimento. Este estado estacionário formado é auto-regulável. Uma queda na concentração celular provoca um aumento da concentração de substrato e da taxa crescimento, restaurando o estado inicial. Um aumento da concentração celular teria o efeito inverso.

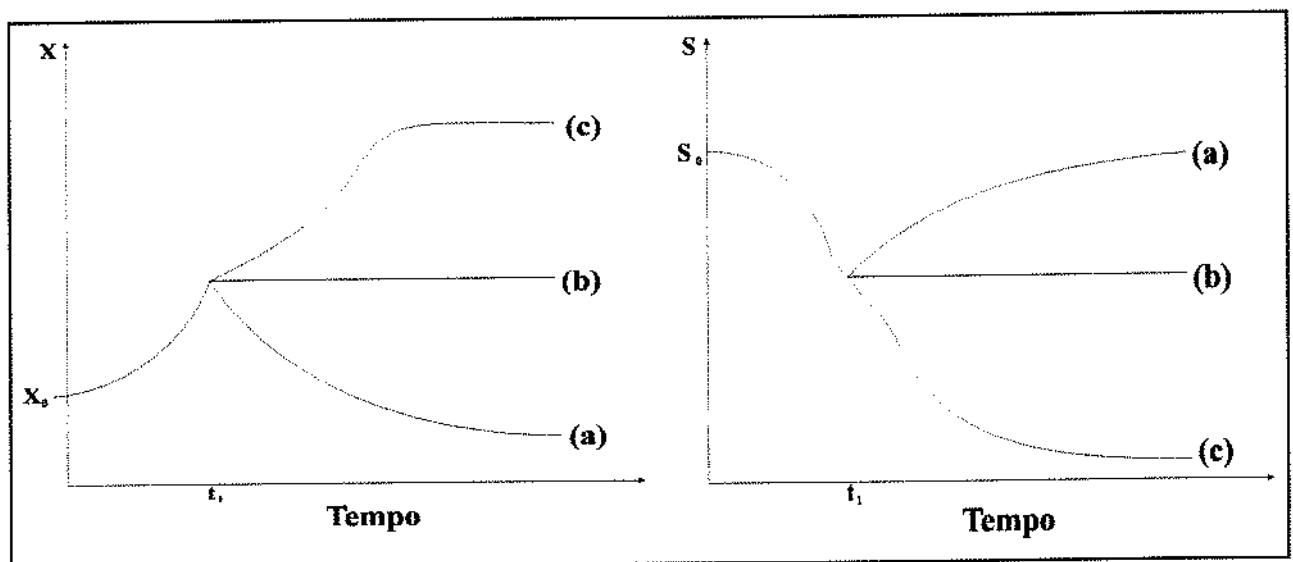


Figura 2.4 : Comportamentos previstos para reator com reciclo e purga de células.

Trabalhando com fermentação contínua e reciclo total de células (taxa de purga igual a zero), LAFFORGUE et alii (1987) e MELZOCH et alii (1991) obtiveram regimes estacionários quando a concentração celular atingiu um máximo e a taxa específica de crescimento alcançou seu mínimo. Neste ponto, MELZOCH et alii (1991) observaram que apesar da taxa específica de crescimento tender a zero, o substrato estava sendo consumido e convertido em etanol, na taxa constante da alimentação do substrato, demonstrando que a formação de etanol não é estritamente relacionada à reprodução celular.

CHANG, LEE e KIM (1993) comprovaram a existência de um estado estacionário, operando com taxa de purga e de diluição constantes em 0,15 e 0,41 h⁻¹ respectivamente. LEE e CHANG (1987) observaram que a manutenção de uma taxa de purga é necessária para manter uma concentração celular controlada e operacionalizar o equipamento. Com base na equação 40, os autores manipularam de forma conveniente as variáveis operacionais B e D, que na realidade determinam a taxa específica de crescimento celular., alcançando diversos patamares de estabilidade em relação a concentração celular e de etanol (tabela 2.4).

Tabela 2.4 : Estados estacionários obtidos por LEE e CHANG (1987) a 30°C.

Nº	B	D (h ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	X (g/l)	P (g/l)	S (g/l)
1	0,67	0,31	0,21	45	20	5
2	0,37	0,57	0,21	45	40	5
3	0,16	0,96	0,15	85	40	5
4	0,10	1,31	0,13	130	40	5

2.5 - EFICIÊNCIA DA MEMBRANA :

Uma diminuição da eficiência da membrana pode ser causada por (DEFRISE E GEKAS, 1988):

- depósito de material orgânico e inorgânico na superfície filtrante e,
- desenvolvimento de um filme orgânico constituído de microorganismos.

Estes dois tipos de adesões superficiais são funções da idade da cultura, da taxa de crescimento específico, das condições de crescimento, da concentração celular, da temperatura e do tempo de duração do experimento. Aumento da tensão de cisalhamento e retrolavagem são algumas técnicas citadas para se diminuir a adesão superficial (DEFRISE E GEKAS, 1988).

NISHIZAWA et alii (1983), trabalhando com leveduras de panificação em um meio de cultura artificial e utilizando um módulo de filtração polimérico com $0,1 \text{ m}^2$ de área efetiva de filtração, observaram um decréscimo na taxa de filtração por unidade de área de 40 l/h.m^2 para 10 l/h.m^2 nos primeiros 150 min. de operação, devido ao aumento da camada aderida na superfície filtrante. Entretanto, após 150 min., uma vazão constante de 7 l/h.m^2 foi observada, demonstrando que a vazão de recirculação de 600 l/h foi suficiente para manter o equilíbrio entre a deposição superficial e a remoção de partículas.

Em oposição ao afirmado por CHANG, YOO e KIM (1994), MATSUMOTO et alii (1988) classificaram como vantagem a facilidade de esterelização de uma membrana cerâmica externa (material alumina, com 95 cm^2 de área e poro de $1,6 \text{ }\mu\text{m}$) por vapor ou produtos químicos. Este analisou o comportamento de cinco tipos diferentes de retrolavagens, em uma fermentação com alta densidade celular obtida por filtração tangencial. Os métodos testados foram:

- parada periódica na bomba de recirculação;
- retrolavagem periódica com o filtrado;
- retrolavagem periódica com ar;
- sucção interna periódica do filtrado com bomba de apoio;
- sucção interna periódica de ar com bomba de apoio;

Concluiu que o método de retrolavagem periódica com o filtrado resultou em melhores taxas de filtração por área de membrana e que existe um volume e um intervalo de tempo ótimos para a operação. O autor observou a existência de um equilíbrio no fluxo de filtrado após 20 min. de operação, confirmando a teoria de NISHIZAWA et alii (1983). LEE e CHANG (1987) utilizaram uma limpeza externa no conjunto filtrante com solução de NaOH $0,1 \text{ N}$ por diversas horas e retrolavagem com água destilada. Após este procedimento a membrana filtrante retornou aos valores iniciais de taxa de permeado por área.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS :

O trabalho foi executado em duas etapas distintas. A primeira parte foi executada durante a espera do equipamento de microfiltração tangencial, e abrangeu a determinação dos parâmetros cinéticos de morte celular em função da temperatura e da concentração de etanol, conforme equações (31) a (34).

Com a aquisição do equipamento importado e término da primeira etapa, teve início a montagem do conjunto fermentador/microfiltro para se trabalhar com altas densidades celulares na fermentação contínua. Os itens detalhados a seguir descrevem a metodologia utilizada.

3.1 - MATERIAIS :

3.1.1 - Microorganismo :

Em ambos os experimentos foi utilizado uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* isolada em final de safra e cedida pela Usina Santa Adélia (S.P.), que está sendo mantida em ágar inclinado (P.D.A.) e repicada periodicamente.

3.1.2 - Meio de cultura :

1 - fermentação descontínua :

O meio utilizado na fermentação contínua foi melaço de cana-de-açúcar cedido pela Usina São Francisco (Capivari - S.P.), diluído a 40 g ART/l e enriquecido com 2,5 g/l de extrato de levedura da Biobrás. O meio teve seu pH corrigido para 4,5 com a adição de ácido clorídrico e foi esterilizado em autoclave por 15 min. a 121 °C.

2 - fermentação contínua :

- ativação

Tabela 3.1 : Meio de cultura para ativação

produto	concentração	fornecedor
melaço	80 g ART/l	Usina São Francisco
extrato de levedura	1,0 g/l	Biobrás

- manutenção

Tabela 3.2 : Meio de Cultura para manutenção

produto	concentração	fornecedor
melaço	180 g ART/l	Usina São Francisco
extrato de levedura	3,0 g/l	Biobrás
cloreto de amônia (NH ₄ Cl)	3,0 g/l	-
fosfato ácido de potássio (KH ₂ PO ₄)	1,5 g/l	-

Ambos os meios de cultura tiveram seu pH corrigido com ácido clorídrico, sendo os frascos de 250 ml esterilizados por 15 min. a 121 °C, e os garrafões de 12 e 20 l esterilizados por 30 min. a 121 °C.

3.1.3 - Microfiltro tangencial :

Microfiltração é a técnica usada para separação de partículas em uma suspensão, baseado em seu tamanho. O microfiltro é uma fina membrana permeável, suportada em material cerâmico, que retém partículas de um certo tamanho e permeia outras pequenas partículas dissolvidas e/ou suspensas, incluindo o solvente. Portanto, a característica de retenção de uma membrana é função direta do diâmetro do poro. Membranas inorgânicas são estáveis a altas temperaturas e sob fortes tensões, o que significa que estas podem ser repetidamente esterilizadas no local e são ideais para operação à altas pressões.

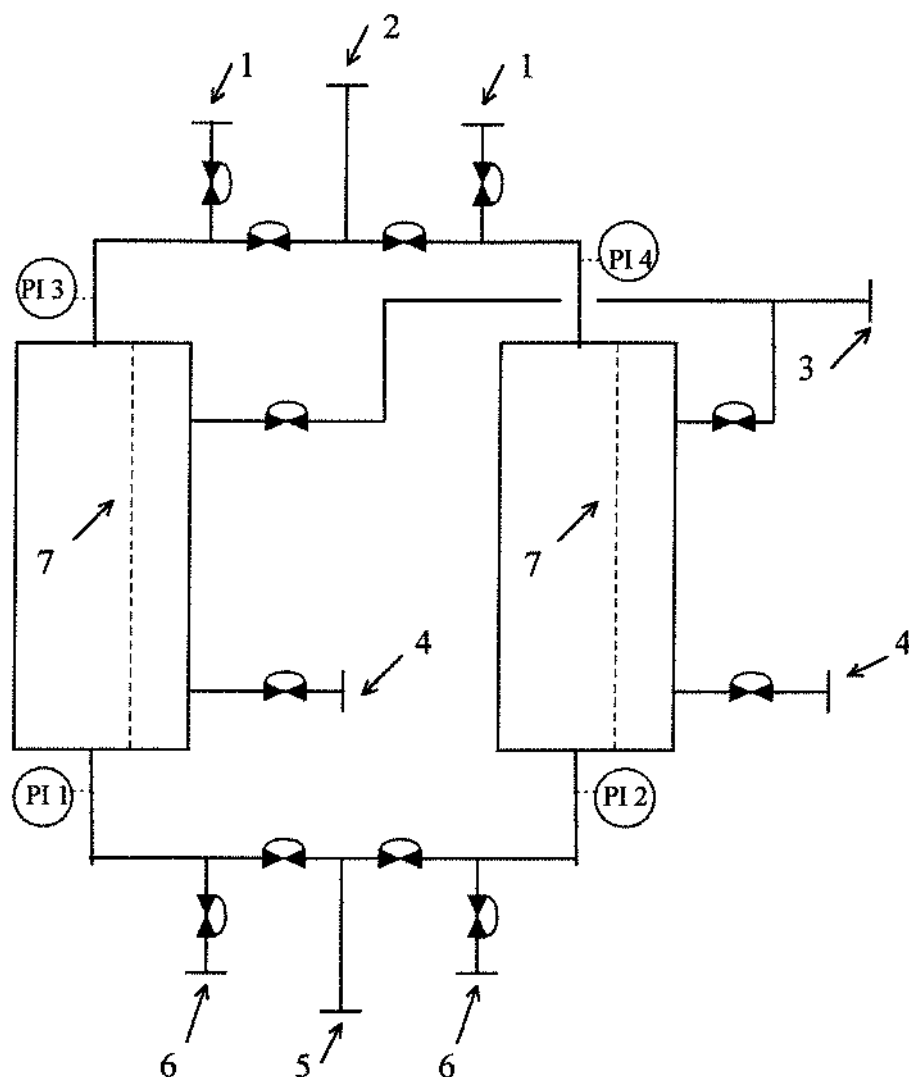
O sistema de microfiltração tangencial utilizado foi projetado e construído pela Millipore Corporation e compõe-se de 2 elementos filtrantes cerâmicos alojados em carcaças de aço inox 316L, conforme esquema da figura 3.1.

Os dois conjuntos podem operar tanto em paralelo como em série, conforme manipulação das válvulas de diafragma nas linhas de alimentação, permeado e de meio retido. No experimento desenvolvido, os elementos filtrantes trabalharam de forma intercalada, ou seja, quando um conjunto estava operante, o outro era preparado (vide item 3.2.3) para substituição ao primeiro. Conexões sanitárias tipo tri-clamp e quatro indicadores de pressão completaram a aparelhagem.


O elemento filtrante utilizado tem a seguinte característica :

- nome comercial : CERAFLO™.
- tipo : inorgânico externo.
- material : alumina de alta pureza.
- porosidade : 0,22 μm nominal.
- comprimento : 22,9 cm.
- área de filtração : 371,6 cm^2 .

O princípio de filtração se baseia no gradiente de pressão entre a parte interna do filtro e a parte externa, de maneira que o permeado migre através dos poros do elemento filtrante (figura 3.2). A circulação do meio fermentativo pelos orifícios do filtro, com pressão suficiente para forçar a permeação de solvente, foi conseguida com o acoplamento de uma bomba helicoidal de deslocamento positivo marca NETSCH (modelo 2.NEL.20.A com motor de indução de 1,5 cv a 1750 rpm) ao sistema microfiltro/fermentador. Para melhor ajuste do fluxo de circulação, um variador de frequência de alimentação marca BALDOR (série 11) foi acoplado ao motor da bomba helicoidal. A curva característica de frequência versus vazão da bomba, para uma descarga a 40 psi, é dada pela figura 3.8. Durante o experimento procurou-se fixar a vazão de circulação em 850 l/h (correspondente a uma frequência de alimentação de 40 Hz). Este valor foi suficiente para gerar uma tensão de cisalhamento elevada nas paredes internas do elemento, dificultando incrustações orgânicas e inorgânicas, que poderiam obstruir a camada filtrante, diminuindo a eficiência do sistema.



 - válvula diafragma ¼ pol., aço inox.

 - conexão tipo T.C. (tri-clamp) ¼ pol., aço inox.

1 - entrada de vapor.

5 - fluxo de alimentação.

2 - fluxo de meio retido.

6 - saída de vapor condensado.

3 - saída de permeado.

7 - membrana inorgânica.

4 - dreno permeado.

PI - indicador local de pressão.

Figura 3.1 : Esquema de equipamento para microfiltração tangencial.

Com o conjunto trabalhando de forma intercalada, a pressão interna foi controlada pela restrição parcial da circulação de meio em uma das válvulas de diafragma na saída de meio retido. O segundo conjunto permanecia com as duas válvulas de diafragma (fluxo de alimentação e fluxo de retido) totalmente fechadas. A pressão normal de trabalho esteve na faixa de 30 a 40 psi. A necessidade de pressões maiores a estas, para se manter o fluxo de permeado desejado, era indicativo de saturação do elemento e necessidade de inversão na operação. O conjunto inoperante era limpo e preparado para novo período (vide item 3.2.3).

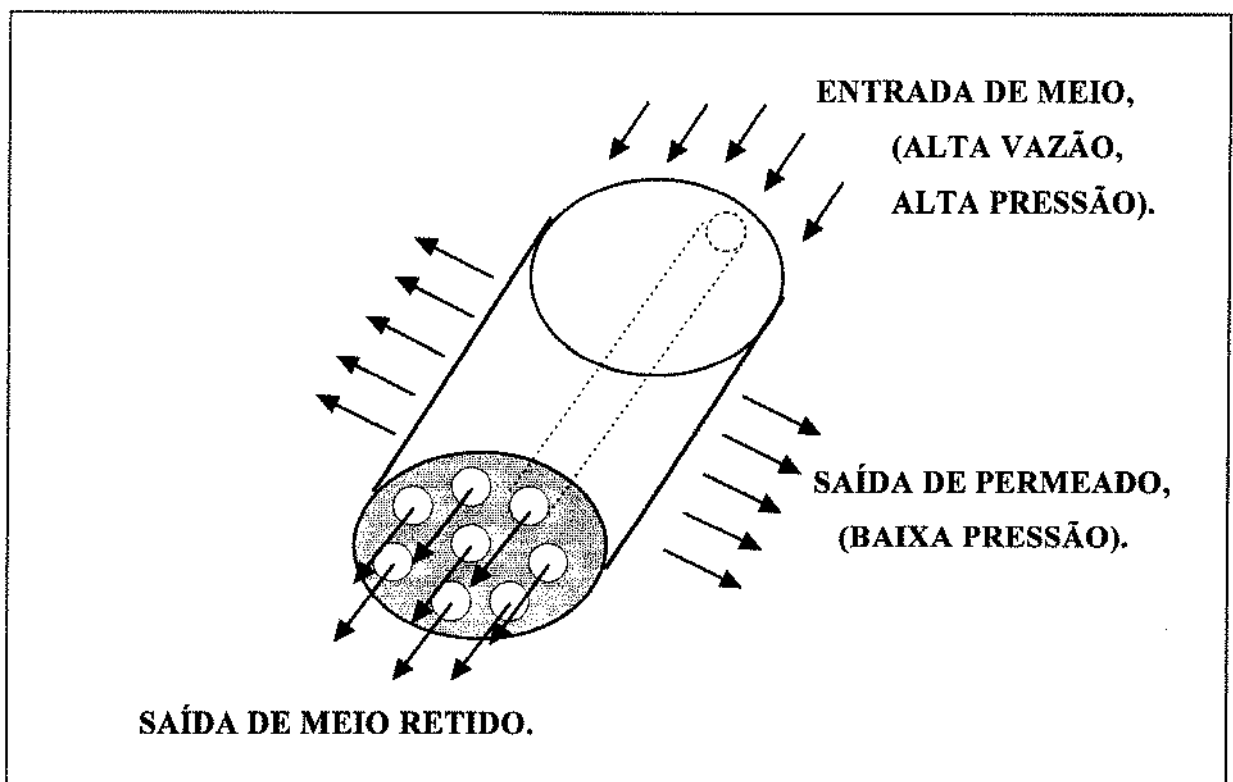


Figura 3.2 : Filtração por fluxo tangencial.

3.1.4 - Fermentador :

Para a fermentação contínua foi utilizado o fermentador BIOFLOW III, produzido por NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC CO. INC. Este tipo de equipamento tem sua cuba de fermentação construída em vidro e aço inox 316 e pode ser completamente desmontado para higienização. Possui ainda controladores de velocidade de agitação, temperatura do meio, pH, nível de espuma e oxigênio

dissolvido. Entretanto, este não possui sistema de resfriamento para a água de circulação, sendo necessário, para o trabalho com temperaturas inferiores durante o verão, o acoplamento de um banho termostaticado com bomba de circulação externa, na entrada da água de resfriamento da camisa em aço inox. Com este artifício, foi possível obter temperaturas constantes mesmo em dias quentes.

3.1.5 - Sistema microfiltro / fermentador:

O acoplamento do conjunto microfiltro/fermentador foi realizado por uma tubulação de aço inox flexível, revestida internamente por uma camada de teflon (D.I. = ½"), como pode ser observado nas figuras 3.4 a 3.7. Doze adaptadores para tubulação flexível com conexão tipo "tri-clamp" ¼ " e doze abraçadeiras para T.C ¼ " foram confeccionadas para se possibilitar a montagem da aparelhagem. Ainda, dois tubos de aço inox 316 (D.E. ½ ") foram adaptados na placa superior do fermentador para sucção e descarga do meio (vide figura 3.6). Além da bomba de circulação, três bombas peristálticas foram utilizadas.

- bomba de alimentação de substrato:
 - marca : Masterflex.
 - modelo : 7520-25 (cabeçote para tubo silicone 96400-16).
- bomba de permeado:
 - marca : Masterflex.
 - modelo : 7553-60 (cabeçote 7016-20).
- bomba de purga :
 - marca : Masterflex.
 - modelo : 7553-60 (cabeçote 7016-20).

Estas bombas utilizam tubos de silicone flexíveis inteiriços (vide figuras 3.4 a 3.7), o que diminuiu pontos mortos e aumentou a eficiência da esterilização. Duas conexões sanitárias de vidro esmerilhado foram utilizadas para inoculação e alimentação de substrato (na troca do recipiente de armazenagem). A separação foi realizada após ter sido detectado crescimento celular na tubulação de alimentação de substrato, após a inoculação do fermentador, quando apenas uma entrada era

utilizada. Uma terceira conexão sanitária foi instalada na saída de gás carbônico, para facilitar a troca do filtro de gases. Os seguintes equipamentos periféricos completaram o sistema :

- Controle de nível ótimo :

Foi utilizado uma bóia de aço inox interna no reator, conectado a um controlador tipo liga/desliga com temporizador de desarme. O controlador emite uma corrente (100 a 200 mA) que, dependendo da posição da bóia (posição inferior => aberto, posição superior => fechado), retorna ou não a corrente para o controlador. Este por sua vez libera ou não voltagem para a bomba de alimentação de substrato. O temporizador de desarme foi regulado para cortar a corrente da bomba de alimentação oito segundos após ocorrer a posição de fechado na bóia. Este sistema foi montado com a finalidade de se obter um nível ótimo e um nível máximo no reator (variação de 20 ml), de maneira a diminuir o número de acionamentos da bomba e que não interferisse nos experimentos realizados.

- Controle de nível mínimo:

Devido às características da bomba de circulação utilizada (bomba helicoidal com estator de borracha nitrílica), principalmente a impossibilidade de operação sem líquido, que pode causar perda do estator, foi montado um sistema de segurança contra falhas no sistema de controle de nível principal. Duas varetas de aço inox isoladas entre si foram introduzidas pela placa superior do fermentador, até cerca de 4,0 cm abaixo do nível ótimo. O variador de frequência BALDOR foi ajustado para cortar a corrente de alimentação da bomba de circulação se os terminais externos 7 e 8 permanecerem em aberto. Ou seja, enquanto as pontas das varetas estiverem imersas no meio fermentativo, condutor, o variador de frequência BALDOR entenderá que os terminais externos 7 e 8 estão fechados e acionará a bomba de circulação. Qualquer falha no sistema (falta de melaço, bóia travada, etc.) que cause uma redução do nível do fermentador, será detectado pelo sensor de nível mínimo.

- Controle de espuma:

Foi utilizado um sensor fornecido pela NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC CO. INC. Este foi montado pela placa superior do fermentador e alinhado cerca de 6,0 cm acima do nível de líquido. Qualquer alteração de nível de espuma aciona a bomba de alimentação de anti-espumante, que foi ajustada no potenciômetro P2 na relação 25% do tempo ligado e 75% do tempo desligado. O

potenciômetro P1 (ambos localizados na parte traseira do fermentador) regula a sensibilidade do sensor de espuma.

- Amostrador:

Foi utilizado o conjunto amostrador fornecido pela NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC CO. INC. (vide fig 3.4 e 3.6). A tubulação de amostragem também foi utilizada para a purga do sistema.

- Condensador de substâncias voláteis:

Acoplado verticalmente na parte externa da placa superior, teve sua camisa alimentada com água gelada do banho termostático (0 a 5°C).

- Indicador de vazão de gás carbônico:

Um rotâmetro (0 a 1,5 l/h) foi conectado a saída superior de gás (após o condensador) com a finalidade de avaliar a produção instantânea de gás carbônico e a atividade do meio fermentativo, assim como suas variações como resposta às alterações realizadas nas condições do sistema.

- Válvula redutora de pressão:

Esta válvula foi instalada na saída de permeado (vide figura 3.7, lado esquerdo) após ter-se percebido uma variação na vazão da bomba de permeado, causada pela forte oscilação da pressão do sistema, devido às características de pulsação da bomba de circulação. A válvula redutora de pressão foi fixada para reduzir a pressão na linha de permeado de 35-40 psi para 10 psi, e acabou por absorver os impactos causados pela oscilação da pressão. Após esta medida, o fluxo de permeado foi satisfatoriamente regulado.

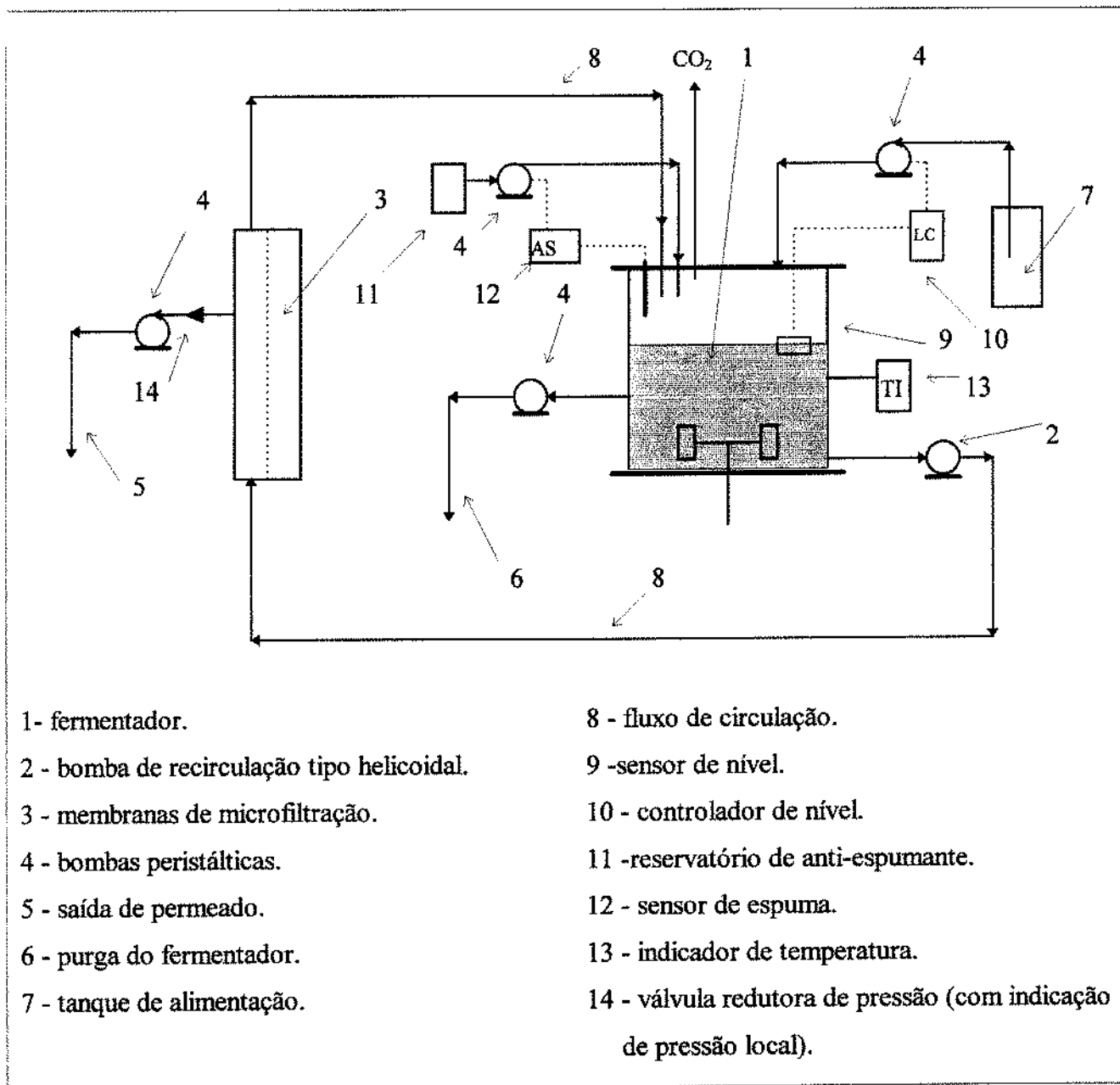


Figura 3.3 : Esquema de equipamento para reciclo de células em fermentação contínua.

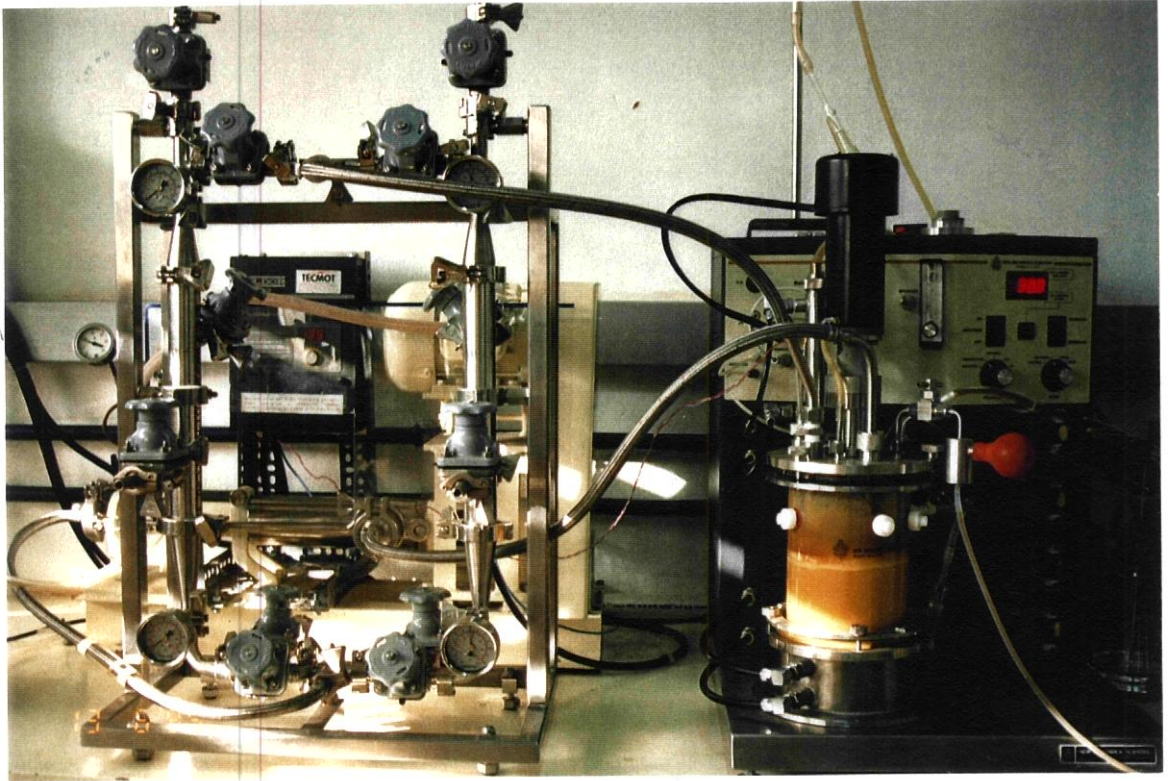


Figura 3.4 : Visão frontal do conjunto fermentador/microfiltro.



Figura 3.5 : Visão lateral do conjunto fermentador/microfiltro.

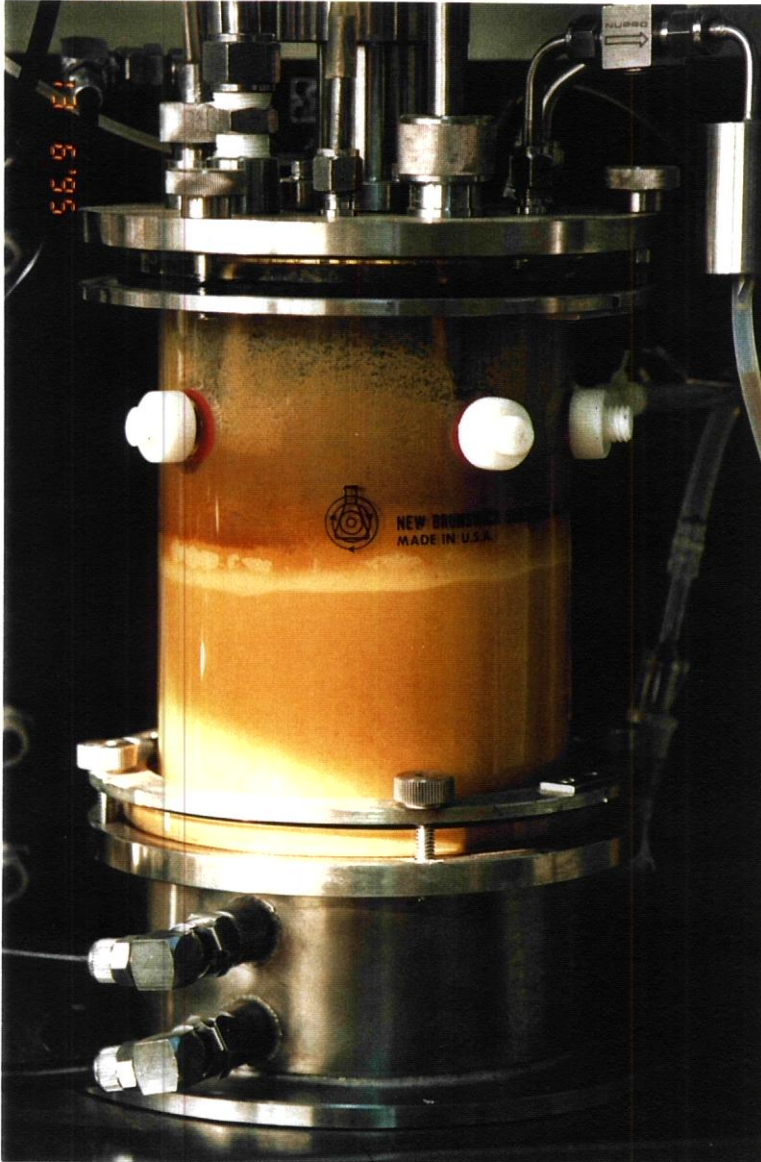


Figura 3.6 : Detalhe do fermentador.

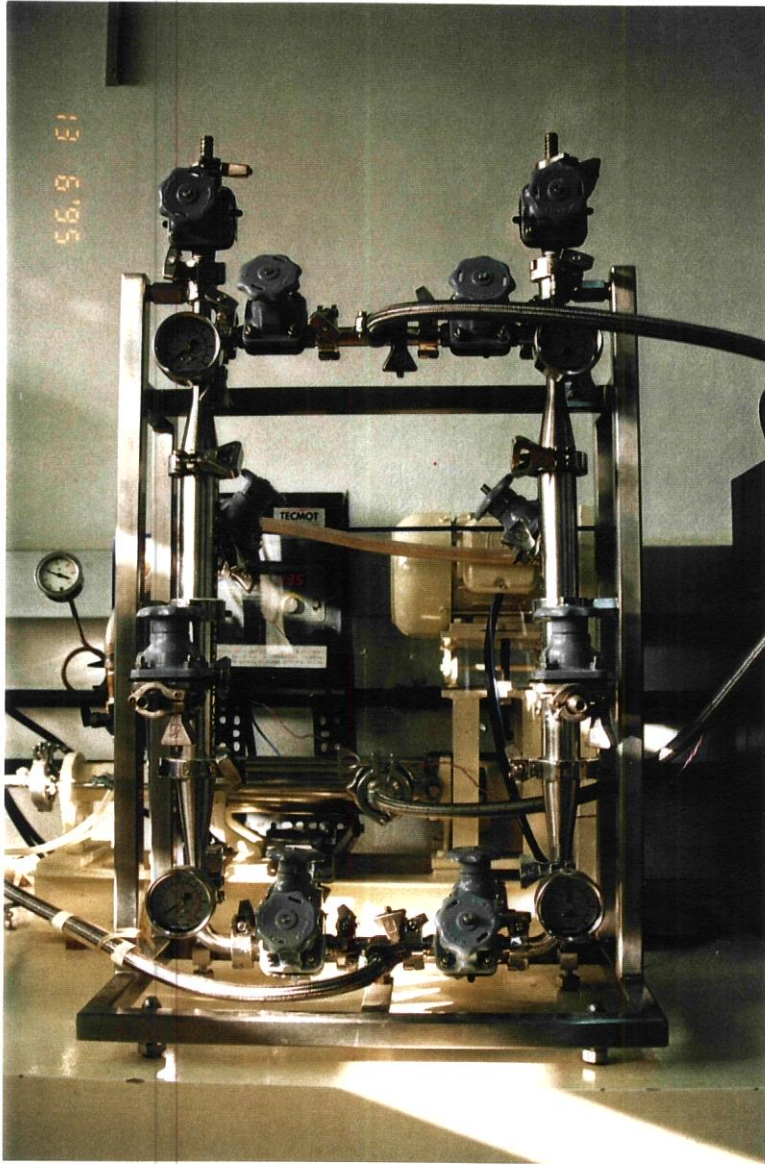


Figura 3.7 : Detalhe do microfiltro.

3.1.6 - Calibrações do sistema microfiltro / fermentador:

1 - Bomba de circulação :

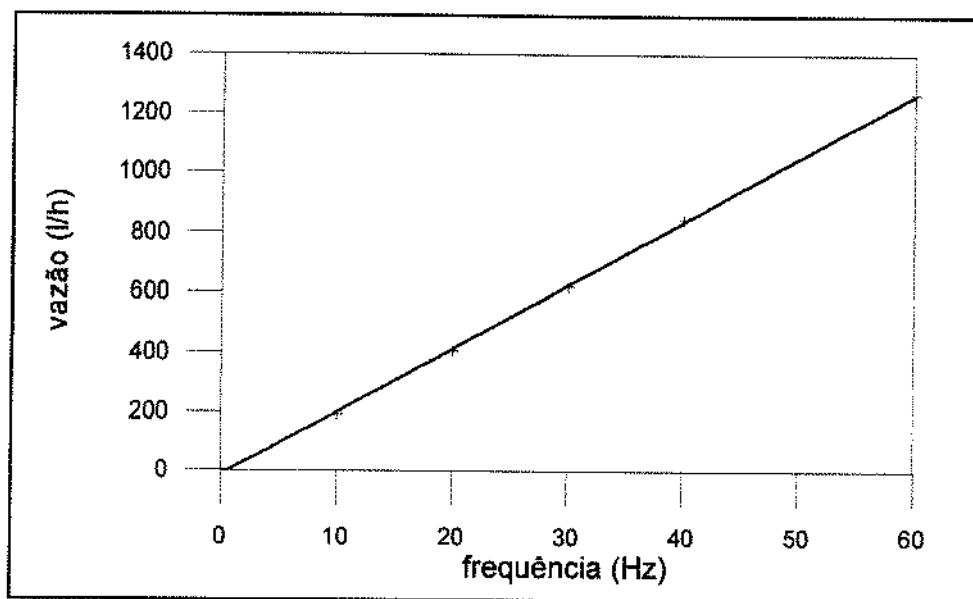


Figura 3.8 : Curva de calibração da bomba de circulação.

A aferição da bomba de circulação foi realizada com a medição em triplicata do volume de água bombeada após a passagem pelo conjunto filtrante, num intervalo de tempo, fixada no variador de frequência em um dos valores dentro da faixa de trabalho de 0 a 60 Hz. Observa-se na figura 3.8 uma dependência linear entre o aumento da velocidade de rotação da bomba e a vazão de circulação, indicando uma baixa perda de carga no microfiltro.

2 - Aferição do volume :

Com o sistema montado e o controle de nível ótimo fixado em determinada altura dentro da cuba principal, foram realizadas seis medições do volume útil interno. Para este teste foi utilizado um garrafão de 15 l com água destilada, suportado em uma balança, estando o conjunto inicialmente vazio. A média das seis medições indicou que :

VOLUME ÚTIL DO FERMENTADOR = 2,8 l

3.2 - PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS :

3.2.1 - Preparo do inóculo :

Erlenmeyers de 250 ml contendo 80,0 ml do meio de cultura desejado (40 g ART/l para fermentação descontínua e 80 g ART/l para fermentação contínua), foram esterilizados e posteriormente resfriados à temperatura ambiente. Estes foram inoculados com uma alçada da cultura de *Saccharomyces cerevisiae* e incubados. Para as fermentações descontínuas os frascos foram incubados por 24 horas em shaker agitado, dentro de uma das temperaturas estipuladas para o teste (28, 31, 34 e 37 °C). Para as fermentações contínuas, o meio de cultura utilizado na etapa inicial foi o de ativação (80 g ART/l), sendo incubado por 24 horas a 33°C em shaker agitado. Os frascos utilizados para inoculação do fermentador contínuo de 2,8 l foram providos de saída flexível inferior e conexão esmerilhada esterilizável, para transferência do meio incubado ao fermentador.

3.2.2 - Fermentação Descontínua :

Esta etapa teve por finalidade a determinação das constantes de morte celular em função da temperatura e da concentração de etanol. Após estudos prévios, foram determinados as seguintes faixas de trabalho :

- temperatura : 28°C , 31°C , 34°C e 37°C.
- concentração de etanol : 65 g/l , 80 g/l , 95 g/l e 110 g/l.

Quatro porções de 2,0 ml do inóculo preparado foram retirados e transferidos assépticamente para 4 erlenmeyers contendo 78,0 ml do meio de cultura e as concentrações de etanol pré-definidas. Estes frascos foram colocados em shaker rotativo e incubados em uma das temperaturas dentro da faixa estudada por tempo suficiente para ocorrer sensível redução do número de células viáveis. A relação entre o número de células viáveis inoculadas (N_0) e o número de células viáveis (N_v) no tempo (t), para cada frasco, pôde ser observada com a retirada de amostras periódicas em ambiente estéril, e contadas pelo método de coloração por azul de metileno.

De posse dos dados da evolução do número de células viáveis em função do tempo, foi possível determinar as constantes das equações 31 a 33, conforme modelo proposto por DALE, CHEN e OKOS (1990).

- 1^o gráfico : $\ln (N_v/N_0)$ versus t
coeficiente angular : $- K_d (T,P)$
- 2^o gráfico : $\ln K_d (T,P)$ versus $1/T$
coeficiente angular : $- E_1/R$
coeficiente linear : $\alpha = (\ln A_i + K_{dp}P)$
- 3^o gráfico : $\alpha = (\ln A_i + K_{dp}P)$ versus P
coeficiente angular : K_{dp}
coeficiente linear : $\ln A_i$

3.2.3 - Preparação do conjunto microfiltro/fermentador :

A sanificação do conjunto microfiltro/fermentador foi realizada com o equipamento montado, tanto em sua fase inicial de preparação para partida, como na inversão dos elementos inorgânicos filtrantes, durante a fermentação.

- Preparação inicial :

Ao final de cada fermentação, as partes móveis do fermentador eram desmontadas e lavadas manualmente para eliminação do excesso de material aderido. Em seguida o equipamento era montado e realizado uma lavagem com água corrente, por adição desta ao fermentador e bombeamento para o corpo do microfiltro, com todas as válvulas abertas. A retirada de material aderido no elemento filtrante e corpo da bomba foi realizada pela circulação de uma solução de NaOH 0,5N a 40-50 °C entre o fermentador, bomba e microfiltro, em sistema fechado (C.I.P.), por 1 hora, a uma vazão de 900 l/h. O excesso de solução alcalina foi removido por uma nova lavagem com água corrente por 15 min.

A esterilização do conjunto foi realizada com vapor saturado a 15 psi e 121°C por 2 horas. A adição de vapor foi realizada pelo topo do equipamento de filtração e o condensado recolhido pelo fundo (vide fig. 3.1). As válvulas diafragma do microfiltro foram manipuladas de maneira a formar uma corrente de vapor entre este equipamento, o fermentador, a bomba e finalmente retornando pelo fundo para a saída de condensado. Todas as conexões de alimentação, saída de gás, saída de meio fermentado, válvulas de permeado, etc., permaneceram parcialmente abertas (com fluxo de vapor) para esterilização.

- Inversão dos elementos filtrantes :

Durante a operação contínua, algumas vezes se fazia necessário a inversão dos elementos filtrantes para limpeza de material aderido as paredes, que tendem a diminuir a taxa de permeação. O ponto de inversão era observado quando a pressão após a válvula redutora (item 14 na fig. 3.3) não permanecia no valor previamente regulado (10 psi), mesmo com uma pressão interna de circulação de 40-50 psi. Este fato era indicativo da redução no fluxo de permeado e saturação da membrana.

A seqüência de lavagem foi a mesma utilizada para a partida, sendo que o conjunto inoperante era isolado do operante por duas válvulas diafragma, e a limpeza se dava em separado, com o auxílio de uma bomba peristáltica externa.

3.2.4 - Modelagem matemática para fermentação contínua com alta concentração celular :

Neste desenvolvimento foi utilizado um modelo cinético não-estruturado, ou seja, o microorganismo foi considerado como um simples reagente, com uma composição química definida e sua reprodução pode ser descrita por uma equação estequiométrica. Assim, substrato reage com células viáveis produzindo mais células viáveis, que por sua vez formam células mortas e produto. As variáveis e parâmetros utilizados são classificados em :

a) variáveis de estado : definem o estado do processo.

$$X_v, X_d, S, P$$

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

$$D, B, S_0, X_{v0} (=0), X_{d0} (=0), P_0 (=0)$$

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

$$r_x, r_s, r_p, r_d$$

d) parâmetros cinéticos.

$$\mu_{máx}, K_d, K_S, m, n, P_m, X_m$$

e) parâmetros estequiométricos.

$$Y_{X/S}, Y_{X/P}, Y_{P/S}$$

No modelo assumiremos :

- i - mistura perfeita no reator.
- ii - volume constante no reator.
- iii - volume das bolhas é desprezível
- iv - o microfiltro trabalha de forma ideal, ou seja, a corrente do filtrado é livre de células.

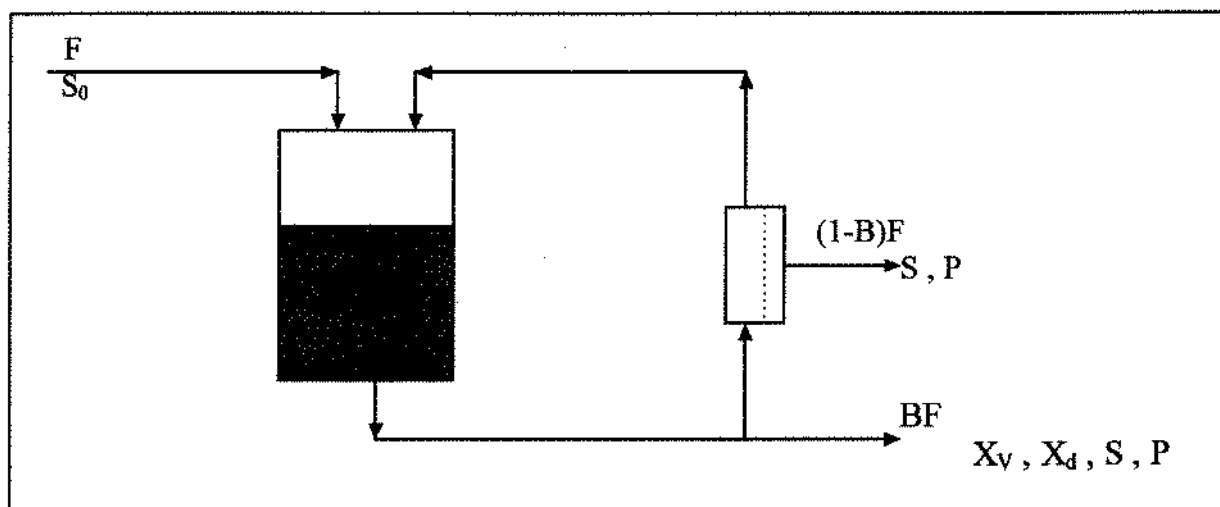


Figura 3.9 : Fermentador CSTR com reciclo de células.

Os limites para as variáveis de estado são:

$$0 \leq S \leq S_0 \tag{45}$$

$$X_v \geq 0 \tag{46}$$

$$0 \leq X_d \leq X_v \tag{47}$$

$$P \geq 0 \tag{48}$$

As equações que descrevem o modelo são descritos por:

$$\text{células viáveis : } \frac{d(X_v V)}{dt} = (r_x - r_d) V - B F X_v \quad (49)$$

$$\text{células mortas : } \frac{d(X_d V)}{dt} = r_d V - B F X_d \quad (50)$$

$$\text{substrato : } \frac{d(SV)}{dt} = - r_s V + F(S_0 - S) \quad (51)$$

$$\text{produto : } \frac{d(PV)}{dt} = r_p V - F P \quad (52)$$

Para as taxas cinéticas:

$$r_x = \mu X_v \quad (53)$$

$$r_s = r_x / Y_{X/S} = r_p / Y_{P/S} \quad (54)$$

$$r_d = K_d X_v \quad (55)$$

$$r_p = r_x / Y_{X/P} \quad (56)$$

E para a taxa específica de crescimento celular:

$$\mu = \mu_{má} \times \left[1 - \left(\frac{P}{P_m} \right)^n \right] \left[1 - \left(\frac{X_t}{X_m} \right)^m \right] \left[\frac{S}{S + K_s} \right] \quad (57)$$

Ainda :

$$X_t = X_d + X_v \quad (58)$$

$$D = F/V \quad (59)$$

$$\text{Prod.} = P \cdot D \quad (60)$$

Assumindo-se estado estacionário, pode ser deduzido a partir das equações 49 a 52 que:

$$r_x = BDX_t \quad (61)$$

$$r_d = BDX_d \quad (62)$$

$$r_s = D(S_0 - S) \quad (63)$$

$$r_p = DP \quad (64)$$

3.2.5 - Fermentação Contínua:

O objetivo inicial desta etapa do trabalho foi o de determinar as constantes cinéticas do modelo proposto em função da temperatura. Segundo PIRT (1975) e LUONG (1985), seria possível a obtenção de estados estacionários em fermentadores com reciclo de células. Neste caso o termo da direita da equação 49 é igualado a zero e, substituindo-se as equações 53 e 55, obtemos:

$$\mu - K_d = B \cdot D \quad (65)$$

A equação 65 indica um equilíbrio entre a taxa específica de crescimento celular menos a taxa de morte e a purga de células do sistema. Se o ajuste das variáveis operacionais B e D, que regulam a taxa de purga, for realizado de maneira a exceder o crescimento celular, o sistema tenderia a diluição da concentração do número de células totais. A metodologia utilizada consistiu em ajustar inicialmente a taxa de purga em valor inferior a taxa de crescimento celular. Assim, o aumento da concentração celular causou uma diminuição da taxa específica de crescimento, até que ocorresse a igualdade entre as taxas de purga e de crescimento celular. Este estado estacionário formado é, teoricamente, auto-regulável.

Com o controle das variáveis operacionais e análise das variáveis de estado em diversos patamares de regimes estacionários e, em cada uma das temperaturas previstas (28, 30, 32, 34, 36, 38 e 40 °C), foi possível obter-se a partir das equações 61 a 64 os parâmetros cinéticos do modelo proposto em função da temperatura.

3.3 - MÉTODOS ANALÍTICOS :

3.3.1 - Concentração de açúcares redutores totais :

Foi utilizado o método colorimétrico com o reagente ácido dinitrosalicílico (DNS), conforme descrito por MILLER (1959), após prévia hidrólise da sacarose (2 ml da amostra diluída e 2 ml de uma solução de ácido clorídrico 2 N são aquecidos a 100°C por 5 min, resfriados a temperatura ambiente e neutralizados com uma solução de hidróxido de sódio 2 N). Este método se baseia na elaboração de uma curva padrão para a solução de DNS, que relaciona a concentração de açúcar em uma amostra conhecida a absorvância, utilizando-se um espectrofotômetro a 540 nm. Repetindo-se o procedimento de hidrólise prévia da sacarose na amostra desejada e lendo-se a sua absorvância após dosagem do reagente DNS, obtém-se a concentração de açúcares redutores totais (ART) da amostra.

3.3.2 - Concentração de células :

A concentração de células na base seca foi determinada por gravimetria. Três frações do meio fermentativo eram retiradas e centrifugadas separadamente por 10 min a 5000 rpm em frascos plásticos previamente tarados. As massas decantadas eram ressuspensas por três vezes em água destilada e, ao final da última ressuspensão, secas em microondas por 40 min.. A razão entre a diferença das massas (final menos tara) e o volume da fração retirada resultava na concentração celular em g cél. seca/l. O tempo de 40 min. de secagem no microondas em potência máxima foi determinado após elaboração prévia de uma curva de secagem de leveduras, conforme figura 3.10.

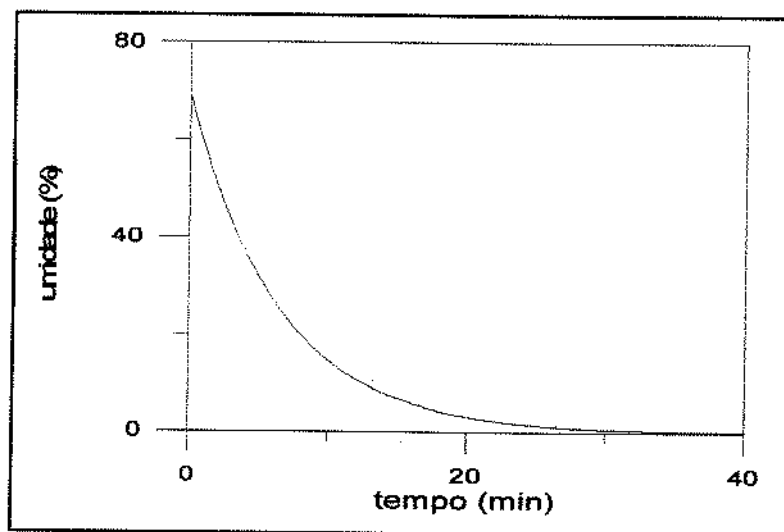


Figura 3.10 : Curva de secagem de leveduras no microondas.

3.3.3 - Concentração de etanol :

Foi utilizado um cromatógrafo a gás da marca Varian (modelo 3300) com coluna capilar J&W Scientific de 30 m de comprimento e 0,53 mm de diâmetro interno, com fase estacionária de 100% metilpolisiloxano (1,5 μ m). Foi utilizado padrão externo de etanol P.A. As demais condições operacionais foram as seguintes :

- Temperatura do injetor : 220^oC
- Temperatura do detector : 250^oC
- Temperatura inicial da coluna : 40^oC
- Tempo de aquecimento da coluna : 2,0 min. (aquecimento : 10 ^oC/min.)
- Temperatura final da coluna : 100^oC
- Volume injetado : 0,5 μ l

Inicialmente foi elaborado uma curva de calibração com etanol P.A. que indicava a concentração de etanol versus a área de integração do aparelho. As amostras do meio foram mantidas congeladas e somente preparadas na hora da análise. Estas foram injetadas em triplicata.

3.3.4 - Viabilidade :

O método de coloração com solução de azul de metileno a 0,025% peso/volume descrito por LEE, ROBINSON e WANG (1981) foi utilizado para a determinação rápida da concentração de células viáveis e não viáveis. A amostra do meio foi diluída com solução salina de Ringer de maneira que cada quadro da câmara de Neubauer contivesse de 80 a 160 células. A contagem baseia-se no princípio de que as células mortas não reduzem o corante azul de metileno tornando-se de coloração azulada, enquanto que as células vivas reduzem o corante e retornam a sua condição de incolor. Assumiu-se como convenção morfológica que um broto é considerado uma unidade celular quando este ultrapassasse metade do tamanho da célula-mãe, sendo o conjunto contado com duas células. A viabilidade pôde ser calculada pela razão entre o número de células viáveis e o número total de células contadas.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO :

4.1 - CONSTANTES CINÉTICAS DE MORTE CELULAR :

Esta parte do trabalho teve por objetivo a determinação das constantes cinéticas de morte celular para *Saccharomyces cerevisiae*, em função da temperatura e da concentração de etanol, conforme procedimento experimental descrito no item 3.2.2. Experimentos realizados por NAGODAWITHANA e STEINKRAUS (1976), NOVAK, STREHAIANO, MORENO e GOMA (1981) e LEE e CHANG (1987) demonstraram que o etanol produzido intracelularmente pela célula de levedura é mais letal que o etanol adicionado ao meio de cultura. Entretanto, a metodologia seguida, proposta por DALE, CHEN e OKOS (1990), utiliza a adição de etanol ao meio de cultura para determinação das constantes de morte celular.

Os resultados obtidos estão tabelados (4.1 a 4.4) para cada temperatura, em função do tempo e da concentração de etanol (em g/l), e representados pelas figuras 4.1 a 4.8. Observa-se que o número de células viáveis e a viabilidade decrescem com o tempo e que este decréscimo é mais acentuado quanto maiores forem a temperatura e a concentração de etanol.

Baseado no método de linearização das equações exponenciais 31 a 33 descrito no item 3.2.2, obteve-se as curvas 4.9 a 4.12 de $\text{LN}(N_v/N_0)$ versus t . Alguns pontos da curva original do número de células viáveis em função do tempo não foram utilizados nestes gráficos, visto que o modelo proposto somente representa a taxa de morte celular em sua fase exponencial. Os valores obtidos para $K_d(T,P)$ estão na tabela 4.5, onde nota-se uma tendência ao aumento de $K_d(T,P)$ conforme aumentam a temperatura e a concentração de etanol.

Comparando-se as curvas de evolução do número de células viáveis em função do tempo (figuras 4.1, 4.3, 4.5 e 4.7) e os valores obtidos para $K_d(T,P)$ (tabela 4.5), observa-se um crescimento celular inicial para concentrações de etanol inferiores (65 e 80 g/l) e valores relativamente altos para $K_d(T,P)$ nestas concentrações. Supondo-se um modelo cinético onde a produção de etanol está associada ao crescimento celular, pode-se concluir que o etanol intracelular produzido nesta fase inicial, teve um efeito tóxico intenso na célula de levedura em sua fase

Tabela 4.1 : Morte celular na presença de etanol a 28 °C.

TEMPO (h)	Número de Células Viáveis				Número de Células Mortas				Viabilidade			
	65 g/l	80 g/l	95 g/l	110 g/l	65 g/l	80 g/l	95 g/l	110 g/l	65 g/l	80 g/l	95 g/l	110 g/l
0	3,34E+07	3,27E+07	3,20E+07	3,13E+07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	100,0	100,0	100,0	100,0
8	--	--	3,98E+07	3,77E+07	--	--	1,00E+05	0,00E+00	--	--	99,7	100,0
24	1,44E+08	6,28E+07	2,97E+07	3,02E+07	8,00E+05	4,00E+05	3,10E+06	4,80E+06	99,4	99,4	90,5	86,3
48	2,42E+08	1,05E+08	2,95E+07	2,13E+07	1,20E+06	1,20E+06	4,30E+06	1,08E+07	99,5	98,9	87,3	66,4
72	1,92E+08	9,44E+07	2,68E+07	1,13E+07	1,40E+06	3,00E+05	6,30E+06	1,89E+07	99,3	99,7	81,0	37,4
96	1,57E+08	8,72E+07	2,38E+07	6,50E+06	2,70E+06	2,00E+06	1,62E+07	2,27E+07	98,3	97,8	59,5	22,3
144	1,25E+08	6,95E+07	8,72E+06	2,10E+06	2,00E+07	5,90E+06	2,90E+07	3,29E+07	86,2	92,2	23,1	6,0
192	7,43E+07	3,81E+07	7,88E+06	6,00E+05	7,75E+07	3,90E+07	3,05E+07	3,28E+07	48,9	49,4	20,5	1,8
240	1,08E+07	1,41E+07	3,55E+06	0,00E+00	1,45E+08	6,97E+07	3,14E+07	3,30E+07	6,9	16,8	10,1	0,0
312	2,40E+06	2,80E+06	0,00E+00	--	1,40E+08	8,17E+07	3,14E+07	--	1,7	3,3	0,0	--

Tabela 4.2 : Morte celular na presença de etanol a 31 °C.

TEMPO (h)	Número de Células Viáveis				Número de Células Mortas				Viabilidade			
	65 g/l	80 g/l	95 g/l	110 g/l	65 g/l	80 g/l	95 g/l	110 g/l	65 g/l	80 g/l	95 g/l	110 g/l
0	2,72E+07	2,66E+07	2,61E+07	2,55E+07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	100,0	100,0	100,0	100,0
8	--	--	2,79E+07	3,38E+07	--	--	2,00E+05	1,60E+06	--	--	99,3	95,5
24	1,47E+08	3,66E+07	2,77E+07	2,37E+07	4,50E+05	1,90E+06	3,80E+06	7,20E+06	99,7	95,1	87,9	76,7
48	1,51E+08	3,39E+07	1,63E+07	1,18E+07	2,40E+06	9,00E+06	1,58E+07	2,20E+07	98,4	79,0	50,8	34,9

cont. tabela 4.2

72	1,30E+08	2,78E+07	7,40E+06	2,80E+06	1,20E+06	1,17E+07	2,12E+07	3,05E+07	99,1	70,4	25,9	8,4
96	1,29E+08	2,38E+07	4,50E+06	1,52E+06	7,80E+06	1,31E+07	2,51E+07	3,27E+07	94,3	64,5	15,2	4,4
144	1,29E+08	2,21E+07	1,70E+06	0,00E+00	1,04E+07	1,54E+07	2,99E+07	3,34E+07	92,5	58,9	5,4	0,0
168	1,01E+08	2,35E+07	1,50E+06	0,00E+00	1,71E+07	1,37E+07	2,96E+07	3,34E+07	85,5	63,2	4,8	0,0
192	8,30E+07	2,03E+07	0,00E+00	0,00E+00	3,68E+07	1,58E+07	3,18E+07	3,34E+07	69,3	56,2	0,0	0,0
240	5,00E+07	1,69E+07	0,00E+00	0,00E+00	7,72E+07	2,32E+07	3,18E+07	3,34E+07	39,3	42,1	0,0	0,0
312	1,00E+07	7,20E+06	0,00E+00	0,00E+00	1,48E+08	2,82E+07	3,18E+07	3,34E+07	6,3	20,3	0,0	0,0

Tabela 4.3 : Morte celular na presença de etanol a 34 °C.

TEMPO (h)	Número de Células Viáveis				Número de Células Mortas				Viabilidade			
	65 g/l	80 g/l	95 g/l	110 g/l	65 g/l	80 g/l	95 g/l	110 g/l	65 g/l	80 g/l	95 g/l	110 g/l
0	2,27E+07	2,22E+07	2,17E+07	2,13E+07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	100,0	100,0	100,0	100,0
8	--	--	2,79E+07	2,07E+07	--	--	3,00E+05	1,20E+06	--	--	98,9	94,5
24	6,12E+07	2,54E+07	1,60E+07	1,37E+07	3,30E+06	1,80E+06	8,10E+06	7,10E+06	94,9	93,4	66,4	65,9
48	6,18E+07	1,20E+07	5,20E+06	3,50E+06	4,20E+06	8,80E+06	1,90E+07	1,96E+07	93,6	57,7	21,5	15,2
72	6,33E+07	7,60E+06	2,20E+06	1,10E+06	8,10E+06	2,04E+07	3,05E+07	2,52E+07	88,7	27,1	6,7	4,2
96	7,20E+07	4,00E+06	1,10E+06	0,00E+00	1,23E+07	2,40E+07	2,72E+07	3,13E+07	85,4	14,3	3,9	0,0
144	4,14E+07	0,00E+00	2,00E+05	0,00E+00	2,68E+07	2,82E+07	2,77E+07	--	60,7	0,0	0,7	--
168	3,48E+07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	5,06E+07	--	2,77E+07	--	40,7	--	0,0	--
192	7,60E+06	--	--	--	5,16E+07	--	--	--	12,8	--	--	--
216	1,70E+06	--	--	--	7,78E+07	--	--	--	2,1	--	--	--

Tabela 4.4 : Morte celular na presença de etanol a 37 °C.

TEMPO (h)	Número de Células Viáveis				Número de Células Mortas				Viabilidade			
	65 g/l	80 g/l	95 g/l	110 g/l	65 g/l	80 g/l	95 g/l	110 g/l	65 g/l	80 g/l	95 g/l	110 g/l
0	1,56E+07	1,52E+07	1,49E+07	1,46E+07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	100,0	100,0	100,0	100,0
1,5	--	--	--	1,43E+07	--	--	--	6,00E+05	--	--	--	96,0
3,25	--	--	--	1,65E+07	--	--	--	9,00E+05	--	--	--	94,8
4,25	--	--	--	1,30E+07	--	--	--	3,00E+06	--	--	--	81,3
4,75	--	--	--	1,44E+07	--	--	--	4,90E+06	--	--	--	74,6
6,5	--	--	--	1,03E+07	--	--	--	3,80E+06	--	--	--	73,0
7	--	--	--	6,40E+06	--	--	--	6,80E+06	--	--	--	48,5
7,5	--	--	1,52E+07	6,30E+06	--	--	9,00E+05	6,60E+06	--	--	94,4	48,8
8,5	--	--	--	4,90E+06	--	--	--	7,40E+06	--	--	--	39,8
9,33	--	--	1,29E+07	--	--	--	2,00E+06	--	--	--	86,6	--
9,5	--	--	--	4,10E+06	--	--	--	1,18E+07	--	--	--	25,8
11,75	--	--	--	1,50E+06	--	--	--	1,41E+07	--	--	--	9,6
15	--	--	9,00E+06	--	--	--	7,20E+06	--	--	--	55,6	--
24	1,76E+07	1,20E+07	3,60E+06	--	1,70E+06	6,50E+06	1,41E+07	--	91,2	64,9	20,3	--
30	--	8,30E+06	2,40E+06	--	--	7,50E+06	1,21E+07	--	--	52,5	16,6	--
48	5,10E+06	2,80E+06	9,00E+05	--	1,43E+07	1,38E+07	1,52E+07	--	26,3	16,9	5,6	--
72	--	1,40E+06	1,00E+05	--	--	1,96E+07	1,55E+07	--	--	6,7	0,6	--
75	1,40E+06	--	--	--	1,72E+07	--	--	--	7,5	--	--	--

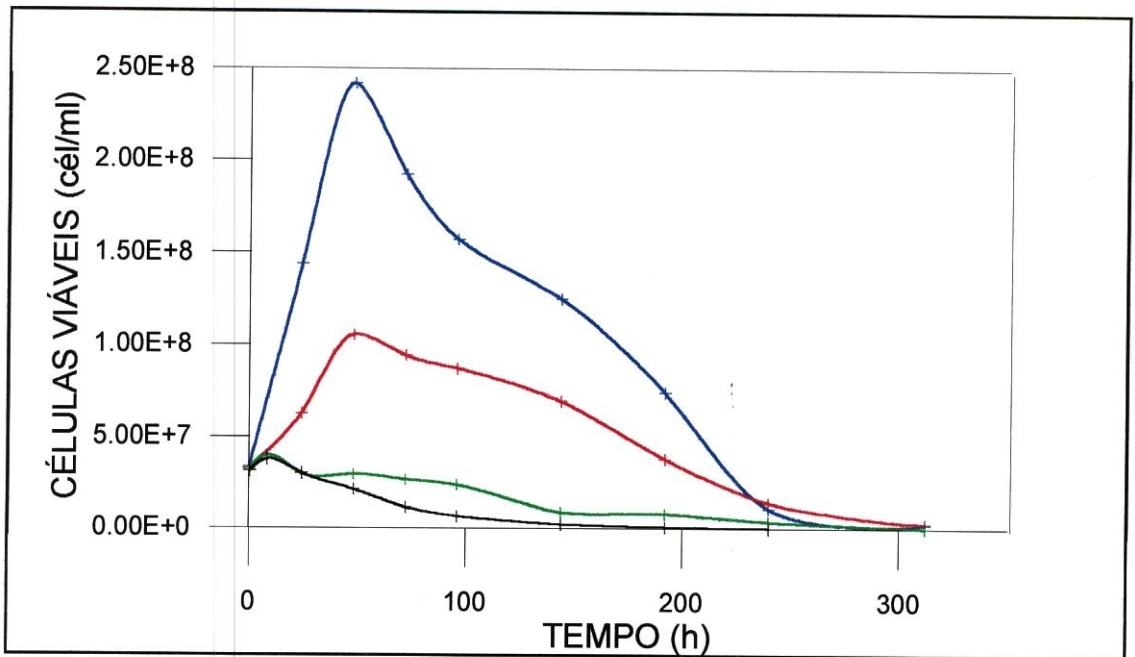


Figura 4.1 : Número de células viáveis a 28^oC. (● 65 g etanol/l, ● 80 g etanol/l, ● 95 g etanol/l, ● 110 g etanol/l).

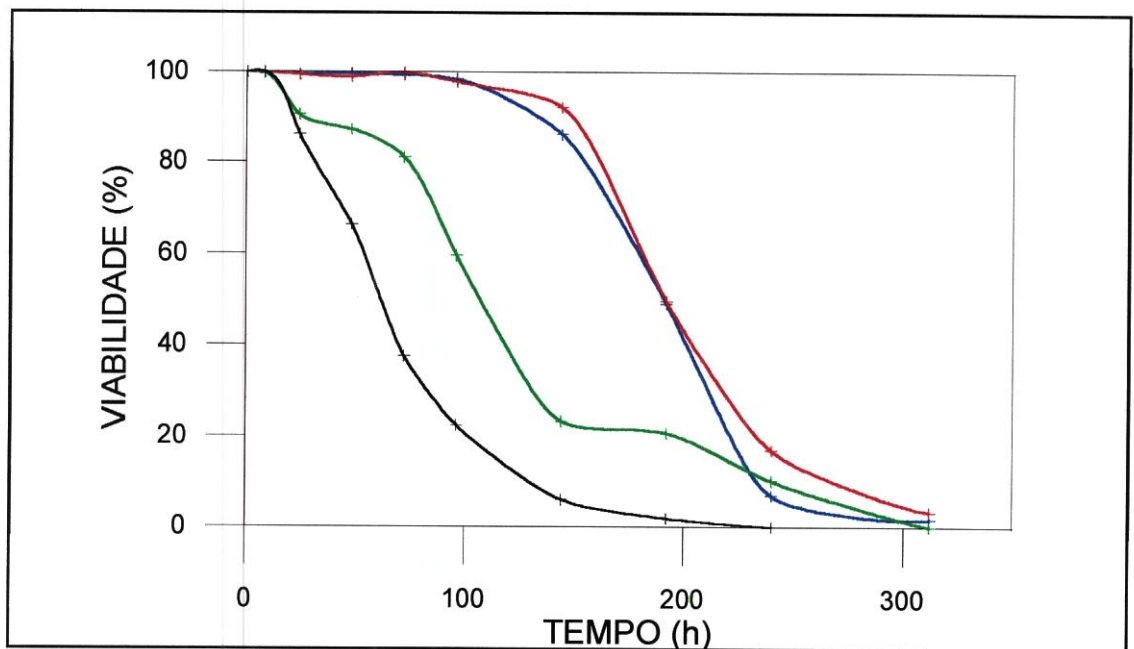


Figura 4.2 : Viabilidade a 28^oC. (● 65 g etanol/l, ● 80 g etanol/l, ● 95 g etanol/l, ● 110 g etanol/l).

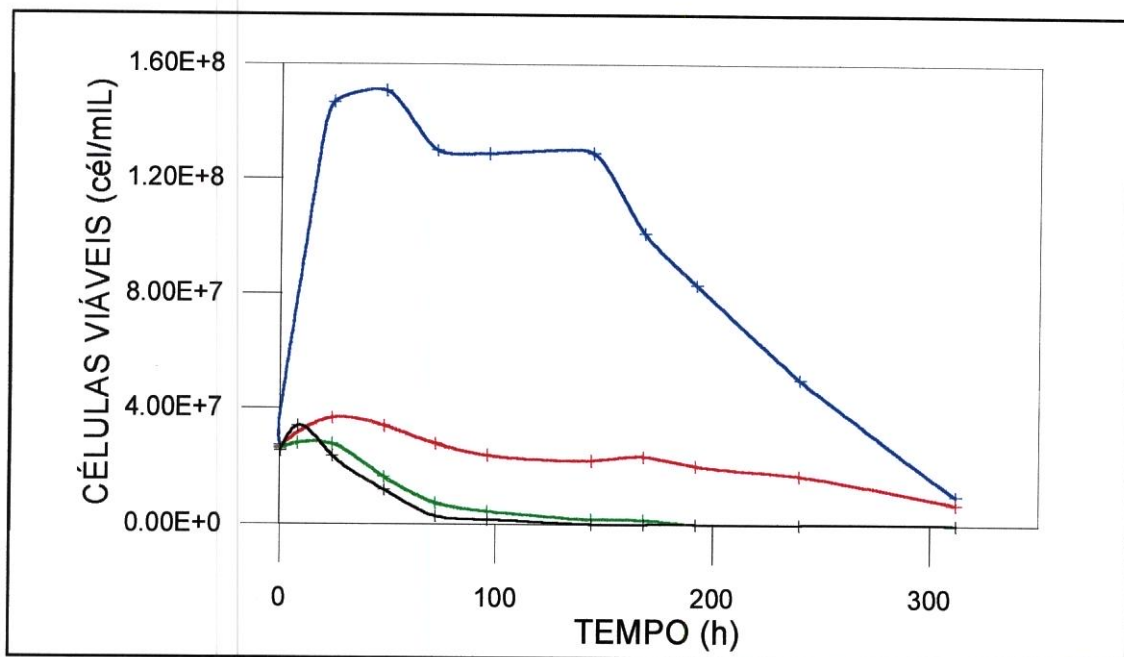


Figura 4.3 : Número de células viáveis a 31^oC. (● 65 g etanol/l, ● 80 g etanol/l, ● 95 g etanol/l, ● 110 g etanol/l).

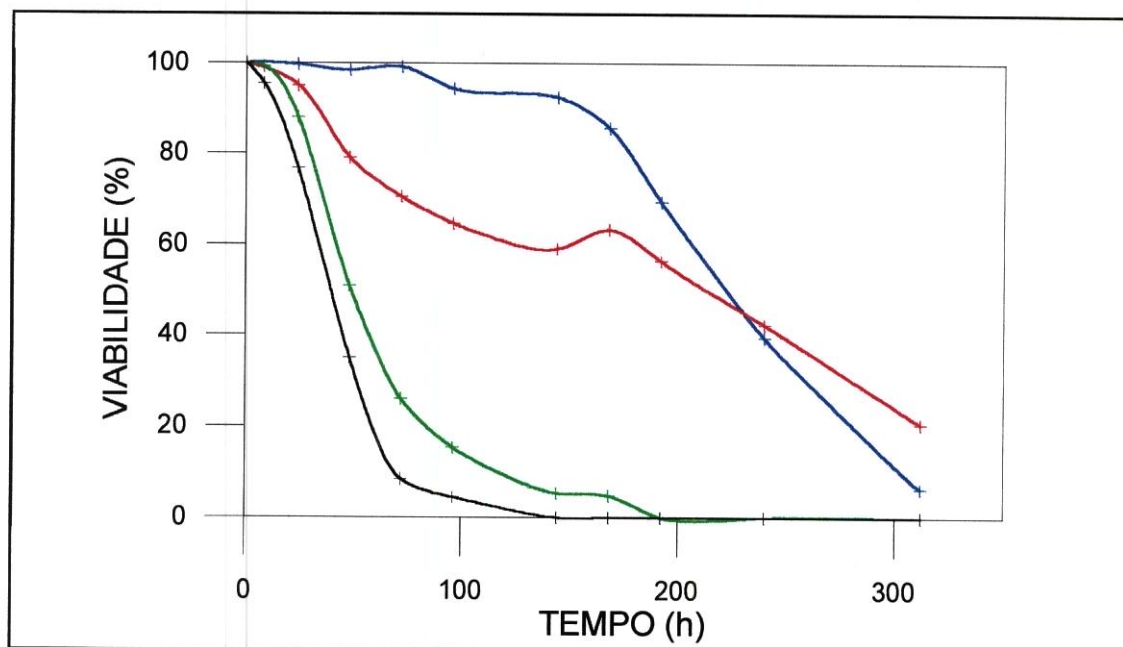


Figura 4.4 : Viabilidade a 31^oC. (● 65 g etanol/l, ● 80 g etanol/l, ● 95 g etanol/l, ● 110 g etanol/l).

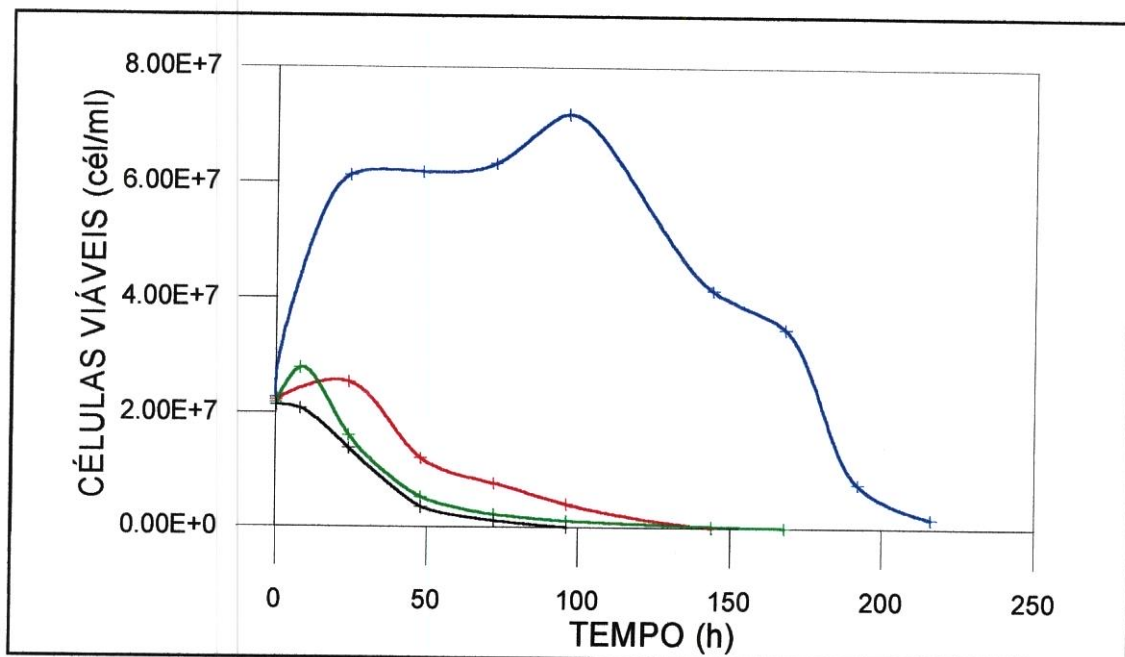


Figura 4.5 : Número de células viáveis a 34^oC. (● 65 g etanol/l, ● 80 g etanol/l, ● 95 g etanol/l, ● 110 g etanol/l).

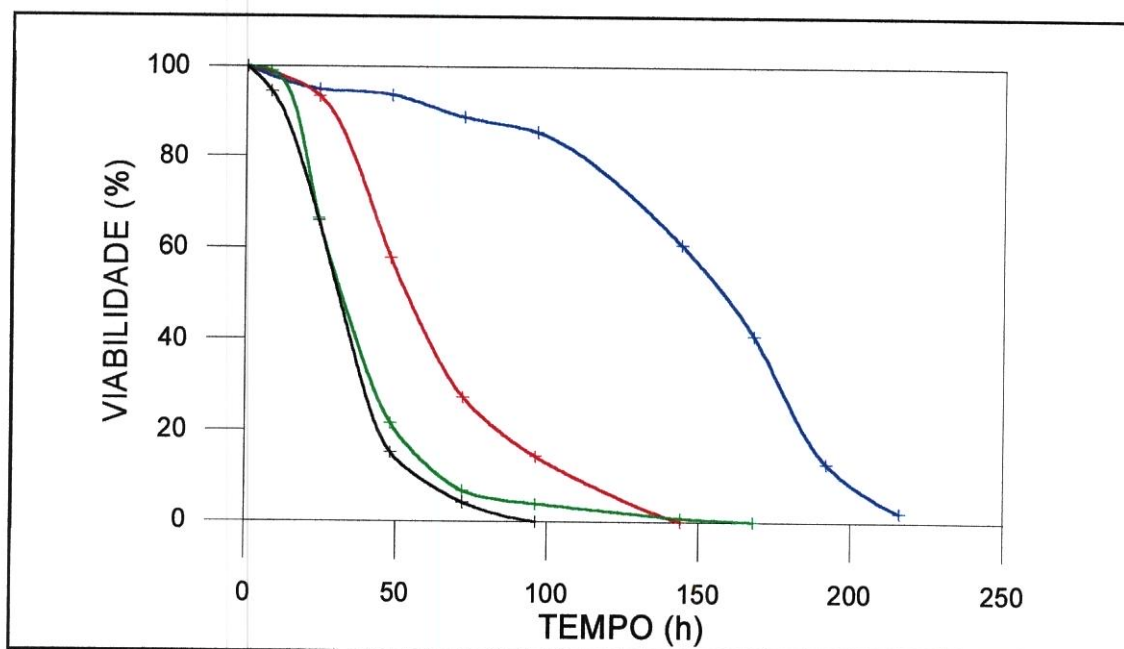


Figura 4.6 : Viabilidade a 34^oC. (● 65 g etanol/l, ● 80 g etanol/l, ● 95 g etanol/l, ● 110 g etanol/l).

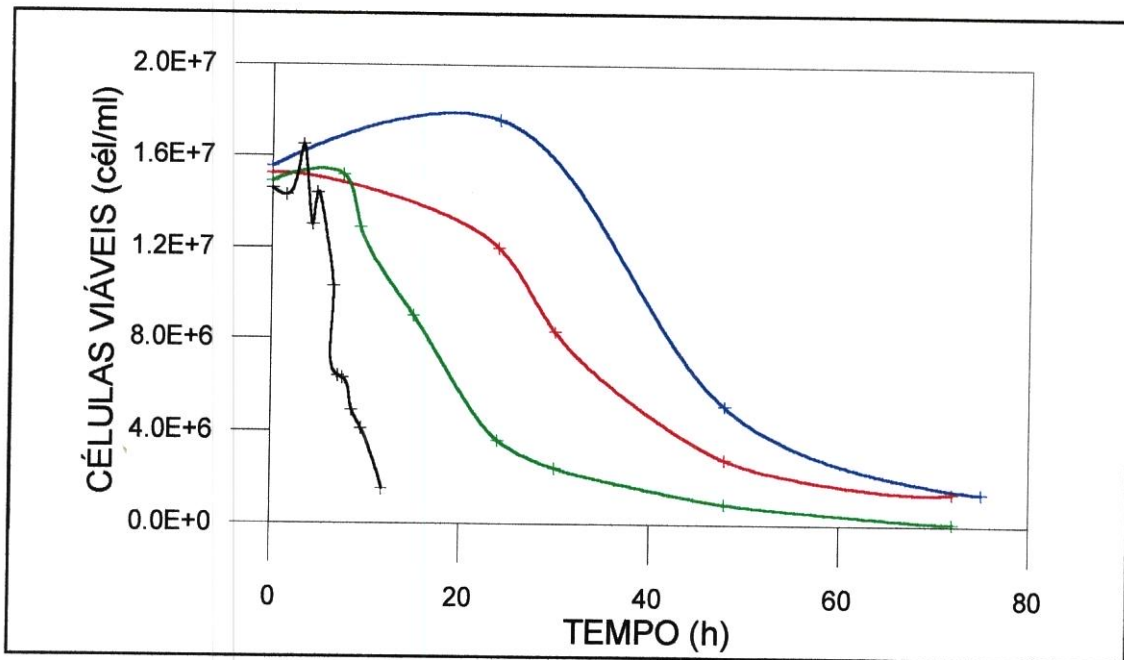


Figura 4.7 : Número de células viáveis a 37°C. (● 65 g etanol/l, ● 80 g etanol/l, ● 95 g etanol/l, ● 110 g etanol/l).

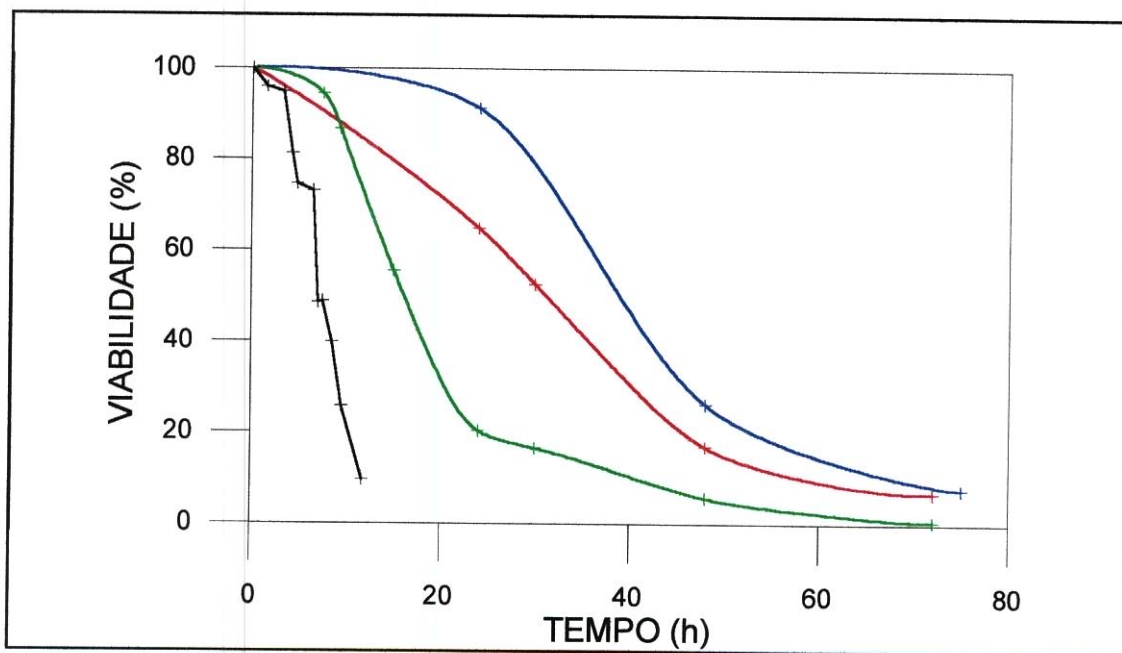


Figura 4.8 : Viabilidade a 37°C. (● 65 g etanol/l, ● 80 g etanol/l, ● 95 g etanol/l, ● 110 g etanol/l).

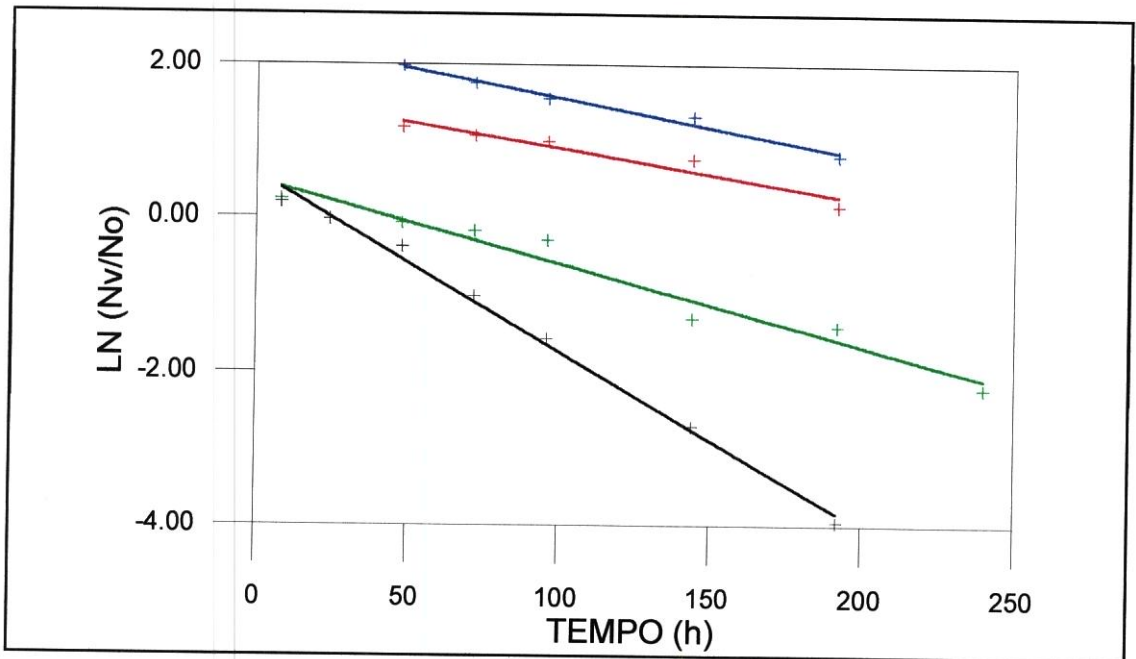


Figura 4.9 : LN (N_v/N_0) a 28°C (● 65 g etanol/l, ● 80 g etanol/l, ● 95 g etanol/l, ● 110 g etanol/l).

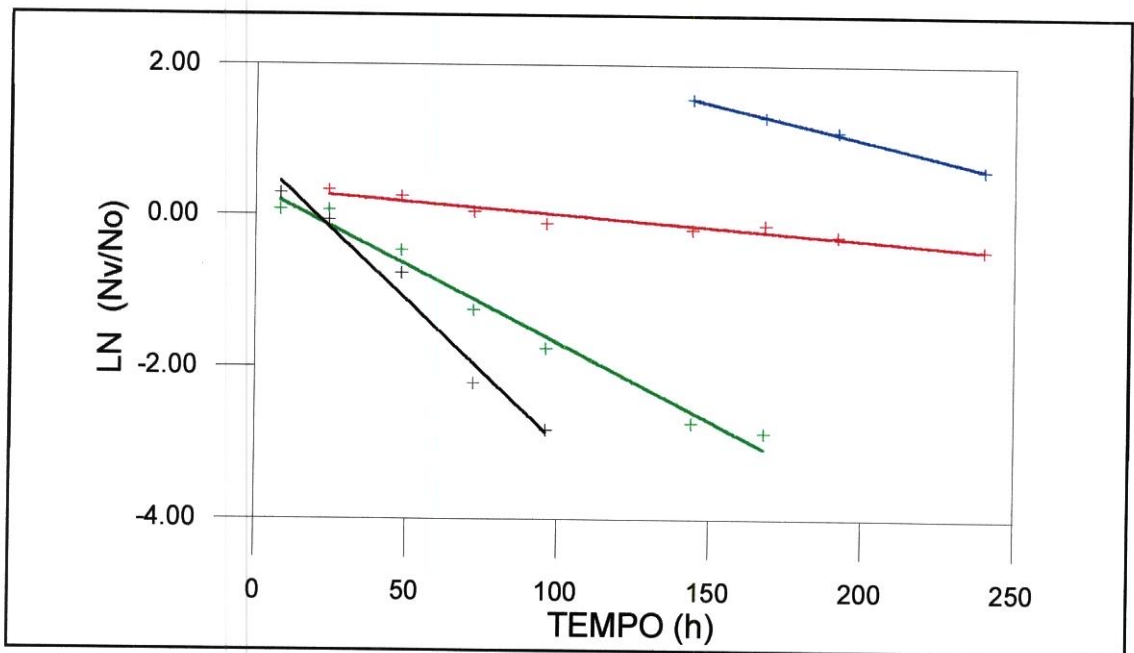


Figura 4.10 : LN (N_v/N_0) a 31°C (● 65 g etanol/l, ● 80 g etanol/l, ● 95 g etanol/l, ● 110 g etanol/l).

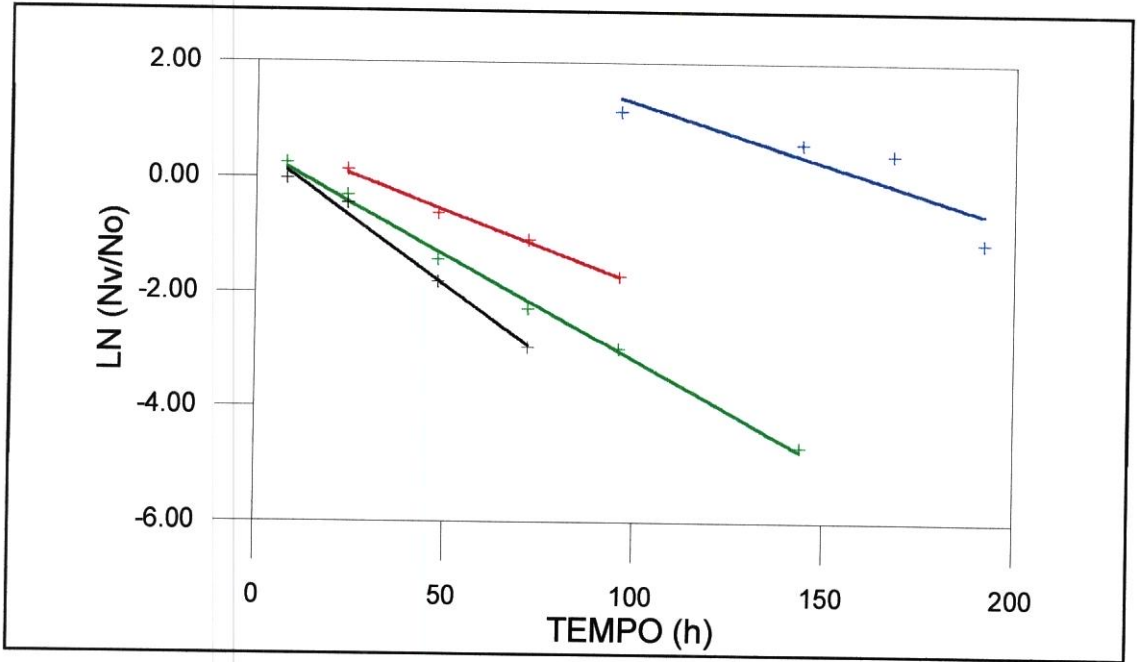


Figura 4.11 : LN (N_v/N_0) a 34 °C (● 65 g etanol/l, ● 80 g etanol/l, ● 95 g etanol/l, ● 110 g etanol/l).

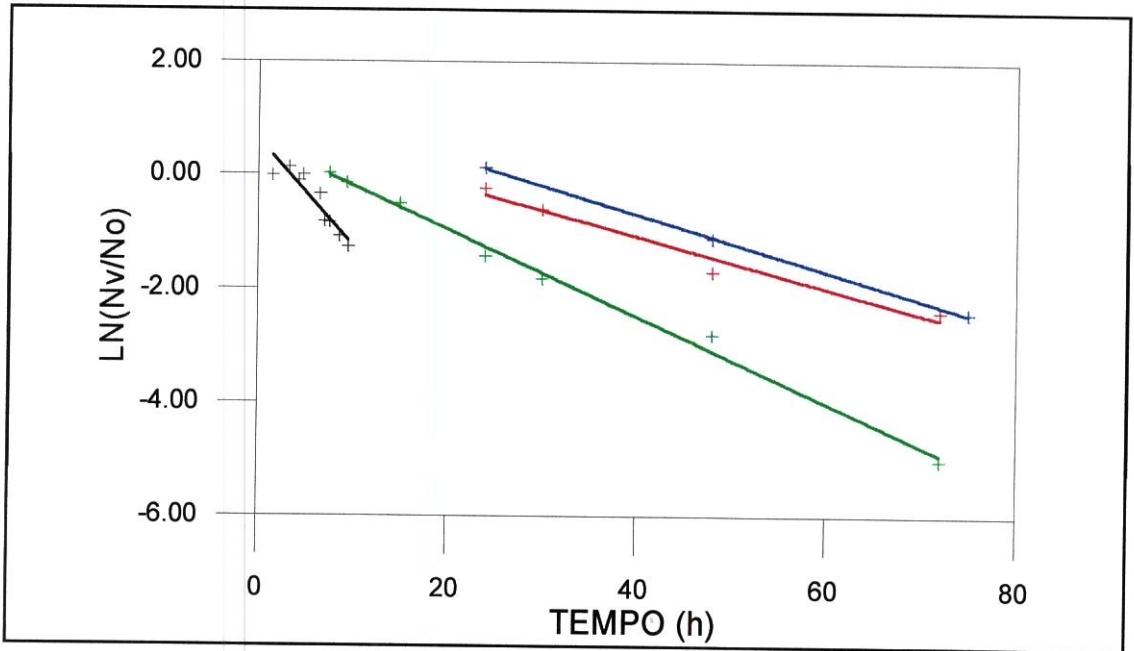


Figura 4.12: LN (N_v/N_0) a 37 °C (● 65 g etanol/l, ● 80 g etanol/l, ● 95 g etanol/l, ● 110 g etanol/l).

Tabela 4.5 : Constante de morte K_d (h^{-1}) em função da temperatura e conc. de etanol.

T(°C)	65 g/l	80 g/l	95 g/l	110 g/l
28,0	0,0077 (r=0,981)	0,0067 (r=0,926)	0,0105 (r=0,956)	0,0228 (r=0,994)
31,0	0,0098 (r=0,998)	0,0032 (r=0,915)	0,0203 (r=0,979)	0,0375 (r=0,975)
34,0	0,0206 (r=0,776)	0,0250 (r=0,992)	0,0363 (r=0,996)	0,0475 (r=0,988)
37,0	0,0495 (r=0,999)	0,0450 (r=0,967)	0,0757 (r=0,993)	0,1855 (r=0,854)

seguinte, de queda no número de células viáveis. O mesmo não é observado a altas concentrações de etanol, onde não houve crescimento celular inicial. Este fato também foi observado em experimento realizado por NOVAK, STREHAIANO, MORENO e GOMA (1981) e é indicativo da maior toxidez do etanol produzido intracelularmente ao etanol adicionado ao meio fermentativo.

A figura 4.13 representa a curva de K_d (T,P) versus $1/T$ (em K). Observa-se que as retas obtidas são paralelas pois teoricamente E_1 é somente função da temperatura e independe da concentração de etanol. O mesmo foi observado por DALE, CHEN e OKOS (1990). A tabela 4.6 reúne os valores dos coeficientes lineares e angulares obtidos da figura 4.13. A partir dos dados dos coeficientes lineares, obteve-se o valor médio da energia de ativação E_1 de 39666 cal/mol.

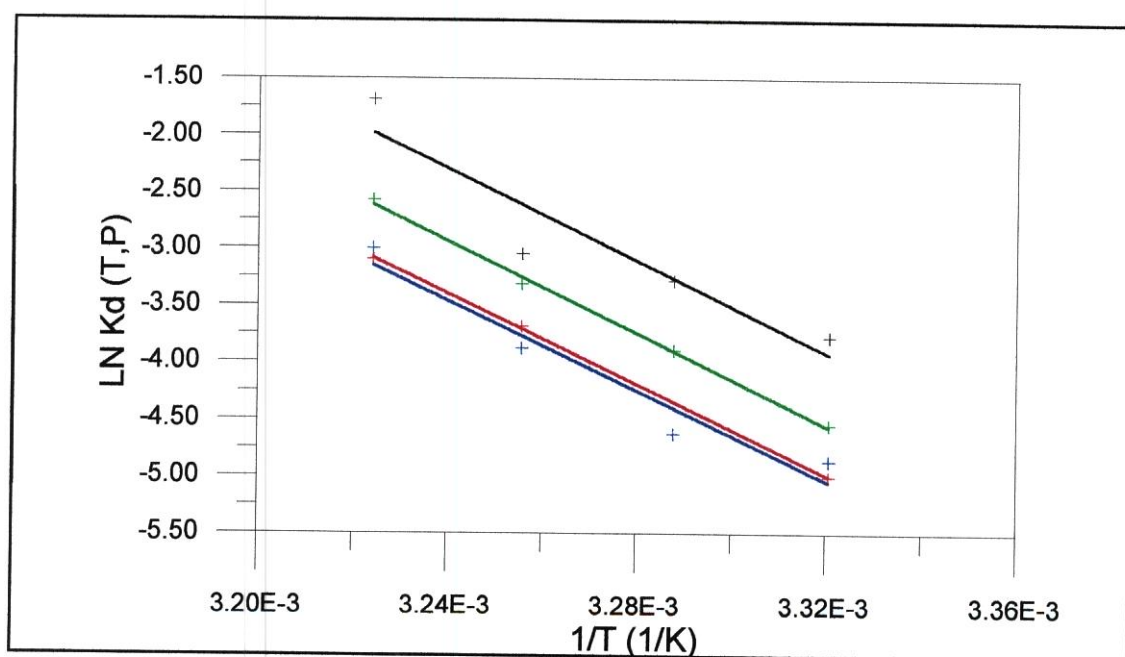


Figura 4.13 : Determinação da energia de ativação E_1 e dos coeficientes lineares α (● 65 g etanol/l, ● 80 g etanol/l, ● 95 g etanol/l, ● 110 g etanol/l).

Tabela 4.6 : Coeficientes angulares (E_1/R), lineares (α) e de regressão.

etanol (g/l)	E_1/R	$\alpha = \text{LN}A_1 + K_{dp}P$	coef. regressão
65	19635	60,1564	$r=0,945$
80	19793	60,7325	$r=0,999$
95	20176	62,4327	$r=0,997$
110	20247	63,3021	$r=0,878$

Finalmente, os valores de $\alpha = \text{LN} A_1 + K_{dp}P$ foram plotados contra a concentração de etanol “P” na figura 4.14, obtendo-se como coeficiente angular o valor de $K_{dp} = 0,07425 \text{ m}^3 / \text{Kg}$ e como coeficiente linear o valor de 55,1592 para $\ln A_1$ ($r=0,967$), onde obtém-se $A_1 = 9,0227 \times 10^{23}$. DALE, CHEN e OKOS (1990) trabalhando com *Kluyveromyces fragilis* obtiveram valores de $1,41 \times 10^{60}$ para A_1 , 88200 cal/mol para E_1 e $0,049 \text{ m}^3/\text{Kg}$ para K_{dp} , caracterizando uma queda acelerada na viabilidade e fortemente influenciada pela temperatura. Para o caso em estudo percebe-se uma maior contribuição do termo de inibição pelo etanol (equação 34) para a taxa de morte celular.

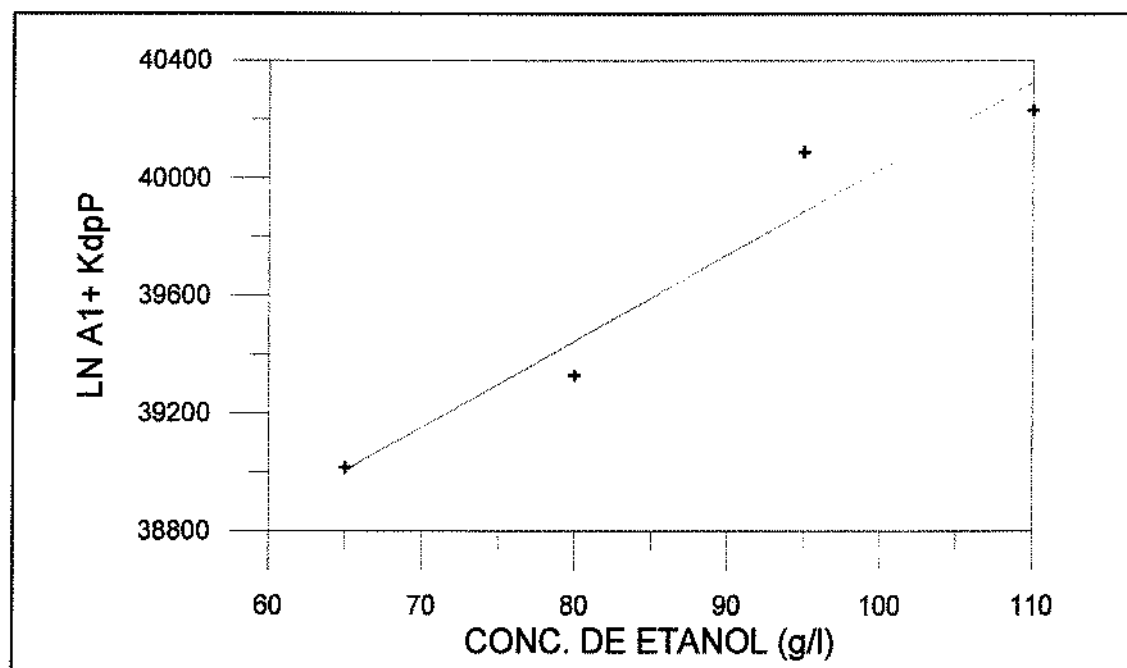


Figura 4.14 : Determinação dos parâmetros A_1 e K_{dp} .

Em resumo :

$$A_1 = 9,00227 \times 10^{23}$$

$$E_1 = 39666,5 \text{ cal / mol}$$

$$K_{dp} = 0,07425 \text{ m}^3 / \text{Kg}$$

Incorporando-se as equações 32 e 33 na equação 31, e substituindo-se os valores encontrados, obtém-se :

$$\frac{N_v}{N_0} = \exp \left\{ \left[-9,00227 \cdot 10^{23} \cdot \exp \left(\frac{-39666}{R.T} \right) \cdot \exp (0,07425.P) \right] \cdot t \right\} \quad (66)$$

A equação 66 prediz a queda do número de células viáveis em função do tempo, da concentração de etanol e da temperatura. As figuras 4.15 a 4.18 fazem uma comparação entre os dados práticos e os obtidos pela equação 66. Observa-se uma diferença entre os pontos experimentais e as curvas de decaimento da viabilidade, notadamente para valores a baixas concentrações de etanol, onde houve crescimento celular inicial, e um melhor ajuste para valores a altas concentrações de etanol. Entretanto, há um deslocamento geral das curvas em relação aos pontos experimentais, provavelmente pelo tipo de ajuste utilizado, que despreza o tempo inicial de estabilidade e somente inclui a fase de decaimento do número de células viáveis em função do tempo.

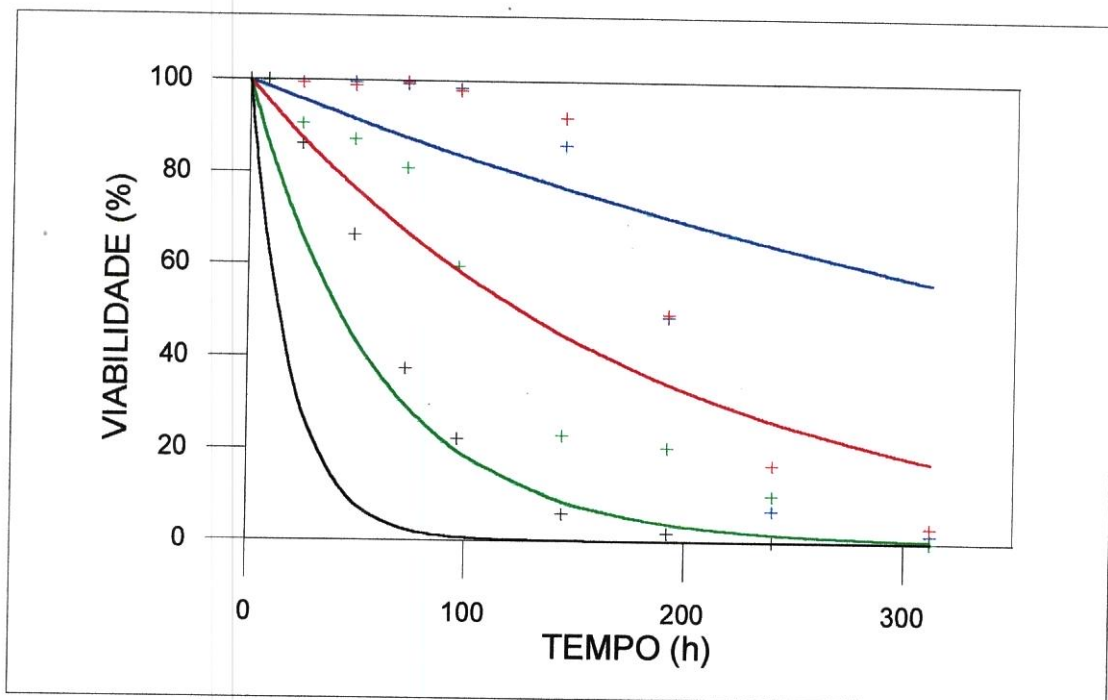


Figura 4.15 : Comparação entre os dados de viabilidade calculados pelo modelo proposto (linha contínua) e os obtidos experimentalmente (pontos) a 28^oC (● 65 g etanol/l, ● 80 g etanol/l, ● 95 g etanol/l, ● 110 g etanol/l).

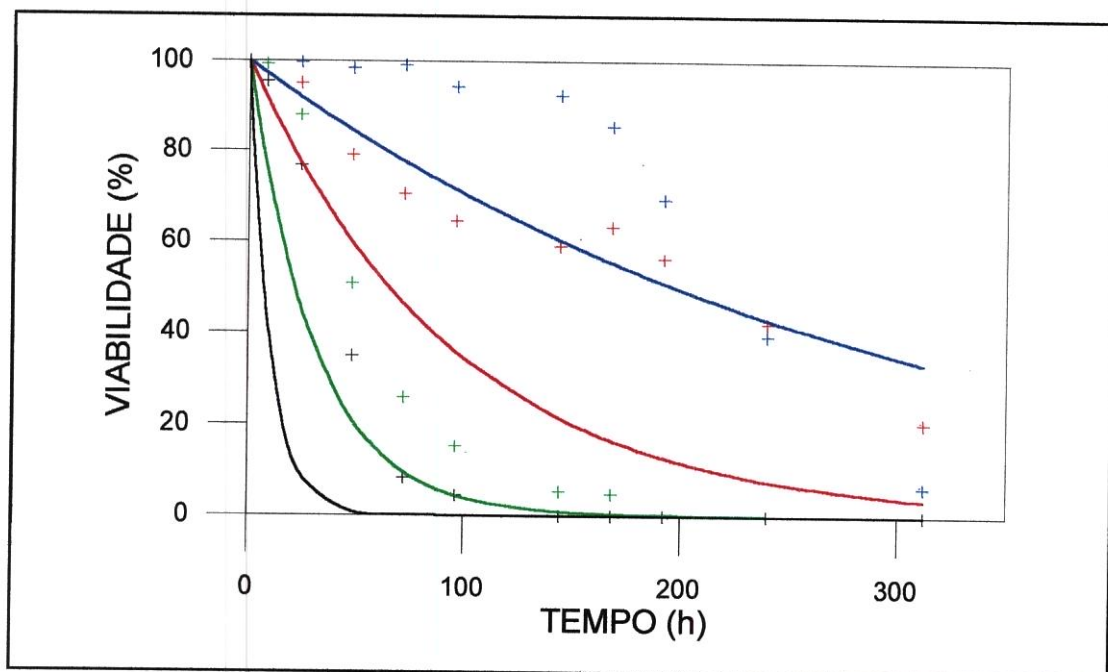


Figura 4.16 : Comparação entre os dados de viabilidade calculados pelo modelo proposto (linha contínua) e os obtidos experimentalmente (pontos) a 31^oC (● 65 g etanol/l, ● 80 g etanol/l, ● 95 g etanol/l, ● 110 g etanol/l).

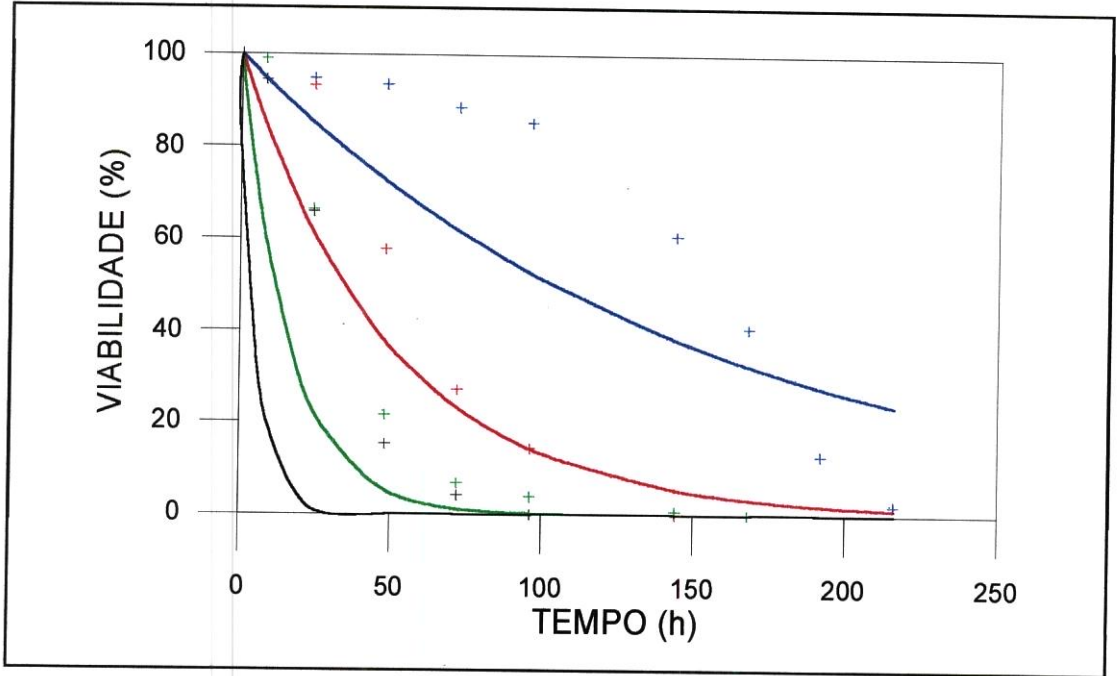


Figura 4.17 : Comparação entre os dados de viabilidade calculados pelo modelo proposto (linha contínua) e os obtidos experimentalmente (pontos) a 34^oC (● 65 g etanol/l, ● 80 g etanol/l, ● 95 g etanol/l, ● 110 g etanol/l).

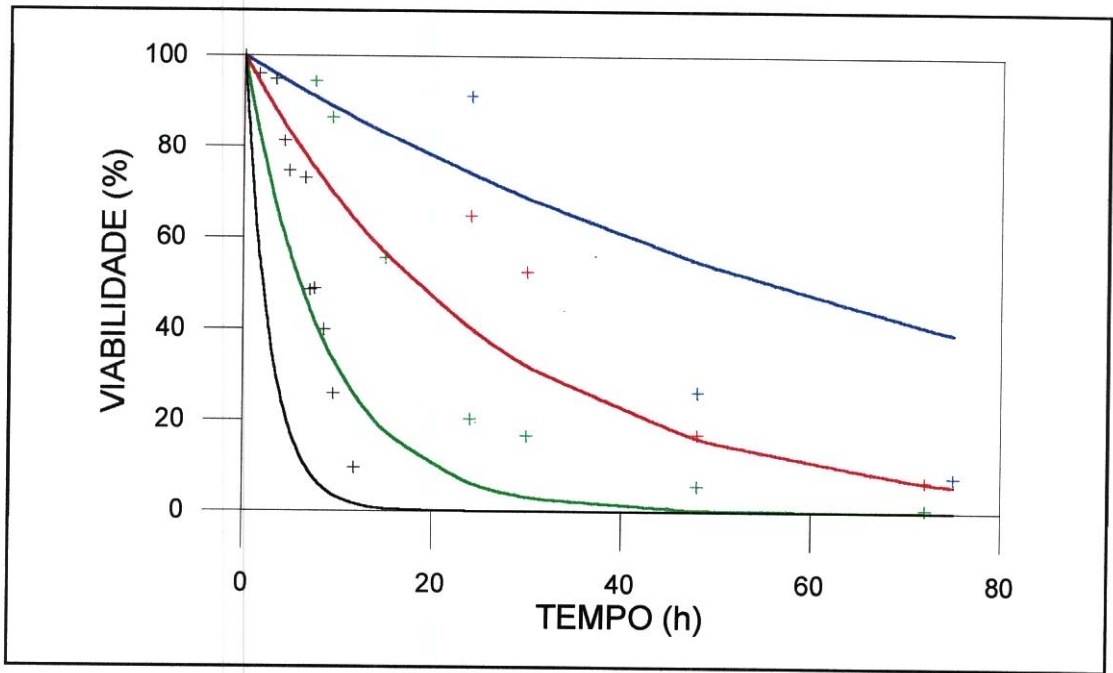


Figura 4.18 : Comparação entre os dados de viabilidade calculados pelo modelo proposto (linha contínua) e os obtidos experimentalmente (pontos) a 37^oC (● 65 g etanol/l, ● 80 g etanol/l, ● 95 g etanol/l, ● 110 g etanol/l).

4.2 - FERMENTAÇÃO CONTÍNUA COM RECICLO DE CÉLULAS :

4.2.1 - Desempenho do conjunto microfiltro/fermentador :

De uma maneira geral o conjunto montado para a realização dos experimentos de fermentação contínua com reciclo de células, consistindo de um elemento filtrante inorgânico e do fermentador, teve a eficiência esperada. NISHIZAWA (1984) trabalhou com uma vazão de circulação de 600 l/h e taxa de filtração de 7 l/h.m², mas não relatou o tempo total de operação. No experimento conduzido no laboratório por maior tempo, a 28^oC (figuras 4.19 e 4.20), conseguiu-se operar o conjunto a uma concentração celular média de 50 g/l por 1500 horas ininterruptamente, e com uma vazão de permeado média de 0,133 l/h em uma área filtrante de 371,6 cm², obtendo-se uma taxa de filtração de 3,6 l/h.m². Neste período de tempo foi necessário apenas uma inversão do elemento filtrante, para lavagem do mesmo, com 1200 horas de uso. CHANG, LEE e KIM (1993) reportaram que operaram com sucesso por 120 horas consecutivas a uma concentração celular média de 55 g/l. Os resultados obtidos sugerem que a vazão de circulação utilizada de 850 l/h foi suficiente para promover um equilíbrio entre a deposição superficial de partículas e sua remoção por turbilhonamento.

Operacionalmente, devido ao tempo prolongado do experimento, alguns problemas aconteceram:

1. com 400 horas de operação ocorreu uma falha no sensor de espuma, causando descarga excessiva do mesmo. Pode-se observar na figura 4.20 uma queda na viabilidade celular neste período e um aumento na concentração de etanol.
2. com 770 horas de operação houve aquecimento do meio fermentativo para 34^oC, resolvido com o acoplamento de um banho termostático à camisa de resfriamento do reator.
3. com 940 horas de operação, durante o período noturno, ocorreu uma excessiva formação de espuma não controlada pela adição de anti-espumante, devido a elevação na véspera da vazão de alimentação. Houve transbordamento do meio pela exaustão de gás, provocando perda de biomassa. Procurou-se restabelecer o nível anterior com a diminuição da vazão de alimentação e parada na purga.

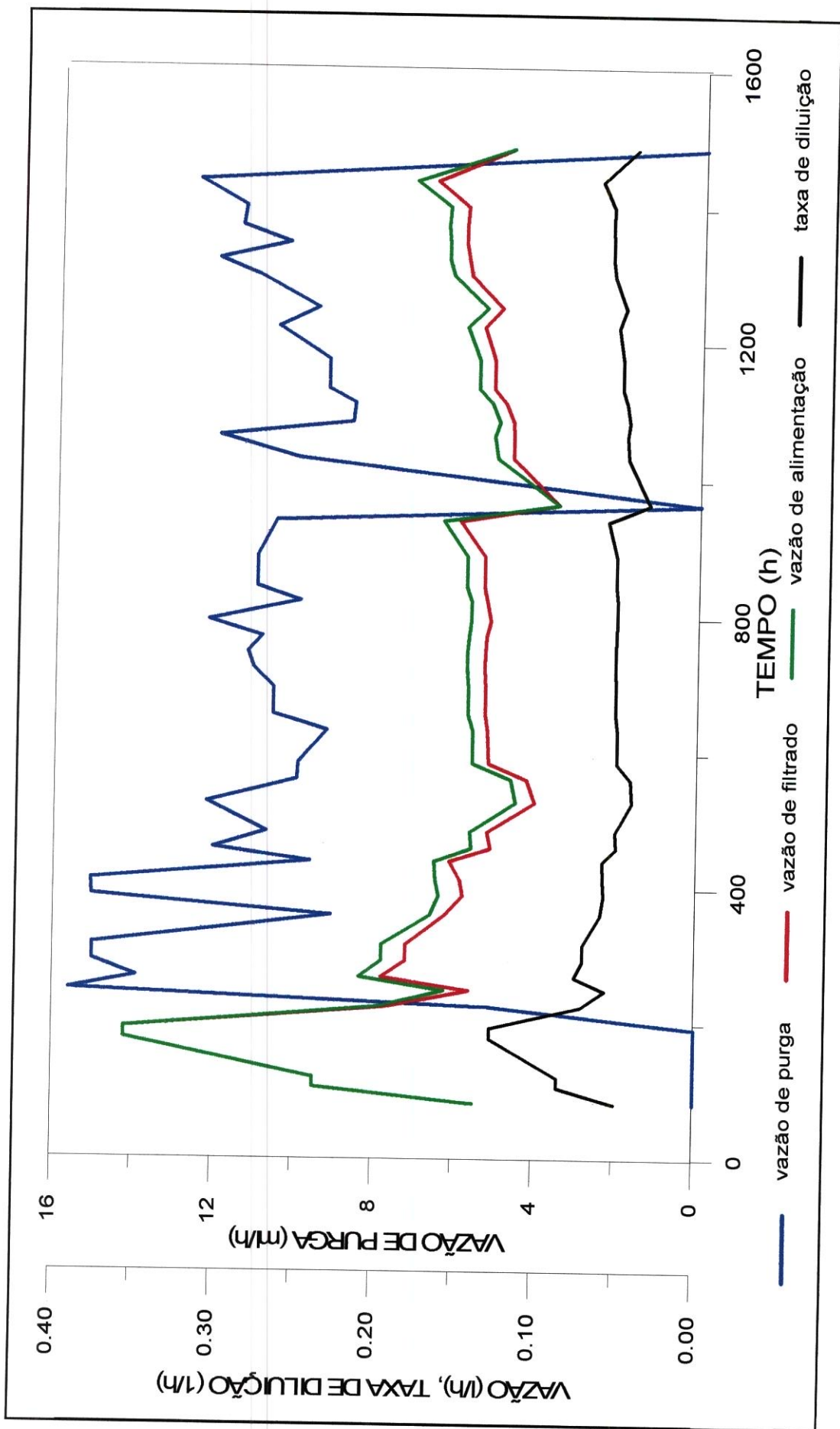


Figura 4.19 : Evolução das variáveis operacionais durante a fermentação contínua com reciclo de células a 28°C.

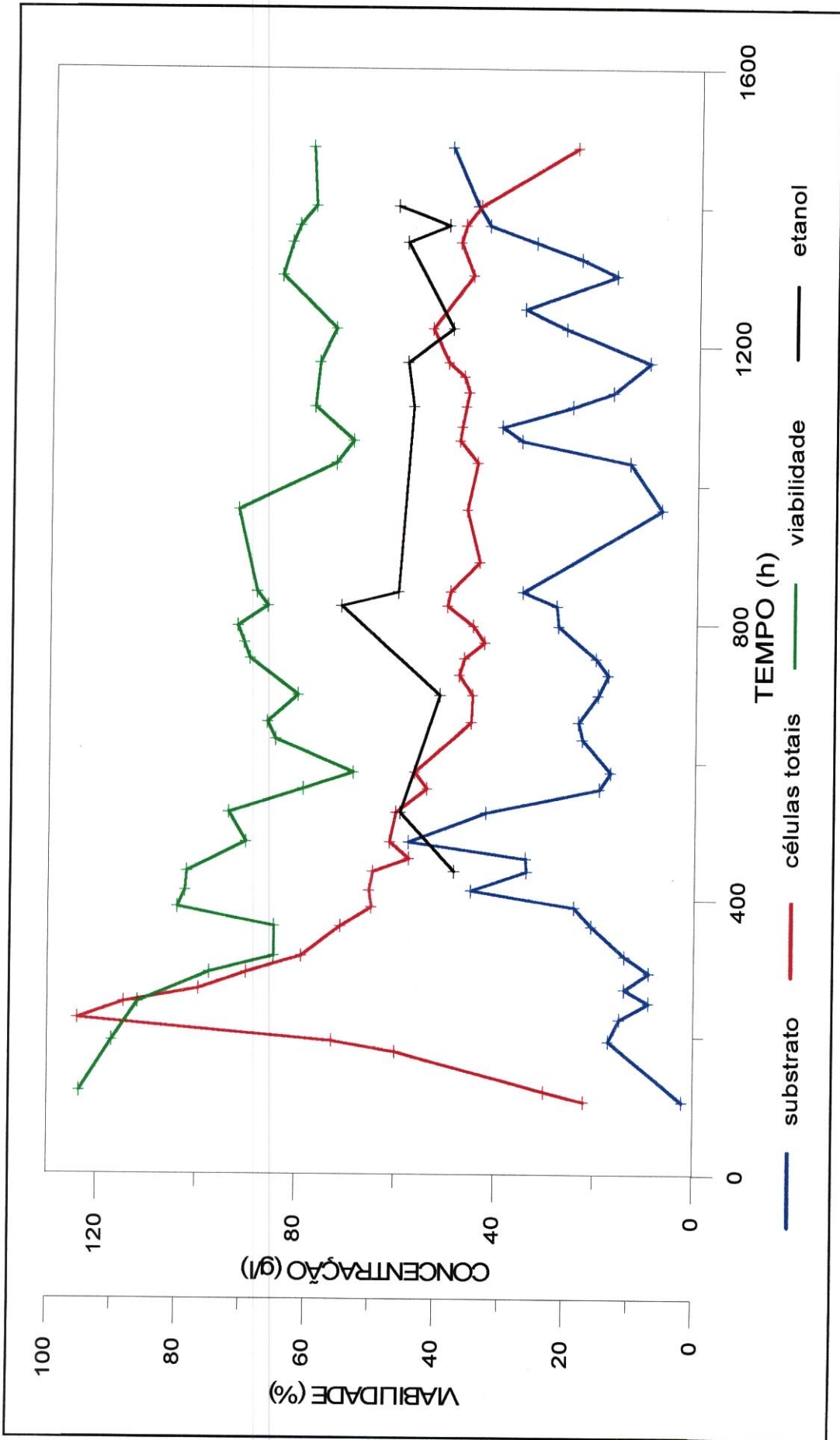


Figura 4.20 : Evolução das variáveis de estado durante a fermentação contínua com reciclo de células a 28°C.

4. a partir de 1400 horas de operação até a interrupção do experimento, com 1500 horas, notou-se um colapso do sistema com a incidência de curto circuito no sensor de anti-espumante, travamento no sensor de nível e excesso de material incrustado.

Apesar dos problemas ocorridos, principalmente com relação a formação de espuma, incrustações em partes móveis dentro do fermentador e quedas de energia elétrica, pode-se afirmar que o sistema trabalhou de forma eficiente por 1500 horas. Espera-se que com alguns reparos e pequenos ajustes, seja possível manter o sistema por períodos prolongados sem problemas, e talvez assim o regime permanente possa ser atingido.

4.2.2 - Regime estacionário em fermentação contínua com reciclo de células :

A idéia original do trabalho era a de se estabelecer diversos patamares de regimes estacionários, para cada uma das temperaturas dentro da faixa estudada de 28 a 40°C, através da manipulação conveniente das variáveis operacionais B e D, que definem a taxa de purga do sistema. Através do equilíbrio formado entre a taxa de crescimento menos a de morte e a taxa de purga (equação 65), o sistema estaria teoricamente estável. Porém, o observado na prática foi uma instabilidade generalizada das variáveis de estado (Xt, Xv, S e P), como já discutido no item anterior.

$$\mu - K_d = B \cdot D \quad (65)$$

Inicialmente alguns experimentos foram montados para a checagem da eficiência do equipamento e verificação da resposta às variações impostas ao meio fermentativo, com a finalidade de se afinar a metodologia a ser aplicada nos experimentos definitivos. Estes consumiram 45 dias.

A primeira temperatura a ser estudada foi de 28°C. A idéia original de estado estacionário auto-regulável, conforme PIRT (1975), foi-se dissipando ao longo das 1500 horas de fermentação (figuras 4.19 e 4.20). A enorme dificuldade em se manter estável o sistema, principalmente a concentração de substrato e a viabilidade, prolongaram demasiadamente o teste sem um resultado satisfatório. Assim, somado a problemas operacionais, o trabalho de fermentação contínua com

reciclo de células, inicialmente previsto para uma faixa de temperatura de 28 a 40 °C, limitou-se a primeira temperatura de 28°C.

Particularmente, para o experimento realizado, observou-se um aumento inicial da biomassa até um máximo de 124 g/l nas primeiras 200 horas (figura 4.20), antes do início da purga, e uma queda acentuada na viabilidade de 95 % para 65 % neste período, fato este de acordo com trabalho de LAFFORGUE et alii (1987) e indicativo da inibição causada pelo aumento da biomassa. Mesmo com a redução na concentração de biomassa, devido ao início da purga com 230 horas, a viabilidade celular continuava com tendência de queda. Quatro hipóteses foram levantadas :

1. carência de nutrientes,
2. falta de oxigênio no meio,
3. acúmulo de material particulado no sistema e
4. acúmulo de subprodutos inibidores.

A utilização de melão enriquecido com cloreto de amônia e fosfato ácido de potássio no meio de alimentação, além do extrato de levedura, foi iniciada com 320 horas de operação. Inicialmente observou-se (figura 4.20) uma elevação na viabilidade de 65 % para 80 %, porém, após este período, a tendência de queda gradual continuou a ser verificada, chegando a um mínimo de 53 % com 1060 horas.

A adição de pequena quantidade de oxigênio no meio não foi avaliada devido a já grande quantidade de espuma presente e a tentativa de simular a realidade de uma destilaria, que opera de forma anoeróbia. Entretanto, CYSEWSKI e WILKE (1977), CHANG, LEE e KIM (1993), LEE e CHANG (1987) e LAFFORGUE et alii (1987) utilizaram injeção de ar na faixa de 0,1 VVM para manter a viabilidade celular. Estudo futuro deve ser conduzido no sentido de se determinar qual a relação entre a produtividade de etanol e a vazão de oxigênio adicionada ao meio de fermentação, em comparação com dados encontrados na literatura.

Notou-se no decorrer do experimento o acúmulo gradual de material particulado no interior do volume do conjunto fermentador/microfiltro. A origem provável deste material está no sólido (lama) em suspensão formada durante a esterilização do melão. Mesmo deixando-se este decantar

por 12 horas e reduzindo-se o tubo de sucção, notou-se um aumento prejudicial deste material, citado por CHANG, YOO e KIM (1994) como nocivo a boa condução de processos fermentativos à altas densidades. Também o acúmulo de pedaços de parede celular, rompidas principalmente devido a alta tensão de cisalhamento provocada pela bomba de deslocamento positivo utilizada na circulação do meio, pode ser fonte de material particulado no sistema. A utilização de concentrações elevadas de açúcares (180 g/l) na alimentação, tendo como consequência taxas reduzidas de diluição e de purga, pode ter beneficiado o acúmulo de produtos inibidores no meio fermentativo. Experimentos com taxas de diluição maiores e tempos de retenção celular menores devem ser avaliados para melhor elucidação desta variável.

No decorrer da fermentação contínua a 28°C, observou-se uma grande oscilação na concentração de açúcares redutores totais, como a ocorrida a partir das 220 horas de operação (figura 4.20), onde percebe-se uma queda na concentração de células totais e elevação da concentração de substrato até o tempo de 460 horas. Também a partir de 960 horas nota-se uma grande flutuação nos resultados, com queda na viabilidade e elevação na concentração de substrato até 1110 horas, seguido de um aumento na viabilidade e um decréscimo na concentração de substrato até 1190 horas e assim sucessivamente até o final do experimento com 1500 horas. Entretanto, algumas flutuações não apresentaram coerência, como a ocorrida na faixa de 700 a 850 horas, onde, para uma vazão de alimentação de substrato fixa em 0,140 l/h, houve um incremento na viabilidade, na concentração de açúcares redutores totais e na concentração de etanol.

Os resultados obtidos para a análise de açúcares redutores totais via DNS (vide item 3.3.1) apresentaram dúvidas. Suspeita-se que a presença de certas substâncias, acumuladas no meio de fermentação durante o decorrer do experimento ou presentes no melaço, possam ter alterado os resultados finais do método colorimétrico utilizado. Observaram-se resultados de concentração de açúcares baixos somente no início da operação, quando a concentração de substâncias coloidais ainda é baixa, e resultados não inferiores a 10 g/l durante o experimento. LEE e CHANG (1987) e CHANG, LEE e KIM (1993) trabalhando com meio artificial e altas concentrações celulares, freqüentemente atingiram concentrações zero de substrato em seus trabalhos. Técnicas mais modernas e eficientes da análise da concentração de açúcares redutores, como análise potenciométrica e HPLC, devem ser avaliadas para uso futuro. Principalmente para esta última, a

correta escolha da coluna cromatográfica, eluentes e demais parâmetros, podem indicar inclusive a acumulação de outras substâncias no meio fermentado.

O número de variáveis não mensuráveis que influenciam uma fermentação alcoólica com reciclo de células é elevado. O estado estacionário em uma planta piloto contínua, como a utilizada nesta tese, com ajustes manuais das variáveis operacionais (vazão de purga e de permeado), é de difícil obtenção devido à extensão de tempo necessária para se atingir o objetivo. A abordagem em regime transiente e a introdução de sensores em linha para concentração celular e substrato, interligados a controladores das bombas de permeado e de purga, podem ser soluções viáveis para a continuidade deste trabalho.

4.2.3 - Análise dos parâmetros obtidos a 28°C :

Analisando-se as figuras 4.19 e 4.20, percebe-se um período de maior estabilidade na faixa de tempo de operação entre 650 e 1350 horas. Desprezando-se os valores obtidos no tempo de 960 horas, onde ocorreram problemas de transbordamento devido ao excesso de espuma, as tabelas 4.7 e 4.8 indicam os resultados médios obtidos para as variáveis operacionais e de estado, respectivamente. Com base no esquema proposto na figura 3.9 e nas equações 53 a 64, obteve-se os parâmetros tabelados em 4.9.

Medições de pH foram realizadas periodicamente, situando-se na faixa de 4,2-4,4. A concentração de açúcares redutores totais na alimentação foi fixada em 180 g/l. Neste intervalo de

Tabela 4.7 : Variáveis operacionais obtidas a 28°C.

vazão de purga - (BF)	0,0103 l/h
vazão de permeado - (1-B)F	0,133 l/h
vazão de alimentação - F	0,143 l/h
razão de purga - B	0,0717
taxa de diluição - D	0,0511 h ⁻¹
tempo de retenção celular - τ_c	11,3 dias

Tabela 4.8 : Variáveis de estado obtidas a 28^oC.

concentração de substrato - S	22,3 g/l
concentração de células totais - X _t	47,8 g/l
viabilidade - V	63 %
concentração de células viáveis - X _v	30,1 g/l
concentração de células não viáveis - X _d	17,7 g/l
concentração de etanol - P	58,1 g/l

Tabela 4.9 : Parâmetros calculados a 28^oC.

rendimento celular por etanol produzido - Y _{x/p}	0,0590
rendimento celular por substrato consumido - Y _{x/s}	0,0218
rendimento etanol por substrato consumido - Y _{p/s}	0,369
constante de morte - K _d	0,00215 h ⁻¹
taxa específica de crescimento - μ	0,00582 h ⁻¹
produtividade - Prod.	2,97 g/l.h

tempo conseguiu-se um relativo equilíbrio na concentração de células operando-se com taxas de diluição e razão de purga reduzidos, quando comparados aos experimentos de LEE e CHANG (1987) e CHANG, LEE e KIM (1993), ambos trabalhando a 30^oC. Especialmente os valores obtidos por LEE e CHANG (1987) para concentrações celulares e concentrações de etanol próximos à 45 g/l e 40 g/l respectivamente, tabelados em 2.4, demonstram valores de μ cerca de 36 vezes maior ao obtido no experimento realizado de fermentação alcoólica contínua com reciclo de células.

Durante a condução do trabalho, várias tentativas de incremento na taxa de diluição e na razão de purga realizadas resultaram em elevação na concentração de substrato e na diminuição na concentração de células, indicando uma estabilidade para o valor da taxa específica de crescimento

(equação 65) para o sistema em discussão. Os valores reduzidos obtidos para μ não se explicam pelo fato de ter-se operado em uma temperatura sub-ótima. ALVES (1996), trabalhando com a mesma cepa utilizada nesta tese e baixas concentrações de etanol, obteve resultados de $0,399 \text{ h}^{-1}$ para $\mu_{\text{máx}}$ a 32°C e $0,342 \text{ h}^{-1}$ a 28°C , demonstrando uma diminuição de apenas 14,2 % em relação a temperatura ótima.

Como reflexo dos valores baixos obtidos para B e D, os demais parâmetros calculados pelas equações 61 a 64 e tabelados em 4.9 ficaram abaixo do esperado, quando comparados com os resultados obtidos por diversos autores e tabelados em 2.1 e 2.3. Particularmente, o resultado de $Y_{P/S}$ de 0,369 foi 72,2 % do teórico de 0,511 (OURA, 1974), enquanto que em demais experimentos com reciclo de células este se situa na faixa de 84-92 % do teórico. Também a produtividade de $2,97 \text{ g/l.h}$ foi cerca de 10 vezes inferior ao normalmente obtido em experimentos de fermentação alcoólica com reciclo de células.

MELZUCH et alii (1991) cita que concentrações de substrato na alimentação acima de 180 g/l causam significativo efeito de inibição pelo substrato e etanol. KHORAKIWALA (1985) enfatiza que a acumulação de certos subprodutos inibitórios, durante a operação prolongada com reciclo de células, são prejudiciais ao bom funcionamento deste sistema e sua retirada se faz necessária. Assim, conforme discutido anteriormente, pode-se presumir que o meio natural de melaço utilizado, diluído a 180 g ART/l , associado a alta eficiência do equipamento de filtração, pode ter causado acúmulo gradativo de material particulado proveniente do melaço e também de células mortas, inibindo a fermentação. Como consequência, obteve-se baixas velocidades específicas de crescimento e elevados tempos de retenção celular e, portanto, produtividades reduzidas. Apenas a realização de novos experimentos poderão trazer maiores informações a fim de elucidar completamente as hipóteses por hora discutidas.

5 - CONCLUSÕES :

A metodologia empregada no estudo de determinação da taxa de morte celular previa a adição de etanol ao meio de fermentação. Entretanto, foi possível verificar uma aceleração na taxa de morte nos experimentos onde houve crescimento celular, sugerindo uma maior toxidez do etanol produzido e acumulado pela célula em seu interior, em relação ao etanol adicionado ao meio fermentativo. Observou-se também que a energia de ativação E_1 , conforme o modelo proposto, é função somente da temperatura e independe da concentração de etanol. Em resumo, as constantes obtidas foram :

$$A_1 = 9,00227 \times 10^{23}$$

$$E_1 = 39666,5 \text{ cal / mol}$$

$$K_{dp} = 0,07425 \text{ m}^3 / \text{Kg}$$

Substituindo-se no modelo proposto, obteve-se :

$$\frac{N_v}{N_0} = \exp \left\{ \left[-9,00227 \cdot 10^{23} \cdot \exp \left(\frac{-39666}{R \cdot T} \right) \cdot \exp (0,07425 \cdot P) \right] \cdot t \right\}$$

A equação obtida para a taxa de morte celular em função da temperatura, concentração de etanol e tempo, prediz o decaimento do número de células viáveis de *Saccharomyces cerevisiae* e pode ser útil no estudo do comportamento dinâmico em biorreatores industriais utilizados em fermentação alcoólica.

O equipamento montado para o estudo de fermentação alcoólica com reciclo de células, utilizando membrana inorgânica externa, operou de forma eficiente por 1500 horas consecutivas, demonstrando ser adequado ao objetivo proposto. A idéia original de se trabalhar em regime estacionário não se verificou no decorrer do experimento, limitando este a primeira temperatura de 28°C.

Os dados obtidos para o período de tempo de maior estabilidade no experimento a 28°C, entre 650 e 1300 horas, mostram valores abaixo do esperado. O rendimento de etanol por substrato consumido de 0,369 e a produtividade de 2,97 g/l.h são inferiores quando comparados aos dados de literatura para experimentos semelhantes. Provavelmente, a utilização de melaço diluído a 180 g ART/l e não filtrado pode ter causado um acúmulo de produtos inibidores, prejudicando o desenvolvimento do processo de fermentação.

A fermentação alcoólica com altas densidades celulares obtidas por reciclo de células é uma técnica promissora na busca por uma melhor produtividade em unidades industriais, visto ser possível obter, através da correta manipulação das correntes envolvidas, a manutenção de concentrações elevadas e praticamente constantes de células viáveis ao longo de uma safra, facilitando controles e otimizando a produção de etanol por volume de biorreator. Porém, problemas operacionais como os encontrados neste trabalho, devem ser melhores estudados e minimizados, para que os objetivos propostos sejam atingidos.

6 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS :

Para o estudo da taxa de morte celular, sugere-se:

- mudar a abordagem, avaliando-se a influência da concentração de etanol produzido na taxa de morte celular, em função do tempo.

Para a continuidade do trabalho de fermentação alcoólica com reciclo de células, sugere-se:

- adaptação de sensores para substrato e células, interligados às bombas de purga e permeado, visando melhorar a estabilidade do sistema.
- utilização de pequenas quantidades de oxigênio para manutenção da viabilidade celular.
- alteração no método de análise de açúcares redutores totais, provavelmente utilizando HPLC.
- utilização de concentrações menores de substrato na alimentação e, como consequência, taxas de diluição maiores.
- filtração do melaço esterelizado ou, para efeito comparativo, a utilização de meio artificial.
- a abordagem em regime transiente, sem purga celular do sistema.

E, no geral :

- a simulação e ajuste dos dados obtidos com processos industriais.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS :

1. AIBA, S.; SHODA, M.; NAGATAMI, M. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. Biootechnol. Bioeng. , 10 : 845-864, 1968.
2. AIBA, S.; SHODA, M. Reassessment of the product inhibition in alcohol fermentation. J. ferment. technol., 47: 790-794, 1969.
3. ANDRIETTA, S. R.; STUPIELLO, J. P. Simulação e modelagem para processos de fermentação alcoólica. (II). Contínua. Stab. Açúcar, Álcool e Subprodutos, 9: 45-51, 1990.
4. ALVES, J. G. L. F. Estudo da influência da temperatura na cinética de crescimento anaeróbio de *Saccharomyces cerevisiae*. Tese de Mestrado, UNICAMP, 1996.
5. ANDRIETTA, S. R. Modelagem, Simulação e Controle de Fermentação Alcoólica Contínua em Escala Industrial. Tese de Doutorado, UNICAMP, 1994.
6. BAJPAI, P.; MARGARITIS, A. The effects of temperature and pH on ethanol production by free and immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus* grown on Jerusalem artichoke extract. Biohecnol. Bioeng. , 30: 306-313, 1987.
7. BAYLEY, J. E.; OLLIS, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals. 2a ed. N. York, McGraw-Hill, 1986.
8. BAZUA, C. D.; WILKE, C. R. Ethanol effects on the kinetics of a continuous fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. Biohecnol. Bioeng. Symp., 7: 105-118, 1977.
9. BERTELLI, L. G. Dezesesseis anos de Proálcool. Stab. Açúcar, álcool e sub-produtos, 11 (1): 19-20, 1992.
10. BONOMI, A.; ABOUTBOUL, H.; SCHIMITELL, W. Simulation of the continuous fermentation of manioc hydrolisate. Biohecnol. Bioeng. Symp., 11: 333-357, 1981.

11. CHANG, H. N.; LEE, W. G.; KIM, B. S. Cell retention culture with an internal filter module: Continuous ethanol fermentation. Biotechnol. Bioeng., 41: 677-681, 1993.
12. CHANG, H. N.; YOO, I.; KIM, B. High density cell culture by membrane-based cell recycle. Biotech. Adv., 12: 467-487, 1994.
13. CLETO, P. Alcool. Química e Derivados, 30 (11): 38-42, 1995.
14. CYSEWSKY, G. R. ; WILKE, C. R. Rapid ethanol fermentation using vacuum and cell recycle. Biotechnol. Bioeng., 19: 1125-1143, 1977.
15. CYSEWSKY, G. R. ; WILKE, C. R. Process design and economic studies of alternative methods for the production of ethanol. Biotechnol. Bioeng., 20: 1421-1444, 1978.
16. DALE, M. C.; CHEN, C.; OKOS, M. R. Cell growth and death rates as factors in the long-term performance, modeling, and design of immobilized cell reactors. Biotechnol. Bioeng., 36: 983-992, 1990.
17. DEFRISE, D.; GEKAS, V. Microfiltration membranes and the problem of microbial adhesion. Process Biochemistry, 8: 105-116, 1988.
18. DOURADO, A.; GOMA, G.; ALBUQUERQUE, U.; SEVELLI, Y. Modelling and static optimization of ethanol production in a cascade reactor. I. Modeling. Biotechnol. Bioeng., 29: 187-194, 1987.
19. DREWS, W. A. A fermentação do melão de cana-de-açúcar no Brasil. In: Simpósio de fermentação, São Paulo, 1964. Anais. p. 213-222.
20. FINGUERUT, J.; CÉSAR, A. R. P.; LEINER, K. H.; VAZ ROSSEL, C. E. Fermentação contínua em múltiplos estágios. Stab. Açúcar, Alcool e Suprodutos, 10 (3): 41-42, 1992.

21. FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Levantamento sistemático da produção agrícola, Rio de Janeiro, 7 (12), 1995.
22. FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Levantamento sistemático da produção agrícola, Rio de Janeiro, 8 (6), 1996.
23. GAO, C.; FLEET, G. H. The effects of temperature and pH on the ethanol of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. Journal of Applied Bacteriology, 65: 405-409, 1988.
24. GHOSE, T. K.; TYAGI, R. D. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysisate I. Batch versus continuous systems. Biotechnol. Bioeng., 21: 1387-1400, 1979.
25. GHOSE, T. K. ; TYAGI, R. D. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysisate II. product and substrate inhibition and optimization of fermentor design. Biotechnol. Bioeng., 21: 1401-1420, 1979.
26. GUERREIRO, M. A. Desenvolvimento de um sistema especialista para o projeto de unidades industriais de produção de álcool. Tese de Mestrado, UNICAMP, 1995
27. HUANG, S. Y. ; CHEN, J. C. Analysis of the kinetics of ethanol fermentation with *Zymomonas mobilis* considering temperature effect. Enzyme Microb. Technol., 10: 431- 439, 1988.
28. JARZEBSKI, A. B.; MALINOWSKI, J. J.; GOMA, G. Modeling of ethanol fermentation at high yeast concentration. Biotechnol. Bioeng., 34: 1225-1230, 1989.
29. KHORAKIWALA, K. H.; CHERYAN, M.; MEHAIA, M. A. Ethanol production in a membrane recycle bioreactor. Comparison of the performance of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Bioeng. Symp., 15: 249-261, 1985.

30. LAFFORGUE, C.; MALINOWSKI, J. J.; GOMA, G. High yeast concentration in continuous fermentation with cell recycle obtained by tangential microfiltration. Biotechnol. Letters, 9: 347-352, 1987.
31. LEÃO, C. ; VAN UDEN, N. Effects of ethanol and other alkanols on the kinetics and the activation parameters of thermal death in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol. Bioeng., 24: 1581-1590, 1982.
32. LEE, J. M.; POLLARD, J. F.; COULMAN, G. A. Ethanol fermentation with cell recycling: computer simulation. Biotechnol. Bioeng., 25: 497-511, 1983.
33. LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid determination of yeast viability. Biotechnol. Bioeng. Symp., 11: 641-649, 1981.
34. LEE, C. W. ; CHANG, H. N. Kinetics of ethanol fermentation in membrane cell recycle fermentors. Biotechnol. Bioeng., 29: 1105-1142, 1987.
35. LEVENSPIEL, O. Monod equation: a revised and a generalization to product inhibition situations. Biotechnol. Bioeng., 22: 1671-1687, 1980.
36. LUONG, J. H. T. Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. Biotechnol. Bioeng., 27: 280-285, 1985.
37. MAGALHÃES, J. P. O., KUPERMAN, N., MACHADO, R. C. Proálcool: Uma Avaliação Global, 2a. ed., Rio de Janeiro, 1991.
38. MAIORELLA, B. L., BLANCH, H. W., WILKE, C. R. Economic evaluation of alternative ethanol fermentation processes. Biotechnol. Bioeng., 26: 1003-1025, 1984.
39. MATSUMOTO, K.; KAWAHARA, M.; OHYA, H. Cross-flow filtration of yeast by microporous ceramic with backwashing. J. Ferment. Technol., 66: 199-205, 1988.

40. MEHAIA, M. A.; CHERYAN, M. Fermentation of date extracts to ethanol and vinegar in batch and continuous membrane reactors. Enzyme Microbiol. Technol., 13: 257-261, 1991.
41. MELZOCH, K.; RYCHTERA, M.; MARKVICHOV, N. S.; POSPICALOVA, V.; BASAROVA, G. Application of a membrane recycle bioreactor for ethanol production. Appl. Microbiol. Biotechnol., 34: 469-472, 1991.
42. MILLER, G. L. Use of dynitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chem., 31: 426-28, 1959.
43. MOHR, P. H.; KRAVIEC, S. Temperature characteristics and Arrhenius plots for nominal psychrophiles, mesophiles and thermophiles. J. Gen. Microb., 121: 311-317, 1980.
44. MONBOUQUETTE, H. G. Models for high cell density bioreactors must consider biomass volume fraction: cell recycle example. Biotechnol. Bioeng., 29: 1075-1080, 1987.
45. MONBOUQUETTE, H. G. High-biomass-density cell recycle fermentors. Biotechnol. Bioeng., 39: 498-503, 1992.
46. MOULIN, G.; BOZE, H.; GALZY, P. Inhibition of alcoholic fermentation by substrate and ethanol. Biohecnol. Bioeng., 22: 2375-2381, 1980.
47. NAGODAWITHANA, T. W. ; STEINKRAUS, K. H. , Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in "rapid fermentation". Appl. Environ. Microbiol., 31: 156-162, 1976.
48. NISHIZAWA, Y.; MITANI, Y.; TAMAI, M.; NAGAI, S. Ethanol production by cell recycling with hollow fibers. J. Ferment. Technol., 61: 599-605, 1983.
49. NOVAK, M.; STREHAIANO, P.; MORENO, M.; GOMA, G. Alcoholic fermentation: on the inhibitory effect of ethanol. Biohecnol. Bioeng., 22: 201-211, 1981.

50. OKADA, W.; FUKUDA, H.; MORIKAWA, H. Kinetic expressions of ethanol production rate and ethanol consumption rate in baker's yeast cultivation. J.Ferment. Technol., 59: 103-109, 1981.
51. OURA, E. Effect of aeration intensity on the biochemical composition of baker's yeast. I Factors affecting the type of metabolism. Biotech. Bioeng., 16: 1197-1212, 1974.
52. PIRT, S. J. Principles of Microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publication, 1975.
53. RODRIGUES, M. I. Desenvolvimento de técnicas para o controle de fermentação. Reunião técnica sobre Fermentação Alcoólica - Copersucar. p. 27-60, 1989.
54. SÁ-CORREIA, I. ; VAN UDEN, N. Temperatures profiles of ethanol on the minimum and maximum temperatures for growth of the yeasts *S. cerevisiae* and *K. fragilis*. Biotechnol. Bioeng., 25: 1665-1667, 1983.
55. SÁ-CORREIA, I. ; VAN UDEN, N. Ethanol-induced death of *Saccharomyces cerevisiae* at low and intermediate growth temperatures. Biotechnol. Bioeng., 28: 301-303, 1986.
56. SINCLAIR, C. G. ; TOPIWALA, H. H. Models for cultures which considers the viability concept. Biotechnol. Bioeng., 12: 1069-1079, 1970.
57. THATIPAMALA, R.; ROHANI, S.; HILL, G. A. Effects of high product and substrate inhibition on the kinetics in biomass and products yields during ethanol batch fermentation. Biotechnol. Bioeng., 40: 289-297, 1992
58. UCHOA, A. Fermentation alcoolique: etude en culture continue de l'effect de la temperature et des antibiotiques en gradostat. Tese Doc Ing., I.N.S.A., Toulouse (FRANCE), 1982.