

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**FATORES OPERACIONAIS E CINÉTICA DO PROCESSO
FERMENTATIVO PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE
ETANOL EM ESCALA INDUSTRIAL**

Fernanda Cristina dos Santos Ferrari
Engenheira Química

2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**FATORES OPERACIONAIS E CINÉTICA DO PROCESSO
FERMENTATIVO PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE
ETANOL EM ESCALA INDUSTRIAL**

Fernanda Cristina dos Santos Ferrari

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton

Coorientadora: Profa. Dra. Maria da Graça Stupiello Andrietta

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária

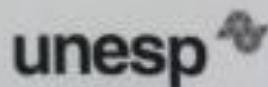
2013

Ferrari, Fernanda Cristina dos Santos
F375f Fatores operacionais e cinética do processo fermentativo para
otimização da produção de etanol em escala industrial / Fernanda
Cristina dos Santos Ferrari. -- Jaboticabal, 2013
xvii, 57 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientadora: Márcia Justino Rossini Mutton
Coorientadora: Maria da Graça Stupiello Andrietta
Banca examinadora: Leonardo Lucas Madaleno, Henrique Vianna
de Amorim
Bibliografia

1. Batelada alimentada. 2. Glicerol. 3. Modelos matemáticos.
4. Rendimento da fermentação alcoólica. 5. *Saccharomyces cerevisiae*.
I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 663.5:633.61



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: FATORES OPERACIONAIS E CINÉTICA DO PROCESSO FERMENTATIVO PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL EM ESCALA INDUSTRIAL

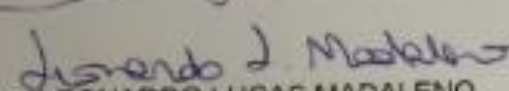
AUTORA: FERNANDA CRISTINA DOS SANTOS FERRARI

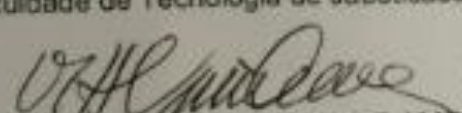
ORIENTADORA: Profa. Dra. MARCIA JUSTINO ROSSINI MUTTON

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. MARIA DA GRAÇA STUPIELLO ANDRIETTA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. MARCIA JUSTINO ROSSINI MUTTON
Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. LEONARDO LUCAS MADALENO
Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal / Jaboticabal/SP


Prof. Dr. HENRIQUE VIANNA DE AMORIM
Fermentec / Piracicaba/SP

Data da realização: 18 de dezembro de 2013.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

FERNANDA CRISTINA DOS SANTOS FERRARI – nasceu aos 17 de Junho de 1983, na cidade de Araraquara, estado de São Paulo. Em Fevereiro de 2001 ingressou no curso de Engenharia Química na Universidade Federal de São Carlos / UFSCar, recebendo o título de Engenheira Química em Dezembro de 2005. Ingressou no mercado de trabalho em maio de 2006 na empresa Virgolino de Oliveira S/A – Açúcar e Álcool, na cidade de Ariranha/SP, onde ocupa até o momento o cargo de Analista de Planejamento e Controle Industrial. Fez o curso de Especialização em Engenharia Sucroalcooleira pela Universidade de Campinas / UNICAMP de 2009 a 2010, com duração de 18 meses. Ingressou no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia (Microbiologia Agropecuária), em nível de mestrado da FCAV – UNESP, obtendo o título de Mestre em dezembro de 2013.

“Para ser grande, sê inteiro: nada

Teu exagera ou exclui.

Sê todo em cada coisa. Põe quanto és

No mínimo que fazes.

Assim em cada lago a lua toda brilha, porque alta vive.”

(Ricardo Reis, heterônimo de Fernando Pessoa)

*Aos meus pais **Luiz Roberto Ferrari e Célia R. dos Santos Ferrari**,
Que em todos os momentos da minha formação, priorizaram a educação
como ferramenta para galgar novos horizontes, tendo que, para isso, muitas
vezes abrir mão de outras escolhas na vida.*

*Por me apoiarem em todas as minhas decisões educacionais e profissionais,
e, independente da escolha profissional de cada filho, por enfrentarem junto
as dificuldades e compartilharem as glórias de nossas decisões. Isso me faz
sentir um orgulho imenso de vocês por nos permitir viver nossos próprios
sonhos! Sempre com dignidade, fé e humildade!*

*E por último, mas de maior relevância, por serem exemplos de vida, de
união, de perseverança e fé, formando e fortalecendo a família tão
maravilhosa que somos!*

*Obrigada pela minha vida e pelo amor incondicional que vocês dedicam a
mim!*

Amo muito vocês!!!

*Aos meus irmãos **Felipe A. dos S. Ferrari e Flávia P. dos S. Ferrari**
Tesouros preciosos da minha vida e motivos do meu orgulho e admiração.*

*Por compartilharem comigo todos os momentos de alegria e tristeza,
tornando a minha jornada muito mais recompensadora, intensa e feliz!*

Amo vocês!!

Dedico

*Aos estimados professores **Márcia Justino Rossini Mutton, Maria da Graça Stupiello Andrietta e Silvio Roberto Andrietta,***

Por toda orientação educacional, e principalmente, por toda compreensão e fé na minha capacidade, fazendo-me acreditar, mesmo quando tudo parecia desesperador, que a determinação e o querer fazem-nos capazes de “mover montanhas”. Obrigada pelo incentivo e carinho.

*Ao meu chefe e amigo **Adilson L. Giacomelli,***

Meu grande incentivador a desenvolver este trabalho, proporcionando-me todas as ferramentas necessárias para a construção desse projeto, e cercando-me de confiança e amizade.

A todos os que iluminaram a minha vida com o dom da serenidade.

Foi a maior bênção que eu poderia receber e que tornou possível a realização deste trabalho.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Deus pelo dom da vida e pelo livre arbítrio, permitindo-nos, por nossas escolhas, escrever nossa história e recheá-la de momentos importantes como este. E por Sua infinita bondade em dar-me forças e coragem, nos momentos de angústia e desespero.
- Aos meus pais e irmãos pela força, união, amor e apoio em todas as minhas decisões. E a toda a minha família, pelas orações e votos de sucesso, e compreensão pelos momentos de ausência.
- À minha orientadora, Professora Márcia Mutton pela oportunidade, pelos ensinamentos, pela paciência, pela confiança em mim depositada e pela liberdade com que me permitiu conduzir meu mestrado. À minha co-orientadora, Professora Maria da Graça Stupiello Andrietta por todo apoio, disposição e ensinamentos.
- Ao Professor Silvio Andrietta, pela infinita paciência e ajuda, durante todo o trabalho, nas discussões de conteúdo e por me fazer mais confiante em mim mesma. Ao Klauss, que mesmo diante de prazos curtíssimos, realizou com maestria diversas análises que fundamentam o meu trabalho.
- À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV/UNESP) e aos professores do curso de pós-graduação pelo aperfeiçoamento profissional.
- Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e sugestões de melhoria.
- Ao Grupo Virgolino de Oliveira S/A - Açúcar e Álcool, pela oportunidade e por todo apoio à realização deste trabalho, especialmente ao senhor José Luis Zanette, por valorizar a atividade acadêmica, considerando-a, junto à prática, pilar do desenvolvimento profissional e ao Adilson Luis Giacomelli, meu “tutor” e grande incentivador deste trabalho, por reconhecer que a educação é capaz de transformar a vida das pessoas, cobrindo-me de coragem e forças para percorrer esta estrada.
- Aos meus colegas de mestrado, Lidyane, Igor, Juliana e Gustavo, que conviveram comigo de maneira mais próxima e por mais tempo, tornando-se

amigos muito especiais aos quais devo meus agradecimentos sinceros por todo apoio durante esses anos, e por tantos momentos de alegria e força que sempre me transmitiram.

- A todas as pessoas envolvidas nos trabalhos do Laboratório de Microbiologia, Prof. Miguel, Sérgio, Nayara, Aline, Osânia, Rita, Silvia, que mais que uma equipe formam uma verdadeira e acolhedora família. Conviver com vocês, ainda que por um tempo pequeno, enriqueceu ainda mais a minha vida.
- Aos meus colegas de trabalho, Camila e Fabiano, que compreenderam meus momentos de ausência da usina e fizeram o trabalho do NICE sempre ser realizado com muita competência.
- Aos coordenadores da destilaria, Paulo Donegá, Pedro e Osmair por todo apoio nos experimentos, muitas vezes comprometendo a regularidade operacional, para gerar as condições que eu precisava para os ensaios. A todas as analistas que me acompanharam nas manhãs, tardes, noites e madrugadas e/ou me ajudaram com as análises, especialmente à Sandra Maria, que compreendeu meus prazos apertados e realizou todas as análises com determinação e competência. Ao Betinho, por toda ajuda com a obtenção de dados do sistema e pelo humor contagiante com que sempre nos presenteia. À minha amiga Denise pelos momentos de desabafo e compreensão. E aos colegas Alison e Milena, que entenderam as razões do meu trabalho, permitindo a realização deste na usina Catanduva, e me apoiando com discussões, conhecimento e amizade.
- A todos que direta ou indiretamente contribuíram para minha chegada até aqui. Às pessoas que me inspiram por acreditar na educação como forma de melhorar o mundo, e as que, na simplicidade desprestenciosa de uma conversa amiga ou de um momento de descontração, tornam o meu mundo mais doce e colorido!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
LISTA DE TABELAS.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1. Etanol e o setor sucroenergético.....	20
2.2. Processos fermentativos.....	23
2.2.1. Fermentação em batelada.....	23
2.2.2. Fermentação contínua.....	24
2.2.3. Fermentação em batelada alimentada.....	24
2.3. Fatores interferentes da fermentação alcoólica.....	25
2.3.1. Temperatura.....	26
2.3.2. Tempo de alimentação.....	27
2.3.3. Concentração de inoculo.....	28
2.4. Bioquímica da fermentação alcoólica.....	28
2.5. Subprodutos da fermentação.....	31
2.5.1. Glicerol.....	32
2.6. Cinética dos processos fermentativos.....	36
2.6.1. Velocidade específica de crescimento (μ).....	36
2.6.2. Rendimento em massa celular ($Y_{X/S}$).....	37
2.6.3. Rendimento em produto ($Y_{P/S}$).....	38
2.7. Modelos cinéticos.....	38
2.7.1. Termos de inibição.....	40
2.7.2. Modelos mais utilizados.....	41
2.8. Modelagem de um reator de mistura perfeita operando em batelada alimentada.....	42
2.8.1. Balanço de massa global.....	42
2.8.2. Balanço de célula.....	43

2.8.3. Balanço de substrato.....	43
2.8.4. Balanço de produto.....	43
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3.1. Condições experimentais.....	44
3.2. Delineamento experimental.....	44
3.3. Coleta das amostras.....	46
3.4. Análise das amostras.....	46
3.5. Cálculo do coeficiente de relação de massa de glicerol e massa de etanol ($Y_{G/P}$) de cada ensaio e análise da interferência das variáveis testadas neste coeficiente.....	47
3.6. Cálculo do rendimento em células ($Y_{X/S}$), rendimento em etanol ($Y_{P/S}$) e produtividade de cada fermentação e análise da interferência das variáveis testadas nestes parâmetros.....	47
3.7. Desenvolvimento do modelo e ajuste dos parâmetros cinéticos.....	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4.1. Perfil fermentativo.....	50
4.2. Relação de produção entre glicerol e etanol ($Y_{G/P}$).....	51
4.3. Efeito das variáveis estudadas sobre a relação de produção de glicerol e etanol ($Y_{G/P}$).....	52
4.4. Rendimentos $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$	53
4.5. Efeito das variáveis estudadas sobre o rendimento em etanol ($Y_{P/S}$)..	56
4.6. Produtividade em etanol.....	57
4.7. Efeito das variáveis estudadas sobre a produtividade em etanol.....	58
4.8. Ajuste do modelo cinético.....	58
5. CONCLUSÃO.....	64
5. REFERÊNCIAS.....	65
APÊNDICE A.....	73

FATORES OPERACIONAIS E CINÉTICA DO PROCESSO FERMENTATIVO PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL EM ESCALA INDUSTRIAL

RESUMO – Este trabalho, realizado em escala plena de uma planta industrial de fermentação, com biorreatores operados em batelada alimentada, teve como objetivo verificar como os fatores operacionais tempo de alimentação, temperatura e concentração de levedo influenciam a velocidade de conversão dos açúcares em etanol. Comparou-se também rendimento e produtividade dos ensaios realizados, além de verificar a interação entre a produção de etanol e glicerol na cinética fermentativa e como esses fatores podem ser otimizados de forma a aumentar a produção de etanol com redução de perdas de carbono na formação de outros produtos. E por fim, buscou-se um modelo cinético que se ajustasse satisfatoriamente aos dados experimentais obtidos. Para os ensaios utilizou-se o levedo que estava no processo industrial e o mosto do processo, proveniente de uma mistura de caldo e mel residual da produção de açúcar. O delineamento experimental seguiu um planejamento fatorial 2^3 , totalizando oito ensaios, mais três repetições do ponto central. Os parâmetros avaliados foram: concentração de substratos, etanol, glicerol e células. Para avaliação cinética utilizou-se um modelo do tipo não estruturado considerando apenas uma fonte de substrato (ART) e um modelo considerando duas fontes de substratos (glicose e frutose). Os resultados obtidos indicaram que a produção de glicerol está relacionada linearmente com a produção de etanol e essas duas rotas estão vinculadas à regeneração de NAD pela levedura e que essa correlação sofre interferência de condições de processo. O tempo de alimentação teve efeito significativo e foi inversamente proporcional à relação de produção entre glicerol e etanol. Os dois modelos cinéticos utilizados foram bem flexíveis, ajustando-se bem aos pontos experimentais e o modelo para dois substratos apresentou menores desvios entre os dados e as curvas de ajuste, ressaltando o consumo diferenciado entre a glicose e a frutose.

Palavras-chave: batelada alimentada, glicerol, modelos matemáticos, rendimento da fermentação alcoólica, *Saccharomyces cerevisiae*

OPERATIONAL FACTORS AND KINETICS OF THE FERMENTATION PROCESS FOR OPTIMIZATION OF ETHANOL PRODUCTION ON AN INDUSTRIAL SCALE

ABSTRACT – The present work, which was carried out in a full scale plant for industrial fermentation with bioreactors operated as fed-batch, had the objective to verify how the operational factors such as feeding time, temperature and yeast concentration may influence the sugar conversion velocity into ethanol. Also compared the yield and productivity of the essays, the interaction of between ethanol and glycerol in the fermentative kinetics and hoe these factors could be optimized in order to increase the ethanol production with low losses of carbon as by other products. Additionally, a kinetic model that best fitted in the obtained data was proposed. For the essays it was used an east already in used at the industrial process and its must, which came from an mixture of juice and residual molasse from sugar process phase. The experimental design followed and factorial planning 2^3 resulting in eight essays plus three repetition of the central point. The studied parameters were: substrate concentrations, ethanol, glycerol and cells. A non structured model was used for kinetic evaluation considering just one substrate source (ART) and another one considering two substrate sources (glucose and fructose). The results indicated that the glycerol production was linearly related to the ethanol production and these two routes are linked to the regeneration of NAD by yeast and this relation may be influenced by process conditions. The feeding time had significant effect and conversely proportional to the glycerol and ethanol production relation. The two kinetic models used were very flexible, adjusting well to the experimental points and the model for two substrates smallest deviations between the data and the curves adjustment, emphasizing the consumption differential between glucose and fructose.

Keywords: fed-batch, glycerol, mathematical models, yield of alcoholic fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*

LISTA DE ABREVIATURAS

ART	açúcares redutores totais
K_i	constante de inibição pelo substrato
K_s	constante de saturação do substrato
m	expoente da equação de inibição pela biomassa
n	expoente da equação de inibição pelo produto
P	concentração de etanol
$P_{máx}$	máxima concentração de etanol na qual cessa o crescimento celular
r_P	taxa de produção do produto
r_S	taxa de consumo do substrato
r_X	taxa de produção celular
R^2	coeficiente de determinação
S	concentração de substrato
V	volume da dorna
X	concentração de biomassa
$X_{máx}$	máxima concentração de biomassa na qual cessa o crescimento celular
$Y_{G/P}$	coeficiente de relação de massa de glicerol e massa de etanol
$Y_{P/S}$	rendimento em etanol
$Y_{X/S}$	rendimento em células
μ	velocidade específica de crescimento celular
$\mu_{máx}$	velocidade específica máxima de crescimento celular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Evolução da frota total e das vendas de veículos leves flexíveis (unidades).....	21
Figura 2. Metas de consumo de biocombustíveis nos EUA.....	22
Figura 3. Produção de etanol por unidade de área.....	22
Figura 4. Rendimento fermentativo versus alimentação do biorreator.....	27
Figura 5. Sequência de reações enzimáticas pela fermentação alcoólica de carboidratos endógenos (glicogênio e trealose) ou exógenos (sacarose e maltose), conduzida por <i>S. cerevisiae</i>	29
Figura 6. Metabolismo central da produção de etanol e de glicerol a partir de glicose.....	31
Figura 7. Proporção dos produtos formados na fermentação alcoólica.....	32
Figura 8. Rota metabólica de formação do glicerol.....	34
Figura 9. Formação de produtos da fermentação alcoólica.....	35
Figura 10. Representação esquemática de um reator de mistura operando em batelada alimentada.....	42
Figura 11. Perfis de concentração de substrato (S), produto (P) e células (X) para uma fermentação realizada em biorreator operado em batelada alimentada – considerando apenas 1 substrato - ART (equação 20).....	59
Figura 12. Perfis de concentração de glicose (S(gli)), frutose (S(fru)), produto (P) e células (X) para uma fermentação realizada em biorreator operado em batelada alimentada – considerando 2 substratos – glicose e frutose (equações 21 e 22).....	59
Figura 13. Ajustes aos dados experimentais do ensaio 1, utilizando o modelo cinético para um substrato.....	60
Figura 14. Ajustes aos dados experimentais do ensaio 8, utilizando o modelo cinético para um substrato.....	60
Figura 15. Ajustes aos dados experimentais do ensaio 1, utilizando o modelo cinético para dois substratos.....	62
Figura 16. Ajustes aos dados experimentais do ensaio 8, utilizando o modelo cinético para dois substratos.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições experimentais aplicadas às fermentações quanto às variáveis: tempo de alimentação (TA), temperatura (T) e concentração de levedo (CL).....	45
Tabela 2. Concentrações de etanol (E) e glicerol (G) ao longo do tempo (t), para cada ensaio realizado.....	50
Tabela 3. Equação da regressão linear, coeficiente de variação e coeficiente $Y_{G/P}$ para cada ensaio.....	51
Tabela 4. Análise de todas as interações em um planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central para $Y_{G/P}$	52
Tabela 5. Concentrações de glicose (Gli), frutose (Fru) e sacarose (Sac) e ART total, do mosto de cada ensaio realizado.....	54
Tabela 6. Rendimentos $Y_{P/S}$ de cada ensaio.....	54
Tabela 7. ART consumido (ARTcons) calculado pelas equações 31 e 32 e seus respectivos rendimentos em etanol ($Y_{P/S}$).....	56
Tabela 8. Análise de todas as interações em um planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central para $Y_{P/S}$	56
Tabela 9. Produtividade em etanol de cada ensaio.....	57
Tabela 10. Análise de todas as interações em um planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central para Produtividade em etanol.....	58
Tabela 11. Resultados dos parâmetros cinéticos para o modelo que considera apenas um substrato (modelo de Lee, Pollard e Coulman).....	61
Tabela 12. Resultados dos parâmetros cinéticos para o modelo que considera dois substratos (Tosetto modificado).....	63

1. INTRODUÇÃO

Os derivados de petróleo, que constituem a maior parcela da base energética mundial, são fontes não renováveis de energia, com reservas limitadas e localizadas, predominantemente, em regiões de conflitos político territoriais, fatores que resultam em irregularidades de preço, fornecimento e distribuição, além de serem fontes energéticas responsáveis por uma elevada liberação à atmosfera de gases causadores do efeito estufa, fenômeno que resulta no aumento do aquecimento global e em diversas alterações climáticas. Com tantas adversidades, desenvolve-se um mercado cada vez mais crescente a combustíveis derivados de biomassa, para uso em motores de combustão interna, capazes de substituir, parcial ou totalmente, os combustíveis de origem fóssil (GNANSOUNOU; DAURIAT, 2005; SUHAIMI et al., 2012; WYMAN, 2007).

O etanol é um exemplo de combustível renovável, cujo uso é consagrado no Brasil. De acordo com os dados da Companhia Nacional de Abastecimento – Conab (2013), o setor sucroalcooleiro no Brasil ocupou 8,485 milhões de hectares em área de cana-de-açúcar plantada na safra 2012/2013. O total de cana moída na safra 2012/13 foi de 588,91 milhões de toneladas e 51% dessa moagem foi destinada para a produção de etanol, o que representou a produção de 23,64 bilhões de litros.

Grande parte dos processos fermentativos industriais é conduzida em batelada alimentada, já que este é o modo de operação mais efetivo para se lidar com problemas como inibição pelo substrato e repressão catabólica.

A reação global da glicólise demonstra que 1 mol de glicose (180g) produz 2 moles de etanol (92g), 2 moles de dióxido de carbono (88g) e 57 Kcal de energia. Assim, o rendimento teórico ($Y_{P/S}$) para a produção de etanol é de 0,511 g/g. Na prática, este valor não é observado devido à utilização de parte da glicose para a produção de glicerol, alcoóis superiores e ácidos, substâncias necessárias para a síntese de material celular e manutenção da levedura, sendo o glicerol o mais importante do ponto de vista quantitativo.

Assim, a habilidade de se controlar estes processos é de extrema importância, no sentido de se obter menores perdas por formação de subprodutos,

produtividades mais altas, melhora na uniformidade dos produtos e redução dos custos operacionais.

Objetivou-se com o presente trabalho avaliar como as variáveis de processo (temperatura de fermentação, concentração de inóculo e tempo de alimentação) influenciam na velocidade de conversão dos açúcares em etanol, comparando-se rendimento e produtividade dos ensaios realizados. Aliado a estes estudos, observou-se a cinética de formação de coprodutos vinculados à regeneração do NAD (sendo o glicerol o mais relevante) em função das variáveis testadas e verificou-se a interação entre a produção de etanol e glicerol. E por fim, buscou-se um modelo cinético que se ajustasse satisfatoriamente aos dados experimentais obtidos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Etanol e o setor sucroenergético

O etanol é um composto orgânico utilizado no Brasil como combustível automotivo, obtido através da fermentação do caldo da cana-de-açúcar por microrganismos denominados *Saccharomyces cerevisiae*.

Segundo Cardoso (2006), o etanol é utilizado no Brasil como combustível automotivo em duas versões:

Etanol Hidratado: em carros a álcool ou FlexFuel, possui 7% em massa / massa (m/m), de água.

Etanol Anidro: Adicionado à gasolina na proporção de até 20% em massa / massa (m/m), possui no máximo 0,7% em m/m de água.

O etanol vem ganhando destaque nas últimas décadas devido à busca por biocombustíveis alternativos para atender a demanda da indústria automotiva com menos reflexos ao meio ambiente e a um custo competitivo.

Conforme descrito por Santos (2010), a premissa central que classifica agroenergia como uma fonte energética limpa é que o carbono emitido pela queima ou pelo gasto dos biocombustíveis é rapidamente reciclado por meio de sua fixação pelo ciclo de crescimento das plantas produtoras (pelo processo de fotossíntese). Os combustíveis fósseis não apresentam esta reciclagem, constituindo-se somente como uma fonte de emissão de carbono.

Reforçando a questão ambiental, está a meta de redução de emissão de CO₂ (Dióxido de Carbono) assumida pelo governo brasileiro. Meta esta, que é de 36,1% até 2.020, de acordo com a PNMC (Política Nacional sobre Mudança Climática), instituída pela Lei 12187 de 29 de dezembro de 2.009. Estima-se que 1/4 da meta somente poderá ser alcançada pelo uso do etanol, em detrimento a combustíveis fósseis (PINTO, 2010).

Prova de que há mercado crescente para o etanol no Brasil é a constatação de venda de veículos flex. A evolução da participação desses veículos na composição da frota brasileira pode ser observada na Figura 1, a seguir, onde está

demonstrada a relação percentual de veículos flexfuel vendidos, em relação ao total dos veículos leves comercializados (que também apresentou aumento), ao longo dos 10 anos seguintes ao seu lançamento no mercado brasileiro, ocorrido em 2.003, de acordo com levantamento da ANFAVEA (2013) – Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores.

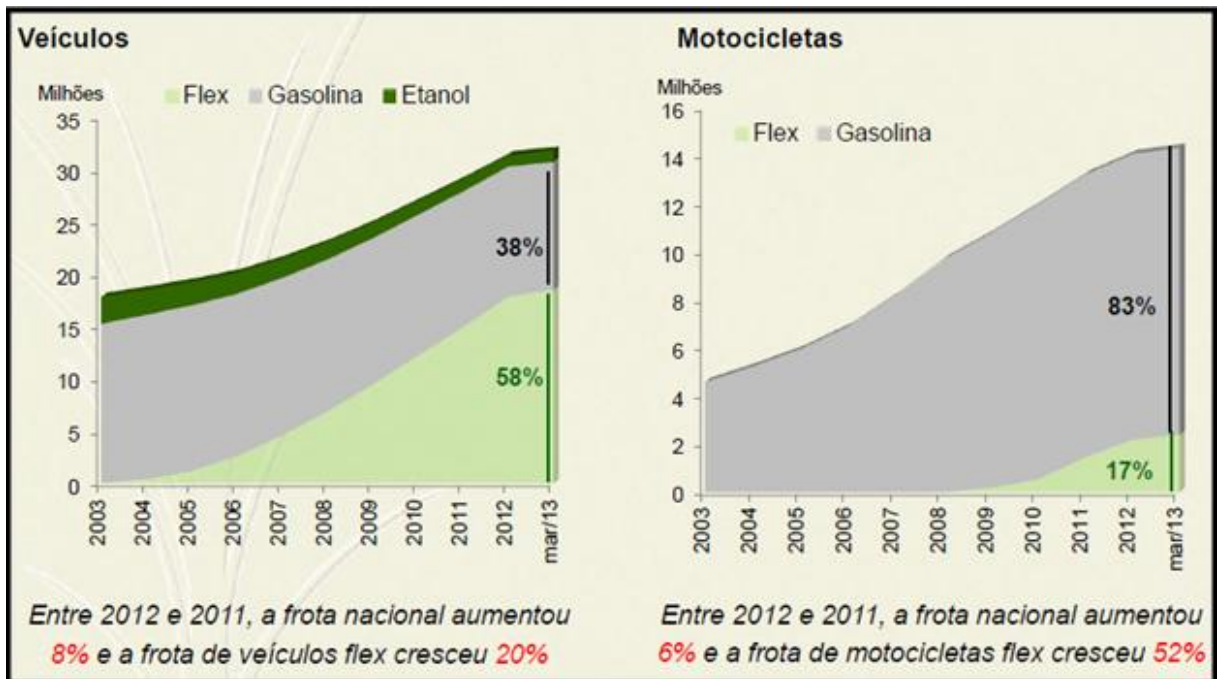


Figura 1 - Evolução da frota total e das vendas de veículos leves flexíveis (unidades) (ANFAVEA, 2013).

Além de perspectivas positivas quanto ao aumento da produção de etanol para o consumo interno, o mercado externo também prevê um aumento de consumo de combustíveis renováveis, sendo uma parcela representativa oriunda de etanol de cana-de-açúcar, conforme ilustra a Figura 2 (UNICA, 2010).

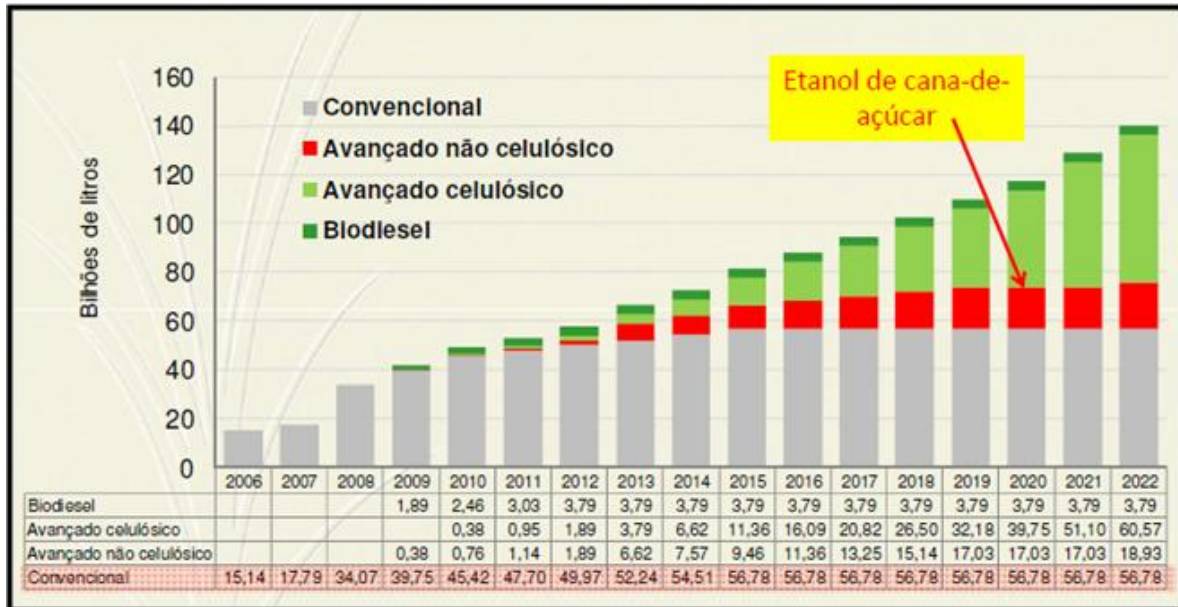


Figura 2 – Metas de consumo de biocombustíveis nos EUA (UNICA, 2010).

A cana-de-açúcar pode não ser a única fonte para a produção de etanol, mas é, sem dúvida, a que estabelece a melhor relação custo-benefício e o melhor rendimento energético (SANTOS, 2010). De acordo com os estudos publicados pela International Energy Agency – IEA, em 2005, disponível no site da UNICA (2010), a cana-de-açúcar rende até 7 mil litros de etanol por hectare plantado, quantidade significativamente superior aos 4 mil litros por hectare obtidos com o milho, por exemplo (Figura 3):

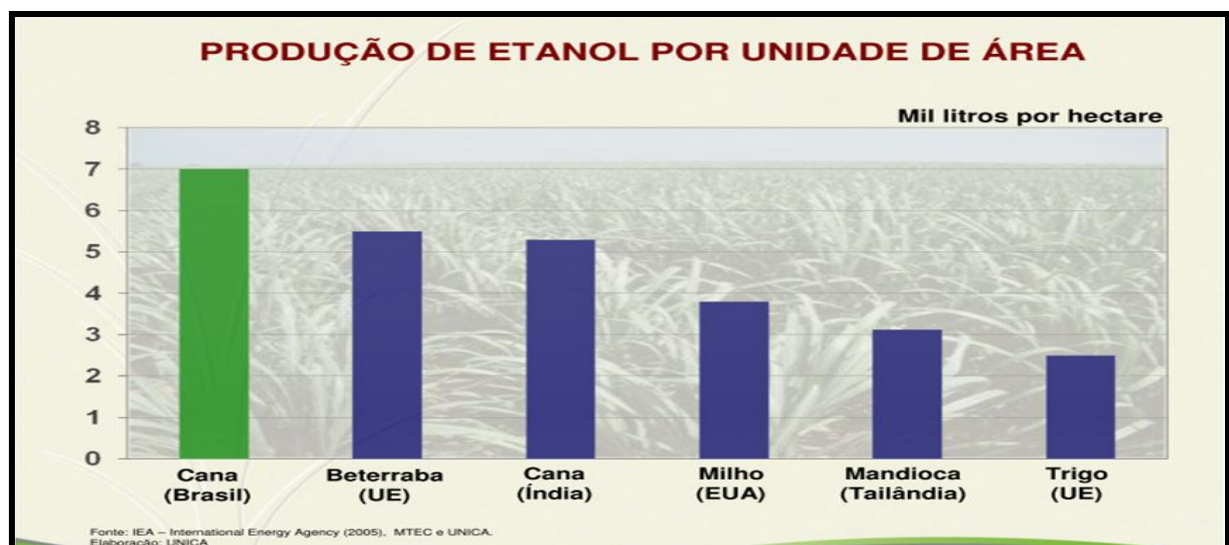


Figura 3 – Produção de etanol por unidade de área (UNICA, 2010).

Assim, no cenário brasileiro, o cultivo da cana-de-açúcar, além de manter a produção de açúcar (produto do qual o Brasil é o maior fornecedor mundial), viabiliza o etanol como uma opção de combustível renovável, ambientalmente melhor e financeiramente viável e competitivo, garantindo boas perspectivas ao setor sucroalcooleiro brasileiro.

2.2. Processos fermentativos

Devido à importância biotecnológica da levedura *S. cerevisiae*, na produção de alimentos e bebidas alcoólicas em todo o mundo e na produção de combustíveis renováveis no Brasil, este microrganismo tornou-se o mais estudado e, portanto, seu metabolismo é o mais conhecido, sendo o microrganismo mais amplamente utilizado no processo de fermentação alcoólica. (SHULLER; KARGIL, 2002).

Os processos fermentativos podem ser classificados de acordo com a maneira através da qual o substrato é adicionado e o produto retirado. Existem três tipos básicos de processos fermentativos para a obtenção de etanol: batelada, contínuo e batelada alimentada (Melle-Boinot) (FERREIRA, 2005).

2.2.1. Fermentação em batelada

No que se refere à manutenção e assepsia, o processo descontínuo é considerado o mais seguro, pois, ao final de cada batelada, o reator deve ser esterilizado juntamente com um novo meio de cultura, recebendo um novo inóculo que deve ser submetido a todos os controles necessários para assegurar a presença única do microrganismo responsável pelo processo (SCHIMIDELL; FACCIOTTI, 2001). A fermentação em batelada leva a baixos rendimentos e produtividades quando o substrato adicionado de uma só vez, no início da fermentação, exerce efeitos de inibição, repressão, ou desvia o metabolismo celular a produtos que não interessam (CARVALHO et al., 1975).

Segundo Maiorella, Blanch e Wilke (1981), o processo descontínuo é lento, uma vez que o reator deve ser limpo e preparado, e o mosto e o inóculo devem ser carregados ao sistema.

Assim, a baixa eficiência dos processos em batelada estimula o surgimento de formas alternativas (SCHIMIDELL; FACCIOTTI, 2001).

2.2.2. Fermentação contínua

O processo contínuo caracteriza-se por ser um sistema que pode operar por longos períodos de tempo em estado estacionário. A manutenção de volume constante no reator significa a necessidade de se contar com vazões idênticas de alimentação e de retirada do meio (FACCIOTTI, 2001).

A fermentação contínua é um processo que requer maior conhecimento do comportamento do microrganismo no meio em que ele atua. Os fatores operacionais (pH, temperatura, concentração de substrato, etanol e biomassa entre outros) influenciam na produtividade do sistema exigindo maior controle do processo (ATALA et al., 2000). A maior desvantagem é que as fermentações contínuas são mais suscetíveis à contaminação bacteriana por longos prazos de exposição (CYSEWSKI; WILKIE, 1978).

2.2.3. Fermentação em batelada alimentada

O processo batelada alimentada é conhecido desde 1900 sendo utilizado para regulação do crescimento de *S.cerevisae* (CARVALHO et al., 1975). Também conhecido por "cultura por processo descontínuo alimentado", para se referirem a uma fermentação descontínua continuamente alimentada por açúcares. Segundo Lessmann (1993) o processo batelada-alimentada pode ser observado como um processo fermentativo no qual um ou mais nutrientes são fornecidos gradualmente ao biorreator durante o cultivo e no qual os produtos permanecem no mesmo até o final do processo. Esse processo é utilizado quando se procura diminuir o efeito inibitório causado pelo excesso de substrato podendo ser controlado pela vazão.

Os processos em batelada alimentada são eficientes e versáteis na grande maioria dos processos fermentativos. Em tais processos, especialmente naqueles com altas densidades celulares, a produtividade é alta devido ao grande número de células viáveis no meio de fermentação (COSTA; LIMA; ALVES, 1996). A batelada

alimentada permite o controle da concentração de açúcar minimizando os efeitos de inibição pelo substrato e permitindo a sua adição em momentos propícios durante a fermentação (McNEIL; HARVEY, 1990).

A maioria das destilarias do Brasil utiliza o processo de fermentação Melle-Boinot. O processo se baseia na alimentação contínua e crescente do substrato à dorna (sem purga até o volume máximo) e na reciclagem do fermento. O fermento é multiplicado utilizando mosto, enchem-se as domas, que depois de fermentadas são centrifugadas. Após ser separada do vinho, a massa celular é submetida a um tratamento adequado e encaminhada para a doma como inóculo de um novo ciclo. A vazão de alimentação pode ser constante ou variar com o tempo (KELLER; DUNN, 1978).

Almeida (1960) descreve as seguintes vantagens do processo Melle-Boinot:

- economia de açúcar devido a menor reprodução celular elevando o rendimento em etanol;
- eliminação de contaminantes pela centrifugação do vinho (separação de células de levedura);
- fermentação mais pura devido ao tratamento de leite de levedura (tratamento ácido);
- eliminação da necessidade de cultura pura no preparo do pé-de-cuba, prática exigida no processo clássico, diminuindo, portanto a complexidade das operações da planta.

2.3. Fatores interferentes da fermentação alcoólica

Segundo Amorim, Basso e Alves (1996), a levedura como entidade viva independente realiza a fermentação do açúcar com o objetivo de conseguir a energia química necessária à sua sobrevivência, sendo o etanol apenas e tão somente um subproduto desse processo. Se o homem pretende beneficiar-se dessa habilidade metabólica, ele deve buscar os conhecimentos que lhe permitam propiciar às leveduras, condições ideais para que as mesmas trabalhem a seu favor, isto é, com maior eficiência na produção de etanol.

As leveduras *S. cerevisiae* são microrganismos de alta eficiência fermentativa. Este fato tem permitido a seleção de cepas industriais com características adquiridas que as tornam produtores de etanol mais tolerantes aos produtos da fermentação. Estudos relacionados com a melhoria das características da levedura ou com o processo de produção de etanol têm sido apresentados na literatura com o objetivo de aumentar o rendimento e a produtividade dos processos fermentativos (AMORIM, 2005).

Diversos fatores físicos, químicos e microbiológicos afetam o rendimento da fermentação e a eficiência da conversão de açúcar em etanol (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001). Entre os principais fatores que podem vir a afetar na produção de etanol destacam-se: temperatura, tempo de alimentação do substrato, concentração de inoculo, pH, contaminação bacteriana, nutrientes, e inibidores.

2.3.1. Temperatura

O controle da temperatura é um fator de grande importância durante o processo de fermentação, pois a levedura trabalha bem entre temperaturas de 25°C e 30°C. Valores de temperatura acima destes citados podem gerar enfraquecimento da levedura, criar boas condições para o aparecimento de outros microrganismos e ocasionar maiores perdas de álcool por evaporação, já temperaturas inferiores a 25°C diminuem a atividade da levedura (CARDOSO, 2006).

Segundo Lima, Basso e Amorim (2001), as temperaturas ótimas para a produção industrial de etanol situam-se na faixa de 26 a 35°C, mas não raramente, a temperatura nas destilarias alcança 38°C. À medida que a temperatura aumenta, aumenta a velocidade da fermentação, mas favorece a contaminação bacteriana, ao mesmo tempo em que a levedura fica mais sensível à toxidez do etanol.

As linhagens industriais de *S. cerevisiae* são normalmente resistentes a altas temperaturas (MONACO, 2007), mas este fator interfere na viabilidade celular quando em sinergia com a presença de etanol ou meio com baixo pH (SILVA-FILHO et al., 2005).

2.3.2. Tempo de alimentação

O tempo de alimentação, que determina a velocidade de alimentação do biorreator, para processos em regime de batelada ou batelada alimentada, influencia diretamente no rendimento de fermentação, conforme ilustrado na Figura 4. Para velocidades altas, há intensa produção de ácido succínico e glicerol, devido ao estresse dos microrganismos ocasionando perda em rendimento de etanol (MARTINEZ, 2007).

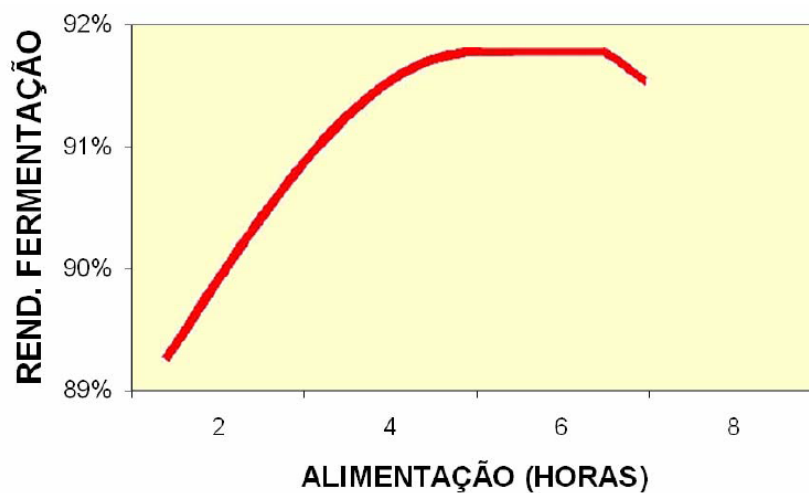


Figura 4 – Rendimento fermentativo versus alimentação do biorreator (MARTINEZ, 2007).

Tempos de enchimento muito pequenos implicam em vazões muito elevadas, que podem provocar transbordamentos do meio em fermentação devido à formação excessiva de espuma, com perdas para o processo, ou mesmo inibição do metabolismo das leveduras pelo acúmulo de substrato no meio em fermentação. Além dessas perdas, o tempo de fermentação pode aumentar, e por isso, diminuir a produtividade (VASCONCELOS; VALDMAN, 1988).

A alimentação deve ser contínua e de maneira dosada, pois assim ocorre uma redução do tempo de fermentação, menor formação de espuma, menor arraste de etanol e uma fermentação mais uniforme (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

2.3.3. Concentração de inóculo

A concentração de inóculo deve ser adequada à concentração de açúcares do mosto, para que não haja falta de células para consumir o substrato oferecido, elevando muito a concentração de açúcares no meio.

Altas concentrações de açúcares promovem elevados teores alcoólicos, podendo comprometer a viabilidade das células ou ainda resultar em fermentações lentas e incompletas, com formação de subprodutos. Como consequência, se tem menores rendimentos alcoólicos e baixa viabilidade celular da levedura, favorecendo o desenvolvimento de contaminantes (ANGELIS, 1992). Desta forma, no preparo do mosto, a concentração de açúcar total deve ser compatível com a natureza e composição da matéria-prima, com o tipo de levedura empregada e com o processo de condução da fermentação (STUPIELLO; HORII, 1981).

2.4. Bioquímica da fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica é a ação de leveduras sobre açúcares fermentescíveis contidos em uma solução. É um processo biológico no qual a energia formada por reações de oxidação parcial pode ser utilizada para o crescimento de leveduras e a oxidação parcial anaeróbia da hexose na produção de álcool e gás carbônico (LIMA; MARCONDES, 2002).

A transformação do açúcar em etanol e CO₂ envolve 12 reações em sequencia ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica, conforme apresentado na Figura 5. Tal aparato enzimático encontra-se confinado no citoplasma celular, sendo, portanto, nessa região da célula que a fermentação alcoólica se processa (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

Os carboidratos considerados substratos para a fermentação tanto podem ser endógenos (constituintes da levedura, como o glicogênio e a trealose) como exógenos (sacarose, glicose, frutose e outros), estes últimos fornecidos à levedura (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

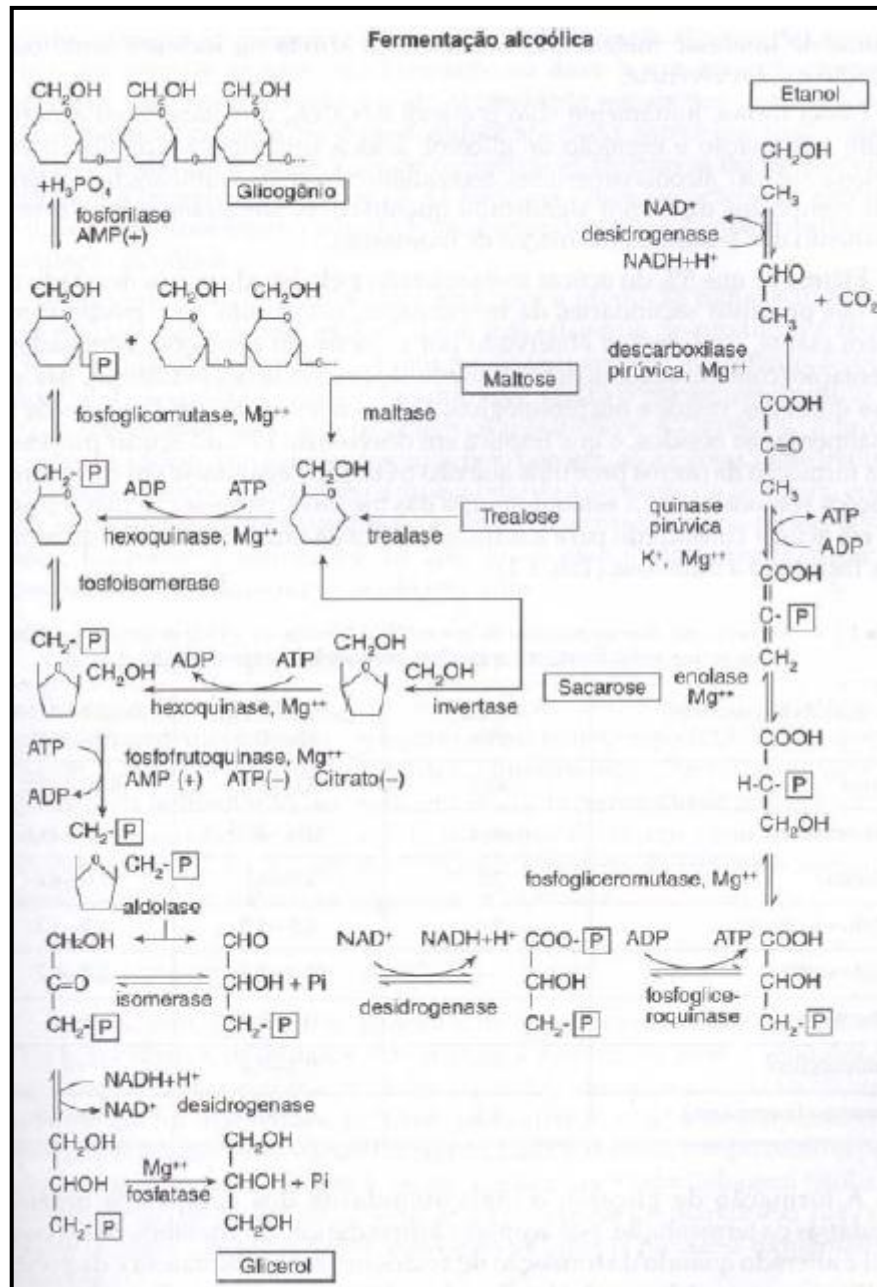
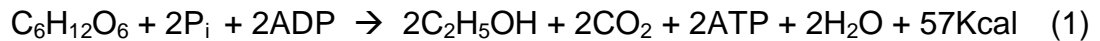


Figura 5 – Sequencia de reações enzimáticas pela fermentação alcoólica de carboidratos endógenos (glicogênio e trealose) ou exógenos (sacarose e maltose), conduzida por *S. cerevisiae* (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

Dois ciclos distintos definem o processo de transformação de açúcares solúveis em moléculas menores pela ação da levedura. Um deles é a glicólise, que tem a função de "quebrar" a molécula de glicose até ácido pirúvico, através de uma série de reações catalisadas por enzimas 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. Na presença de oxigênio há um deslocamento reacional de parte do ácido pirúvico para o Ciclo de Krebs, onde este será oxidado a dióxido de carbono e água.

O balanço global dos dois ciclos é resumido pelas equações (1) e (2):



Equação de Gay-Lussac



Ciclo de Krebs

O objetivo principal da levedura, ao metabolizar anaerobicamente o açúcar é gerar uma forma de energia (ATP, adenosina trifosfato) que será empregada na realização de diversas funções fisiológicas (absorção, excreção e outras) e biossínteses necessárias à manutenção da vida, crescimento e multiplicação (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

De maneira simplificada pode-se descrever a formação de etanol por *Saccharomyces* e outras leveduras da forma ilustrada na Figura 6. A formação de etanol ocorre pela via Emden-Meyerhof-Parnas, ou via glicolítica. Nesta via, a hexose (glicose) é oxidada a gliceraldeído-3-fosfato e a dihidroxicetona fosfato. O gliceraldeído é convertido a piruvato que é, então, descarboxilado a acetaldeído. Na reação subsequente, o acetaldeído é reduzido a etanol pela enzima álcool desidrogenase pelo uso de NADH. As duas moléculas de NAD⁺ formadas são utilizadas na oxidação de outra molécula de glicose, mantendo-se assim, o equilíbrio redox na célula (MELO, 2006). A dihidroxicetona pode ser convertida a gliceraldeído-3-fosfato, e posteriormente a etanol, ou, alternativamente, reduzida a glicerol (MELO, 2006).

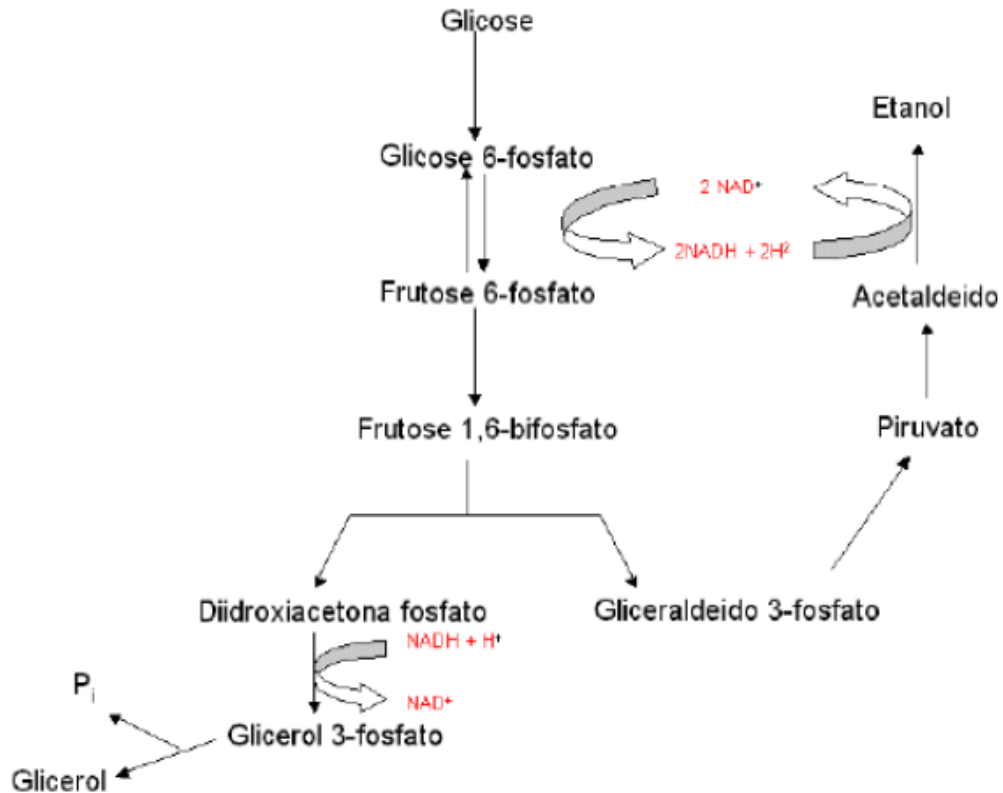


Figura 6 – Metabolismo central da produção de etanol e de glicerol a partir de glicose (MELO, 2006).

2.5. Subprodutos da fermentação

Na sequência das reações enzimáticas de produção de ATP (trifosfato de adenosina) – grupo de moléculas que armazenam energia para processos biológicos, intrínsecas à produção de etanol – aparecem rotas metabólicas alternativas para formação de materiais necessários à constituição da biomassa. São eles: polissacarídeos, lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e outros. Outros compostos podem se formar, eventualmente, durante a fermentação, que reduzem a produção de etanol, tais como glicerol, ácidos orgânicos (succínico, acético, pirúvico e outros), alcoóis superiores, acetaldeído, acetoína, butilenoglicol, além de outros compostos de menor significado quantitativo. Simultaneamente, ocorre o crescimento das leveduras (formação de biomassa). (AMORIM, 1977).

As hexoses são reagentes primários no metabolismo da fermentação alcoólica. Estequiometricamente, o rendimento do processo fermentativo é 0,511 g/g

de hexose, porém, ocorrem, juntamente com a fermentação alcoólica, reações secundárias, resultando na redução do rendimento teórico. Quando se trabalha com substratos complexos, em processos industriais, notadamente na presença de corpos estranhos ao meio (fibras, gomas, leveduras selvagens) observa-se a geração de novos subprodutos e o rendimento industrial é reduzido para até 90% (LIMA; MARCONDES, 2002; LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

Durante a fermentação alcoólica, além do etanol, também são produzidos outros metabólitos fermentativos e biomassa. Sua produção sempre é pequena quando comparada com a quantidade de açúcares convertidos em etanol e gás carbônico (BARRE et al., 2004).

2.5.1. Glicerol

O glicerol (1,2,3 propanotriol ou glicerina) foi descoberto por Scheele em 1779 durante o processo de saponificação de azeite de oliva. Pasteur também observou sua formação como um subproduto da fermentação alcoólica, sendo ele o subproduto mais importante do ponto de vista quantitativo (ARRUDA, 2007).

A Figura 7 ilustra quantitativamente os produtos e subprodutos da fermentação alcoólica.

Produtos e Subprodutos da fermentação alcoólica	
Etanol	45-49%
Gás Carbônico	43-47%
Glicerol	2-5%
Ácido Succínico	0,5-1,5%
Ácido Acético	0-1,4%
Ácido Málico	0-0,3%
Biomassa	0,7-1,7%
Óleo Fúsel	0,2-0,6%
Butileno Glicol	0,2-0,6%

Figura 7 – Proporção dos produtos formados na fermentação alcoólica (AMORIM; BASSO; ALVES, 1996).

O glicerol está envolvido no metabolismo da levedura *S. cerevisiae* de diferentes formas. Ele pode ser utilizado como única fonte de carbono sob condições aeróbias e pode tratar-se, por outro lado, de um subproduto quando a glicose ou outros açúcares facilmente fermentescíveis são convertidos a etanol (NEVOIGT; STAHL, 1997).

Segundo Brumm e Hebeda (1988), o glicerol formado durante a fermentação alcoólica corresponde de 0,08 a 0,15g por g de etanol. Oura (1977) relatou uma produção de 0,03 a 0,05g de glicerol por g de etanol.

Na biossíntese do glicerol, vários fatores ambientais e de crescimento como a linhagem da levedura selecionada, o nível de inoculação, a concentração de sulfito, a temperatura, a concentração de açúcar, o estresse osmótico, a fonte e a concentração de nitrogênio, o pH, a aeração, influenciam a sua produção pela levedura no processo fermentativo (BEROVIC et al., 2006).

De maneira geral, o acúmulo de glicerol é uma necessidade para a manutenção de um balanço redox favorável pela conversão do excesso de NADH, que é gerado durante a formação da biomassa, a NAD⁺. Como a formação do glicerol requer a redução da dihidroxicetona-fosfato a glicerol-3-fosfato (G-3-P) pela dihidroxicetona-fosfato-redutase, ele acaba convertendo uma molécula de NADH, gerada na oxidação do gliceraldeído-3-fosfato, a NAD⁺ (BEROVIC et al., 2006). A Figura 8 ilustra a rota metabólica de formação do glicerol.

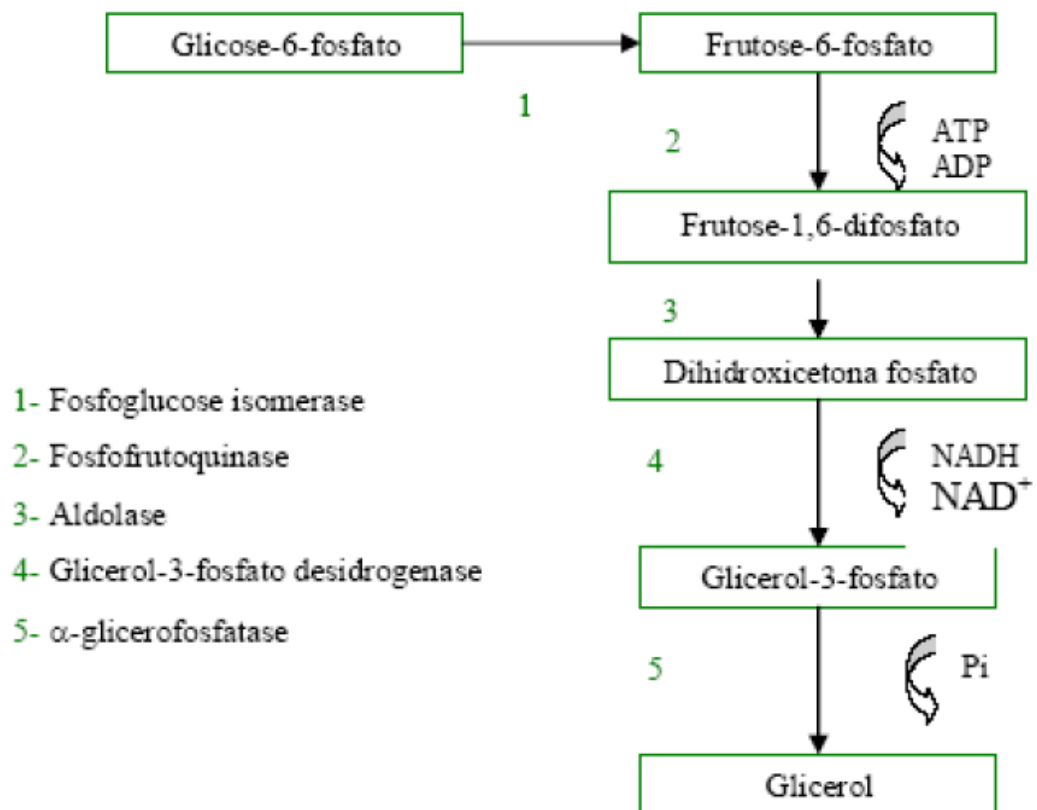


Figura 8 – Rota metabólica de formação do glicerol (OLIVEIRA, 2006).

A função do consumo de NADH na formação de glicerol é entendida como sendo a manutenção do balanço redox citosólico, compensando as reações celulares que produzem NADH (NEVOIGT; STAHL, 1997). A produção de glicerol a partir da glicose é, portanto, um neutralizante redox natural do processo (BASSO, 2004). A Figura 9 ilustra o processo fermentativo que ocorre na célula da levedura, a partir dos substratos glicose e frutose.

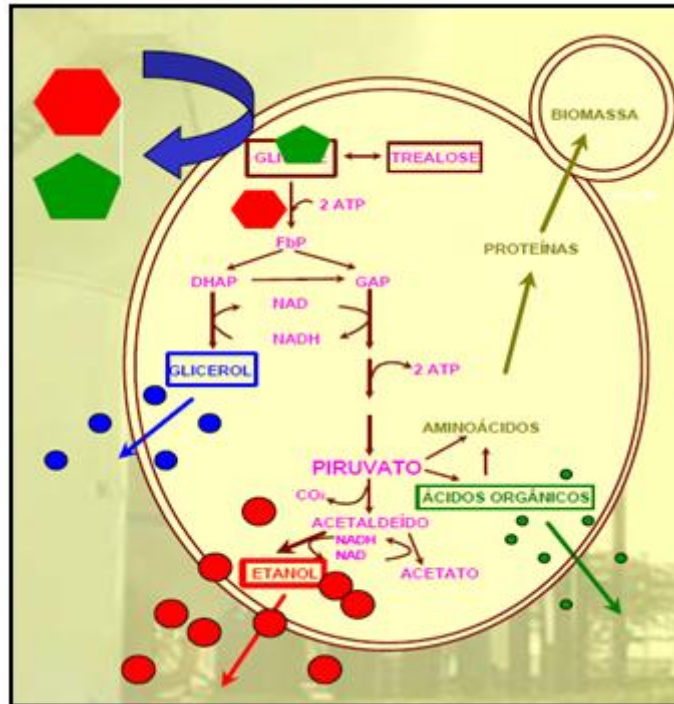


Figura 9 – Formação de produtos da fermentação alcoólica (AMORIM; BASSO; ALVES, 1996).

De acordo com Biocontal(a) (2013), a produção de glicerol não traz nenhum ganho energético para a célula de levedura, no entanto, permite a regeneração do NAD⁺. Se somado este fato ao de que esta regeneração ocorre antes da oxidação do gliceraldeído-3-fosfato, onde ocorre o consumo do NAD⁺, fica claro que a célula de levedura produz glicerol como forma alternativa de regeneração de NAD. Isso mostra que a quantidade de NAD regenerado na produção de etanol não é suficiente para suprir as necessidades da levedura e assim, a produção de glicerol torna-se uma rota importante para manter o equilíbrio metabólico da levedura.

Segundo Carvalheiro, Roseiro e Gírio (1999), o glicerol é um composto que pode ser acumulado em concentrações bastante elevadas nas células de levedura sem efeito tóxico ou inibitório, além de implicar em termoproteção de proteínas e de toda a célula.

Erasmus, Van der Merwe e Van Vuuren (2003), no estudo da adaptação metabólica da levedura *S. cerevisiae* em condições de estresse a altas concentrações de açúcar, atribuem a síntese de glicerol a função de “válvula de

segurança” que disponibiliza rapidamente carboidratos à levedura em condições adversas, juntamente com a trealose e o glicogênio.

Ainda em relação à produção de glicerol em situações de estresse, Nevoigt e Stahl (1997) no estudo intitulado “Osmorregulação e metabolismo do glicerol em *S. cerevisiae*” afirmaram que o acúmulo de glicerol parece não ser necessariamente responsável pela sobrevivência ao estresse osmótico, mas é essencial na restauração das atividades biológicas normais da célula durante a osmorregulação.

Para a produção de etanol nas destilarias, a formação de glicerol é indesejável, pois reduz a eficiência da fermentação (OURA, 1977; BRUMM; HEBEDA, 1988).

Desse modo, poder-se-ia, mediante adequação do meio fermentativo e de uma melhor condução da fermentação, minimizar a formação do glicerol associado aos estresses (BASSO, 2004).

Em complemento, o conhecimento da cinética de formação e os fatores que interferem na quantidade produzida de glicerol se mostram relevantes para determinar se é possível otimizar o rendimento fermentativo controlando sua produção.

2.6. Cinética dos processos fermentativos

O estudo cinético de um processo de biotransformação é importante, pois, permite a aquisição de conhecimento básico do processo. A cinética de biotransformação está relacionada com a velocidade de consumo de substrato e de aparecimento de produto e no caso mais específico de processos de fermentação utilizando leveduras, também com a velocidade de crescimento celular e o efeito que estas sofrem por influência das condições do meio em processo (ANDRIETTA, 2007).

2.6.1. Velocidade específica de crescimento (μ)

Este parâmetro é definido como sendo a taxa de crescimento microbiano dividido pela concentração de massa contida no meio e pode ser representado matematicamente pela equação (3)

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \frac{1}{X} r_X \quad (3)$$

Pela equação 3, observa-se que a taxa de crescimento microbiana pode ser relacionada com a velocidade específica de crescimento pela equação (4)

$$r_X = \mu X \quad (4)$$

Para relacionar a velocidade específica de crescimento com as taxas de consumo de substrato e de aparecimento de produto, as relações não são tão simples e necessitam de parâmetros de rendimento de reação denominados Y.

2.6.2. Rendimento em massa celular ($Y_{X/S}$)

Este parâmetro relaciona a quantidade de massa celular produzida em base seca com a quantidade de substrato consumido, sendo sua unidade dada por [g massa seca / g ART]. Este parâmetro é definido matematicamente pela equação (5)

$$Y_{X/S} = \frac{\frac{dX}{dt}}{\frac{dS}{dt}} = \frac{r_X}{r_S} \quad (5)$$

Rearranjando a equação (5), tem-se:

$$r_S = \frac{r_X}{Y_{X/S}} \quad (6)$$

Substituindo a equação (4) na equação (6), tem-se:

$$r_S = \frac{\mu X}{Y_{X/S}} \quad (7)$$

A equação (7) relaciona a velocidade específica de crescimento do microrganismo (μ) com a taxa de consumo de substrato.

2.6.3. Rendimento em produto ($Y_{P/S}$)

Este parâmetro relaciona a massa de produto obtido com a massa de substrato consumida, sendo sua unidade dada por [g etanol / g ART]. Este parâmetro é definido matematicamente pela equação (8)

$$Y_{P/S} = \frac{\frac{dP}{dt}}{-\frac{dS}{dt}} = \frac{r_P}{r_S} \quad (8)$$

Rearranjando a equação (8), tem-se:

$$r_P = Y_{P/S} r_S \quad (9)$$

Substituindo a equação (7) na equação (9), tem-se:

$$r_P = \frac{Y_{P/S}}{Y_{X/S}} \mu X \quad (10)$$

A equação (10) relaciona a taxa de aparecimento de produto com a velocidade de crescimento microbiano (μ). Esta equação é válida em casos onde o crescimento celular está vinculado com o aparecimento do produto.

Os rendimentos em biomassa ($Y_{X/S}$) e em etanol ($Y_{P/S}$) variam de um autor para outro. Lee, Pollard e Coulman (1983), assumem estes valores como sendo 0,06 e 0,375. Daugulis e Swaine (1987) assumem valores destes rendimentos como sendo 0,08 e 0,425. Andrietta e Stuppiello (1990) atribuem a estes, valores de 0,033 e 0,445.

2.7. Modelos cinéticos

Os modelos cinéticos utilizados para descrever a atividade microbiana, segundo Bailey e Ollis (1986), podem ser divididos em:

- Não-estruturados e não-segregados, nos quais a célula de microrganismos é considerada como soluto;
- Estruturados e não-segregados, onde as células são tratadas como indivíduos de múltiplos componentes, porém com composição média semelhante;
- Não-estruturados e segregados, onde as células são tratadas como seres individuais distintos, porém descritos por um único componente; e
- Estruturados e segregados, onde as células de microrganismos são consideradas como indivíduos distintos e formados por múltiplos componentes.

A complexidade da descrição cinética que é requerida e apropriada depende das situações físicas e da aplicação pretendida. Não é possível a formulação de um modelo que inclua todas as características e detalhes celulares. O modelo deve ser formulado a partir de algumas aproximações (STREMEL, 2001).

O tipo de modelo mais encontrado na literatura para descrever a fermentação alcoólica é o tipo não-estruturado e não-segregado. Andrietta (1994) explica que devido a esta complexidade, é pouco aconselhável a utilização de modelos que consideram as células como indivíduos distintos constituídos de vários componentes e que utilizando modelos mais simples, a imprecisão que possa ocorrer é compensada pela facilidade de obtenção e diminuição do número de parâmetros cinéticos necessários.

Os modelos não-estruturados e não-segregados, em sua maioria, baseiam-se na determinação da velocidade específica de crescimento do microrganismo (μ) ou da produção de etanol pelo decréscimo da velocidade específica máxima através de alguns termos de inibição e limitação. (ANDRIETTA, 1994).

A equação mais simples e popular para descrever o crescimento microbiano é a equação de Monod, apresentada na equação (11), que expressa a velocidade específica de crescimento do microrganismo (μ) como uma função da concentração de substrato limitante (S).

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \cdot \frac{S}{(K_S + S)} \quad (11)$$

Onde $\mu_{m\acute{a}x}$ e K_S são, respectivamente, a velocidade específica máxima de crescimento e a constante de Monod.

Esta equação é válida para sistemas onde não há interferências significativas de inibidores, como baixas concentrações de etanol no meio de fermentação (FERREIRA, 1998).

Os fatores considerados como interferentes na velocidade específica de crescimento do microrganismo ou de produção de etanol diferem segundo cada autor.

2.7.1. Termos de inibição

São várias as formas, encontradas na literatura, que relacionam a velocidade específica de crescimento do microrganismo ou de produção de etanol com os fatores de inibição.

Luong (1985) cita as seguintes expressões para o termo de inibição pelo produto (equações 12 a 16):

$$\text{Linear:} \quad \mu = \mu_{m\acute{a}x} \left(1 - \frac{P}{P_{m\acute{a}x}}\right) \quad (12)$$

$$\text{Exponencial:} \quad \mu = \mu_{m\acute{a}x} e^{-k_2 P} \quad (13)$$

$$\text{Hiperbólica:} \quad \mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{1}{1 + \frac{P}{k_3}} \quad (14)$$

$$\text{Parabólica:} \quad \mu = \mu_{m\acute{a}x} \left(1 - \frac{P}{P_{m\acute{a}x}}\right)^{0,5} \quad (15)$$

$$\text{Não linear generalizada:} \quad \mu = \mu_{m\acute{a}x} \left(1 - \frac{P}{P_{m\acute{a}x}}\right)^n \quad (16)$$

A expressão utilizada para descrever o efeito do substrato limitante normalmente segue o modelo de Monod, já descrito na equação (11).

Keller e Dunn (1978), Daugulis e Swaine (1987) e Dourado et al. (1987), utilizaram a seguinte expressão para representar o termo de inibição pelo substrato (equação 17):

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{S}{\left(k_S + S + \frac{S^2}{k_I}\right)} \quad (17)$$

Para o termo de inibição pela concentração celular segundo Chattaway, Goma e Renaud (1988), tem-se a equação (18):

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \left(1 - \frac{X}{X_{m\acute{a}x}}\right) \quad (18)$$

Lee, Pollard e Coulman (1983), Jarzebski, Malinowski e Goma (1989) e Monbouquette (1992) utilizam a equação (19) para representar esta inibição:

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \left(1 - \frac{X}{X_{m\acute{a}x}}\right)^m \quad (19)$$

2.7.2. Modelos mais usados

A multiplicidade de modelos cinéticos que descrevem o crescimento microbiano se deve ao fato de que eles são construídos para uma levedura específica, em condições experimentais pré-definidas (DOURADO et al., 1987).

O modelo de Lee, Pollard e Coulman (1983), que corresponde ao modelo de Tosetto (2002) acrescido de um termo de inibição pela concentração celular, leva em conta inibição pelo substrato, inibição por produto e inibição por concentração celular, conforme descrito na equação (20):

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \left(\frac{S}{k_S + S + \frac{S^2}{k_I}} \right) \left(1 - \frac{P}{P_{max}}\right)^n \left(1 - \frac{X}{X_{m\acute{a}x}}\right)^m \quad (20)$$

O modelo proposto por Tosetto (2002) e acrescido de um termo de inibição pela concentração celular, é semelhante ao modelo proposto na equação (20), porém para 2 fontes de substrato (glicose e frutose), já que a sacarose não chega a ser detectada nos vinhos pois a hidrólise desta é muito rápida, convertendo-a em glicose e frutose (BIOCONTAL(b), 2013), e considera, para a frutose, um termo de restrição. Esta restrição dá-se pelo fato de a levedura ter uma maior afinidade do transportador de hexose pela glicose, em comparação com a frutose, sendo esta

última, consumida de forma mais lenta que a glicose. A equação (21) corresponde ao modelo para a glicose (semelhante à equação (20)) e a equação (22) corresponde ao modelo para a frutose:

$$\mu_G = \mu_{máx_G} \left(\frac{G}{k_G + G + \frac{G^2}{k_{I_G}}} \right) \left(1 - \frac{P}{P_{máx_G}} \right)^{n_G} \left(1 - \frac{X}{X_{máx_G}} \right)^{m_G} \quad (21)$$

$$\mu_F = \mu_{máx_F} \left(1 - \frac{G}{F} \right) \left(\frac{F}{k_F + F + \frac{F^2}{k_{I_F}}} \right) \left(1 - \frac{P}{P_{máx_F}} \right)^{n_F} \left(1 - \frac{X}{X_{máx_F}} \right)^{m_F} \quad (22)$$

2.8. Modelagem de um reator de mistura perfeita operando em batelada alimentada

A Figura 10 mostra esquematicamente um reator de mistura perfeita operando em batelada alimentada. Este reator pode ser modelado através de balanço de massa global, de célula, substrato e produto.

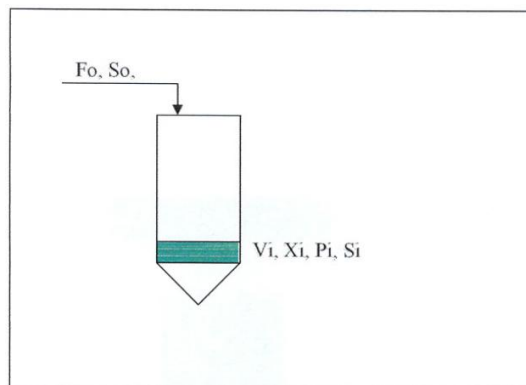


Figura 10 – Representação esquemática de um reator de mistura operando em batelada alimentada (ANDRIETTA, 2007).

2.8.1. Balanço de massa global

Considerando a vazão de alimentação de substrato F_0 e a concentração de ART no mesmo S_0 , temos a equação (23):

$$\frac{d(\rho V)}{dt} = F_0 \rho_0 \quad (23)$$

Considerando a densidade do meio de fermentação constante durante o processo e igual à da alimentação de substrato, pode-se escrever a equação (23) como a representada pela equação (24):

$$\frac{dV}{dt} = F_0 \quad (24)$$

A equação (24) mostra que a variação do nível do reator é uma função da vazão de enchimento.

2.8.2. Balanço de célula

Considerando que o mosto é estéril e empregando a equação (4), tem-se a equação (25):

$$\frac{d(XV)}{dt} = r_X V = \mu X V \quad (25)$$

2.8.3. Balanço de substrato

Para o balanço de substrato, utilizando a equação (7), tem-se a equação (26):

$$\frac{d(SV)}{dt} = F_0 S_0 - r_S V = F_0 S_0 - \frac{\mu X V}{Y_{X/S}} \quad (26)$$

2.8.4. Balanço de produto

Considerando que a concentração de produto na linha de alimentação é zero, e utilizando a equação (10), tem-se a equação (27):

$$\frac{d(PV)}{dt} = r_P V = \frac{Y_{P/S}}{Y_{X/S}} \mu X V \quad (27)$$

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Condições experimentais

Os ensaios foram realizados no setor de fermentação da planta industrial da Usina Catanduva, Ariranha/SP/Brasil, no segundo semestre da safra 2012/2013 (entre os meses de setembro a novembro).

Os experimentos foram realizados nos biorreatores (dornas de fermentação) da usina, que contém 7 dornas em sua planta industrial. A capacidade média de cada biorreator é de 1.200.000 litros. O substrato da fermentação foi o mosto que estava em processo, proveniente de uma mistura de caldo de cana e mel residual da produção de açúcar, e as leveduras utilizadas foram as que estavam presentes no processo industrial durante os ensaios (cariotipagem das leveduras em processo nessa unidade industrial e nesse período indicam a presença de leveduras nativas e de outras *Saccharomyces*).

O processo industrial foi adaptado às condições experimentais de concentração de fermento (no pé de cuba), temperatura e tempo de alimentação dos ensaios (conforme descrito na Tabela 1).

As análises tecnológicas dos vinhos obtidos das fermentações, quanto à concentração de células, de etanol e de glicerol foram realizadas no Laboratório de Etanol da própria usina, segundo metodologia Fermentec (2012), CTC (2011) e Fermentec (2012), respectivamente; as análises de vinho e mosto quanto aos substratos sacarose, glicose e frutose foram realizadas nos Laboratórios da Divisão de Biotecnologia e Processos do CPQBA/UNICAMP e determinadas por cromatografia de alta performance (HPLC).

3.2. Delineamento experimental

Segundo Neto, Scarminio e Bruns (2003), utilizando o planejamento fatorial baseado em princípios estatísticos, pode-se extrair do sistema em estudo o máximo de informação útil, fazendo um número mínimo de experimentos. Este método

consiste em selecionar um número fixo de níveis para cada uma das variáveis de entrada. Então realizam-se experimentos com todas as possíveis combinações. A primeira etapa é usualmente um planejamento fatorial com dois níveis (nível -1 e nível +1) para cada variável. Assim, para n variáveis envolvidas, o número de experimentos que deve ser realizado para investigar todas as combinações é 2^n . Para estimativa do erro experimental associado aos ensaios, são realizados três ensaios no ponto central correspondente às condições intermediárias (BOX et al., 1978) citado por (VIEGAS, 1999).

O delineamento experimental foi realizado adotando-se 11 ensaios, seguindo um planejamento experimental fatorial de 2 níveis (valor máximo e valor mínimo da variável) e 3 variáveis (concentração de fermento, temperatura e tempo de alimentação do biorreator). Os oito primeiros ensaios corresponderam ao modelo linear (2^3), seguidos por 3 repetições no ponto central (cujo valor de cada variável foi escolhido baseado nos valores médios usados no processo industrial da usina onde realizaram-se os ensaios) para a estimativa do erro experimental. A sequência dos experimento determinada pelas condições operacionais da usina. Estas informações estão contidas na Tabela 1.

Tabela 1 – Condições Experimentais aplicadas nas fermentações quanto às variáveis: tempo de alimentação (TA), temperatura (T) e concentração de levedo (CL).

Ensaio	TA (h)	T (°C)	CL (%)	ordem
1	7	37	30	10
2	5	37	30	11
3	7	37	20	5
4	5	37	20	4
5	7	34	30	8
6	5	34	30	6
7	7	34	20	7
8	5	34	20	9
9	6	35,5	25	1
10	6	35,5	25	2
11	6	35,5	25	3

Os ensaios 9, 10 e 11 correspondem ao ponto central (onde foram feitas 3 repetições que determinaram o erro experimental); os valores das variáveis no ponto central foram aqueles mais praticados no processo industrial daquela usina, no período em que os ensaios foram iniciados (tempo de alimentação de 6 horas, temperatura de 35,5°C e concentração de fermento de 25%). Nos demais ensaios (1 a 8) variaram-se, o tempo de alimentação em 1 hora a mais e uma hora a menos em relação ao ponto central, a temperatura em 1,5°C a mais e 1,5°C a menos em relação ao ponto central, e a concentração de fermento em 5% a mais e 5% a menos.

3.3. Coleta das amostras

Em cada ensaio foram coletadas amostras de mosto e do vinho desde o momento inicial de alimentação do biorreator, até o final da fermentação (antes do vinho ser enviado à etapa de centrifugação), com intervalo de 1 hora entre as coletas. Todas as fermentações foram conduzidas durante 9 horas. As vazões durante as coletas, os volumes iniciais de pé de cuba e os volumes finais das dornas foram determinados.

As amostras de vinho e mosto foram coletadas em tubo de Falcon de 50mL e congeladas com nitrogênio líquido de forma a paralisar a atividade biológica dos microrganismos presentes. Em cada ponto de amostragem foram coletados 3 tubos de material, sendo que, o 1º tubo de cada coleta foi analisado no Laboratório de Etanol da usina Catanduva, o 2º tubo de cada coleta foi analisado nos Laboratórios da Divisão de Biotecnologia e Processos do CPQBA/UNICAMP e o 3º tubo foi mantido como reserva caso houvesse necessidade de repetir alguma análise. Os mostos coletados de cada ensaio foram analisados apenas na UNICAMP, pois apresentam em sua composição apenas os substratos da fermentação.

3.4. Análise das amostras

- Determinação de sacarose, glicose e frutose por cromatografia de alta performance (HPLC) no equipamento Dionex, através de detector de

amperometria pulsada (PAD) com célula de ouro, com coluna PA100 e eluente hidróxido de sódio a 0,1mmol.

- Determinação da concentração de células por centrifugação, segundo metodologia FERMENTEC (2012).
- Determinação da concentração de etanol por densimetria eletrônica, segundo metodologia CTC (2011).
- Determinação da concentração de glicerol pelo método enzimático e análise em espectrofotômetro, segundo metodologia FERMENTEC (2012).

3.5. Cálculo do coeficiente de relação de massa de glicerol e massa de etanol ($Y_{G/P}$) de cada ensaio e análise da interferência das variáveis testadas neste coeficiente

Com os dados de concentração de etanol e de glicerol, e os volumes obtidos em cada ponto amostral (descontando-se o etanol presente no pé de cuba, já que a fermentação em batelada alimentada tem reciclo de células, que podem também arrastar etanol da fermentação anterior), foram calculadas as massas de produto ao longo do tempo e, através de correlações lineares destas variáveis, obtiveram-se os coeficientes $Y_{G/P}$ para cada experimento, e, através de análise estatística, determinou-se como as variáveis operacionais testadas interferem neste parâmetro.

3.6. Cálculo do rendimento em células ($Y_{X/S}$), rendimento em etanol ($Y_{P/S}$) e produtividade de cada fermentação e análise da interferência das variáveis testadas nestes parâmetros

Os rendimentos $Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$ e Produtividade em etanol, foram calculados pelas equações (28) a (30) descritas abaixo:

$$Y_{X/S} = \frac{\text{(células produzidas)}}{\text{(ART consumido)}} \quad (28)$$

$$Y_{P/S} = \frac{(\text{etanol produzido})}{(\text{ART consumido})} \quad (29)$$

$$\text{Produtividade} = \frac{(\text{etanol produzido})}{(\text{tempo de fermentação}) \cdot (\text{Volume})} \quad (30)$$

Onde, para os ensaios cujas análises de sacarose, glicose e frutose foram feitas em todos os pontos de coleta, utilizou-se a equação (31):

$$\text{ART consumido} = (\text{massa ART entrado} - \text{massa ART residual}) \quad (31)$$

Para os ensaios em que foram analisados quanto à concentração de substratos apenas os mostos, utilizou-se a equação simplificada (32), já que o termo “massa de ART residual” é muito pequeno, permitindo essa simplificação.

$$\text{ART consumido} = \text{massa ART entrado} \quad (32)$$

Tosetto (2002) realizando fermentações com méis de processos industriais de diferentes usinas, encontrou valores de produtividade em etanol entre 6,85 e 9,88 g/L.h, enquanto Ferreira (2005), fermentando meios sintéticos em regime de batelada alimentada, encontrou valores entre 5,97 e 9,6 g/L.h.

Através de análise estatística determinou-se como as variáveis operacionais testadas interferem nestes parâmetros.

3.7. Desenvolvimento do modelo e ajuste dos parâmetros cinéticos

Com os perfis de concentração de substratos (S), produtos (P) e células (X) e o volume dos biorreatores (dornas), iniciou-se o trabalho de desenvolvimento dos modelos matemáticos que descrevem o comportamento cinético da levedura. Este desenvolvimento foi baseado em alguns modelos existentes na literatura, nos quais foram introduzidos novos termos com o objetivo de adequar os modelos ao processo em questão. Estes modelos foram desenvolvidos para determinar a velocidade específica de crescimento da levedura (μ) em função das condições do meio de

cultivo levando-se em consideração que as fontes de carboidratos são os substratos limitantes, estando os demais em excesso.

Como o etanol é um metabólito primário, ou seja, sua produção está vinculada com o metabolismo de obtenção de energia das células, sua obtenção está vinculada ao crescimento celular. Sendo assim, sabendo-se a velocidade específica de crescimento das células foi possível obter as equações para a velocidade de consumo específico de cada substrato - glicose e frutose - e para a velocidade específica de produção de etanol.

Após o desenvolvimento dos modelos matemáticos, os mesmos foram ajustados aos dados experimentais utilizando-se uma Rotina de Ajuste.

O cálculo dos parâmetros para cada modelo da Rotina de Ajuste está baseado na minimização da somatória dos desvios quadrados (equação 33), isto é, para encontrar os parâmetros que melhor se ajustem ao(s) modelo(s), a somatória dos desvios quadrados deve ser a menor possível.

$$D = \sum_{i=1}^N (x_i - x_e)^2 \quad (33)$$

Onde:

N = número de pontos

x_i = dados calculados pelo modelo

x_e = dados experimentais

Foram realizados dois ensaios para validação do modelo. Estes ensaios correspondem ao ensaio 1 e ao ensaio 8, cujas condições experimentais são as extremas em termos das variáveis testadas e apresentam-se na Tabela 1.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Perfil fermentativo

Considerando-se as condições em que os experimentos foram desenvolvidos, a Tabela 2 apresenta as concentrações de produtos em função do tempo para cada ensaio realizado.

Tabela 2 - Concentrações de etanol (E) e glicerol (G) ao longo do tempo (t), para cada ensaio realizado.

t (h)	Ensaio 1		Ensaio 2		Ensaio 3		Ensaio 4		Ensaio 5		Ensaio 6	
	E (g/L)	G (g/L)	E (g/L)	G (g/L)	E (g/L)	G (g/L)	E (g/L)	G (g/L)	E (g/L)	G (g/L)	E (g/L)	G (g/L)
0h	39,29	1,08	40,08	1,77	33,93	1,39	23,67	1,19	32,82	1,69	33,30	1,64
1h	38,50	1,03	34,72	1,66	35,66	1,62	31,24	1,73	35,98	1,77	35,35	1,82
2h	53,97	1,42	46,08	2,00	41,03	1,99	40,08	2,39	39,77	2,32	41,03	2,16
3h	55,23	1,63	44,50	2,22	41,66	1,90	44,82	2,66	48,29	2,49	46,71	2,43
4h	58,78	1,71	49,86	2,60	47,02	2,27	45,76	2,67	60,91	2,70	48,29	2,40
5h	62,02	1,85	53,65	2,68	48,29	2,20	51,76	2,94	63,28	2,70	50,50	2,57
6h	63,12	2,13	56,81	2,95	50,89	2,63	54,91	3,07	64,38	2,89	62,80	3,09
7h	71,96	2,40	59,02	2,76	60,60	2,59	65,96	3,60	67,85	2,89	72,59	3,59
8h	70,69	2,38	70,69	3,36	66,91	2,95	67,54	3,77	71,96	3,10	67,85	3,63
9h	74,17	2,39	77,95	3,58	71,01	3,08	69,12	3,83	70,06	3,04	68,49	3,64
t (h)	Ensaio 7		Ensaio 8		Ensaio 9		Ensaio 10		Ensaio 11			
	E (g/L)	G (g/L)	E (g/L)	G (g/L)	E (g/L)	G (g/L)	E (g/L)	G (g/L)	E (g/L)	G (g/L)		
0h	16,41	0,90	22,09	1,17	31,24	1,61	30,77	1,08	34,40	1,90		
1h	22,72	1,35	37,24	1,78	31,88	1,66	32,51	1,32	36,93	1,65		
2h	39,77	2,18	34,72	1,92	34,72	2,14	45,76	2,15	47,34	2,10		
3h	42,92	2,40	39,77	2,51	44,50	2,43	51,76	2,49	52,86	2,60		
4h	46,71	2,58	41,03	2,71	53,02	2,99	56,81	2,61	57,75	2,79		
5h	49,86	2,67	49,55	2,64	57,75	3,15	59,96	2,89	59,96	2,94		
6h	54,28	2,72	60,60	3,36	61,86	3,27	62,33	3,01	58,39	2,90		
7h	56,49	2,89	63,75	3,65	68,49	3,58	64,70	3,24	64,07	3,17		
8h	60,91	3,13	72,90	3,89	70,69	3,83	69,43	3,45	70,38	3,48		
9h	66,91	3,37	75,11	3,74	74,17	4,04	71,80	3,57	71,01	3,33		

As concentrações de produtos, em todos os ensaios realizados apresentam-se crescentes ao longo do tempo e os valores tendem a estabilizar-se ao final de

cada fermentação, conforme o esperado, em virtude do esgotamento do substrato que foi totalmente convertido em produtos.

4.2. Relação de produção entre glicerol e etanol ($Y_{G/P}$)

Com as massas de etanol e glicerol, que são calculadas pelas concentrações de produto e volume dos biorreatores em cada ponto amostral, foi possível obter o coeficiente de relação de massa de glicerol e massa de etanol ($Y_{G/P}$). Este coeficiente é obtido da regressão linear entre as massas de etanol e glicerol para cada ensaio. A obtenção destes resultados encontra-se exemplificada no Apêndice A, Tabela A.1 e Figura A.1.

A Tabela 3 apresenta a equação de regressão linear obtida para cada ensaio, o coeficiente de determinação (R^2) das regressões e o coeficiente $Y_{G/P}$.

Tabela 3 - Equação da regressão linear, coeficiente de determinação e coeficiente $Y_{G/P}$ para cada ensaio.

	Equação da regressão	R^2	$Y_{G/P}$ (g/g)
Ensaio 1	$y = 0,0332.x$	0,987	0,033
Ensaio 2	$y = 0,0490.x$	0,979	0,049
Ensaio 3	$y = 0,0457.x$	0,974	0,046
Ensaio 4	$y = 0,0567.x$	0,995	0,057
Ensaio 5	$y = 0,0425.x$	0,981	0,043
Ensaio 6	$y = 0,0516.x$	0,991	0,052
Ensaio 7	$y = 0,0513.x$	0,993	0,051
Ensaio 8	$y = 0,0545.x$	0,964	0,055
Ensaio 9	$y = 0,0543.x$	0,995	0,054
Ensaio 10	$y = 0,0508.x$	0,998	0,051
Ensaio 11	$y = 0,0476.x$	0,993	0,048

Pelos dados dos coeficientes de determinação (R^2) contidos na Tabela 3, observa-se que a regressão linear estimou com alta significância a correlação entre os dados de massa de etanol e massa de glicerol para todos os ensaios realizados. Isso ilustra que a produção de glicerol é uma rota necessária para suplementar a regeneração de NAD durante a fermentação alcoólica, já que esta regeneração

fornecida somente pela produção de etanol é insuficiente para suprir as necessidades da levedura (BIOCONTAL(a), 2013; OURA, 1977).

Observou-se também que embora os valores de $Y_{G/P}$ obtidos sejam constantes para cada ensaio, eles diferem-se entre os ensaios realizados, mostrando que diferentes condições operacionais interferem na formação de glicerol durante a fermentação alcoólica (BEROVIC et al., 2006).

Os valores de $Y_{G/P}$ obtidos para os ensaios, variou entre 0,033 e 0,057 g glicerol/g etanol, estando em conformidade com dados apresentados na literatura (OURA, 1977).

4.3. Efeito das variáveis estudadas sobre a relação de produção de glicerol e etanol ($Y_{G/P}$)

A Tabela 4 apresenta a análise estatística do efeito das variáveis estudadas no coeficiente $Y_{G/P}$, para um modelo de primeira ordem.

Tabela 4 – Análise de todas as interações em um planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central para $Y_{G/P}$

	Efeito	Erro	t (2)	P
SG ⁽¹⁾	AVG	0,049 ± 0,000905	54,17	0,0003
SG ⁽¹⁾	TA ⁽²⁾	-0,01 ± 0,002121	4,714	0,0422
	T ⁽³⁾	-0,004 ± 0,002121	1,886	0,2
	CL ⁽⁴⁾	-0,008 ± 0,002121	3,771	0,0637
	TA/T	-0,0035 ± 0,002121	1,65	0,2407
	TA/CL	-0,0025 ± 0,002121	1,179	0,3598
	T/CL	-0,0025 ± 0,002121	1,179	0,3598
	TA/T/CL	0 ± 0,002121	0	1
Nível de significância (α) = 0,05				
⁽¹⁾ Houve variância significativa ⁽²⁾ TA: tempo de alimentação ⁽³⁾ T: temperatura ⁽⁴⁾ CL: concentração de levedo				

É possível afirmar com nível de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$) que a única variável estudada que possuiu efeito significativo sobre $Y_{G/P}$ foi o tempo de alimentação. Esta variável teve efeito inversamente proporcional sobre $Y_{G/P}$, ou seja, quando o tempo de alimentação aumentou, $Y_{G/P}$ diminuiu. A concentração de

fermento, apesar de não apresentar significância ao nível de 95%, também teve efeito inversamente proporcional sobre $Y_{G/P}$, o que pode ser evidenciado pelo valor elevado de t na Tabela 4. A temperatura não afetou significativamente $Y_{G/P}$. Tanto o tempo de alimentação reduzido, o qual aumenta a velocidade de alimentação do mosto, quanto a menor concentração de células podem representar maior concentração de substrato, principalmente, no início da fermentação. Essa maior concentração de substrato aumenta a pressão osmótica do meio, aumentando a produção de glicerol pelas leveduras durante o processo fermentativo (NEVOIGT; STAHL, 1997).

4.4. Rendimentos $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$

As concentrações de células, obtidas em cada ponto amostral dos vinhos coletados de cada experimento foram comprometidas. Considerando-se que células são sólidos insolúveis, a amostragem fica comprometida pela falta de homogeneidade do material amostrado, além de poderem sofrer ruptura da membrana celular durante o congelamento, interferindo nos resultados. Ainda podemos ter sólidos solúveis que podem ficar no meio e alterar o valor, ou ainda, se lavarmos para remover estes sólidos, podemos remover material intracelular.

Devido a esses motivos, as concentrações celulares não foram coerentes e não puderam ser utilizadas para o cálculo do rendimento $Y_{X/S}$.

A Tabela 5 apresenta as concentrações de sacarose, glicose e frutose obtidas para os mostos de cada experimento através de análise cromatográfica de alta performance (HPLC) e os cálculos de ART para cada mosto, calculados pela equação (34):

$$ART = glicose + frutose + \frac{sacarose}{0,95} \quad (34)$$

Tabela 5 – Concentrações de glicose (Gli), frutose (Fru) e sacarose (Sac) e ART total, do mosto de cada ensaio realizado.

Ensaio	Gli (g/L)	Fru (g/L)	Sac (g/L)	ART (g/L)
1	6,45	6,56	184,33	207,03
2	8,29	8,56	183,98	210,51
3	10,27	9,58	185,48	215,09
4	10,61	9,65	186,54	216,62
5	7,32	7,05	194,89	219,53
6	7,57	7,73	185,04	210,08
7	6,81	6,56	187,48	210,72
8	7,12	7,38	183,18	207,32
9	9,89	9,61	197,57	227,47
10	9,79	9,30	194,84	224,18
11	9,85	9,40	191,19	220,49

Com as massas de etanol produzido e ART consumido (sendo este obtido pela simplificação citada na equação 32), que são calculadas pelas concentrações de produto e substrato e volume dos biorreatores em cada ponto amostral, foi possível obter o rendimento em álcool ($Y_{P/S}$) para cada experimento, conforme cálculo demonstrado pela equação (29) e exemplificado no Apêndice A, Tabela A.2.

A Tabela 6 apresenta os rendimentos $Y_{P/S}$ para cada ensaio realizado.

Tabela 6 - Rendimentos $Y_{P/S}$ de cada ensaio.

	$Y_{P/S}$ (g/g)
Ensaio 1	0,411
Ensaio 2	0,429
Ensaio 3	0,393
Ensaio 4	0,389
Ensaio 5	0,378
Ensaio 6	0,389
Ensaio 7	0,406
Ensaio 8	0,448
Ensaio 9	0,392
Ensaio 10	0,374
Ensaio 11	0,375

Os dados de $Y_{P/S}$ calculados para cada experimento são inferiores ao valor máximo teórico de conversão (que é de 0,511g/g) e inferiores também a valores citados por Lima e Marcondes (2002) e Lima, Basso e Amorim (2001), que é de 90% do valor teórico para fermentações industriais (0,46 g/g). Entretanto, os valores obtidos de $Y_{P/S}$ estão próximos de valores citados por outros autores, como Lee, Pollard e Coulman (1983), que é de 0,375 e Daugulis e Swaine (1987), que é de 0,425. Estes valores mais baixos do que os encontrados nas literaturas mais recentes, podem ser explicados pela dificuldade de amostragem e também, por uma dificuldade de mensuração de volume dos biorreatores. Essas medidas são muito imprecisas dificultando o balanço de massa do processo e os cálculos de rendimentos.

O ensaio 8 apresentou o rendimento $Y_{P/S}$ mais alto, o que não condiz com o esperado, já que este ensaio apresentava condições experimentais de menores valores de: tempo de alimentação, temperatura e concentração de fermento (5 horas, 34°C e 20%). E de acordo com a literatura, tempos de alimentação reduzidos correspondem a maiores velocidades de alimentação, que por sua vez, propiciam maiores produções de ácido succínico e glicerol, diminuindo o rendimento em etanol (MARTINEZ, 2007; VASCONCELOS; VALDMAN, 1988), situação ainda mais agravada quando a concentração de fermento está baixa, elevando a concentração de substratos no meio, e promovendo maior inibição pelo substrato (ANGELIS, 1992).

Isso nos leva a considerar que houve algum erro no valor obtido de $Y_{P/S}$ para o experimento 8, podendo ser por problemas de amostragem, ou na análise de ART no mosto, análise do teor alcoólico das amostras de vinho, ou mesmo problemas de medição de volume ou vazão de alimentação não constante.

Em dois ensaios, onde foram analisadas todas as amostras de vinho quanto aos substratos presentes, utilizou-se a equação (31) para calcular o ART consumido. A Tabela 7 apresenta os dados de ARTconsumido comparando as equações 31 e 32 (com simplificação) e os $Y_{P/S}$ obtidos utilizando-se os dois ARTconsumido por equações diferentes.

Tabela 7 - ART consumido (ARTcons) calculado pelas equações 31 e 32 e seus respectivos rendimentos em etanol ($Y_{P/S}$).

	ARTcons. (kg)			$Y_{P/S}$ (g/g)		
	Eq. 31	Eq. 32 (simplificada)	Var (%)	Eq. 31	Eq. 32 (simplificada)	Var (%)
Ensaio 1	119.696,2	120.183,9	0,4%	0,413	0,411	-0,4%
Ensaio 8	110.974,3	111.643,8	0,6%	0,451	0,448	-0,6%

A Tabela 7 ilustra que não há problemas em considerar o ARTconsumido como sendo apenas o ARTentrado (equação 32), já que o ARTresidual é muito pequeno e não impacta significativamente nem o ARTconsumido nem o rendimento em álcool ($Y_{P/S}$).

4.5. Efeito das variáveis estudadas sobre o rendimento em etanol ($Y_{P/S}$)

A Tabela 8 apresenta a análise estatística do efeito das variáveis estudadas no coeficiente $Y_{P/S}$, para um modelo de primeira ordem.

Tabela 8 – Análise de todas as interações em um planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central para $Y_{P/S}$

	Efeito	Erro	t (2)	P
SG ⁽¹⁾	AVG	0,3985 ± 0,00297	134	6E-05
	TA ⁽²⁾	-0,017 ± 0,00698	2,42	0,137
	T ⁽³⁾	-1E-04 ± 0,00698	0,01	0,99
	CL ⁽⁴⁾	-0,007 ± 0,00698	1,03	0,411
	TA/T	0,0099 ± 0,00698	1,42	0,291
	TA/CL	0,0024 ± 0,00698	0,35	0,76
SG ⁽¹⁾	T/CL	0,0364 ± 0,00698	5,22	0,035
	TA/T/CL	-0,013 ± 0,00698	1,93	0,193

Nível de significância (α) = 0,05

⁽¹⁾Houve variância significativa ⁽²⁾TA: tempo de alimentação ⁽³⁾T: temperatura ⁽⁴⁾CL: concentração de levedo

Pela análise estatística dos dados, é possível afirmar com nível de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$) que a interação entre as variáveis temperatura e concentração de levedo possuiu efeito significativo sobre $Y_{P/S}$. Se a temperatura da fermentação foi alta, mas dentro de uma faixa de valor suportável pela levedura, ao invés de comprometer a fermentação, conforme citado na revisão bibliográfica, o ciclo fermentativo pode ter sido acelerado. A quantidade de trealose e glicogênio aumenta e, quando a alimentação cessa, o fermento pode converter esses açúcares de reserva em etanol, elevando o rendimento da fermentação. Isso pode ocorrer no ciclo considerado. O fermento pode apresentar efeitos nocivos de temperaturas mais altas na fermentação seguinte (o que não foi captado por estes ensaios).

4.6. Produtividade em etanol

Ao final de 9 horas de fermentação, com as massas de etanol produzidas em cada experimento e o volume final de vinho nos biorreatores (conforme descrito na equação 30), obtiveram-se as produtividades em etanol para cada ensaio realizado. O detalhamento de como esses valores foram obtidos constam no Apêndice A, Tabela A.2. Estes dados apresentam-se na Tabela 9:

Tabela 9 - Produtividade em etanol de cada ensaio.

	Produtividade (g/L.h)
Ensaio 1	7,20
Ensaio 2	7,57
Ensaio 3	6,89
Ensaio 4	7,02
Ensaio 5	6,84
Ensaio 6	6,60
Ensaio 7	6,94
Ensaio 8	7,73
Ensaio 9	7,34
Ensaio 10	7,20
Ensaio 11	6,96

Os valores de produtividade obtidos para os ensaios, variaram entre 6,6 e 7,7 g/L.h, valores condizentes com dados encontrados na literatura para bateladas

alimentadas, que foi na faixa de 6,85 a 9,88 g/L.h (TOSETTO, 2002), ou na faixa de 5,97 a 9,6 g/L.h (FERREIRA, 2005).

4.7. Efeito das variáveis estudadas sobre a produtividade em etanol

A Tabela 10 apresenta a análise estatística do efeito das variáveis estudadas na produtividade em etanol, para um modelo de primeira ordem.

Tabela 10 – Análise de todas as interações em um planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central para Produtividade em etanol

	Efeito	Erro	t (2)	p
SG ⁽¹⁾	AVG	7,118 ± 0,05849	122	7E-05
	TA ⁽²⁾	-0,261 ± 0,13716	1,9	0,197
	T ⁽³⁾	0,1419 ± 0,13716	1,03	0,41
	CL ⁽⁴⁾	-0,093 ± 0,13716	0,68	0,569
	TA/T	0,0082 ± 0,13716	0,06	0,958
	TA/CL	0,2002 ± 0,13716	1,46	0,282
	T/CL	0,5214 ± 0,13716	3,8	0,063
	TA/T/CL	-0,315 ± 0,13716	2,29	0,149

Nível de significância (α) = 0,05

⁽¹⁾Houve variância significativa ⁽²⁾TA: tempo de alimentação ⁽³⁾T: temperatura ⁽⁴⁾CL: concentração de levedo

Nenhum dos efeitos ou interações das variáveis afetou significativamente a produtividade do processo. Esperava-se que a temperatura e a concentração de levedo mostrassem efeito significativo (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001; ANGELIS, 1992), o que não ocorreu. A variação no valor deste parâmetro nas repetições do ponto central podem ter prejudicado a análise dos efeitos entre os experimentos, ou ainda problemas com a análise de teor alcoólico do ensaio 8.

4.8. Ajuste do modelo cinético

A modelagem cinética foi desenvolvida através das equações (24) a (27), para um biorreator operando em batelada alimentada, e o valor de μ foi estimado por 2 diferentes modelos, que levam em conta inibição por substrato, por células e por produto, diferenciando-se por considerarem um ou dois substratos na alimentação.

O perfil de concentração de substratos, produtos e células, para cada modelo utilizado, encontram-se nas Figuras 11 e 12:

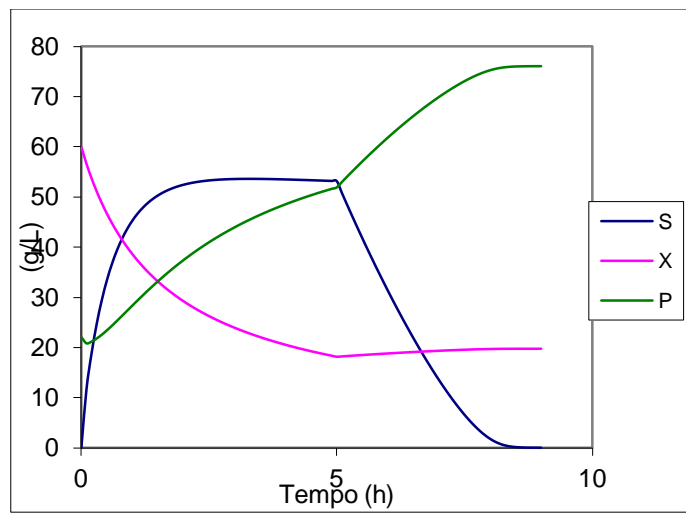


Figura 11 – Perfis de concentração de substrato (S), produto (P) e células (X) para uma fermentação realizada em biorreator operado em batelada alimentada – considerando apenas 1 substrato - ART (equação 20).

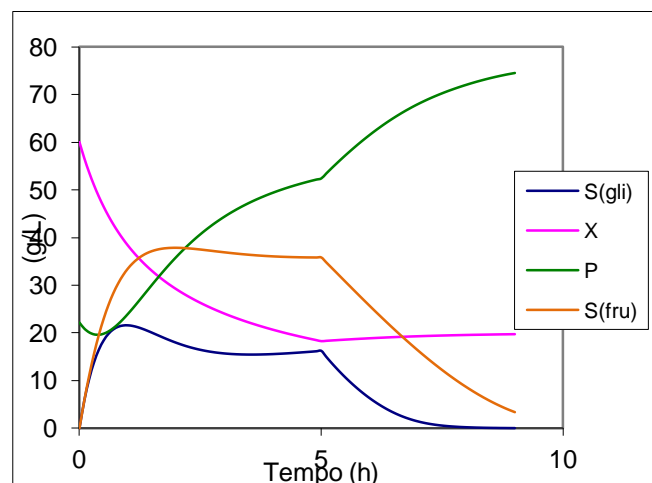


Figura 12 – Perfis de concentração de glicose (S(gli)), frutose (S(fru)), produto (P) e células (X) para uma fermentação realizada em biorreator operado em batelada alimentada – considerando 2 substratos – glicose e frutose (equações 21 e 22).

As Figuras 13 e 14 apresentam o ajuste das curvas de concentração de substrato (ART) e produto (etanol) aos pontos experimentais, para o modelo cinético que considera apenas um substrato (equação 20), para os dois ensaios simulados.

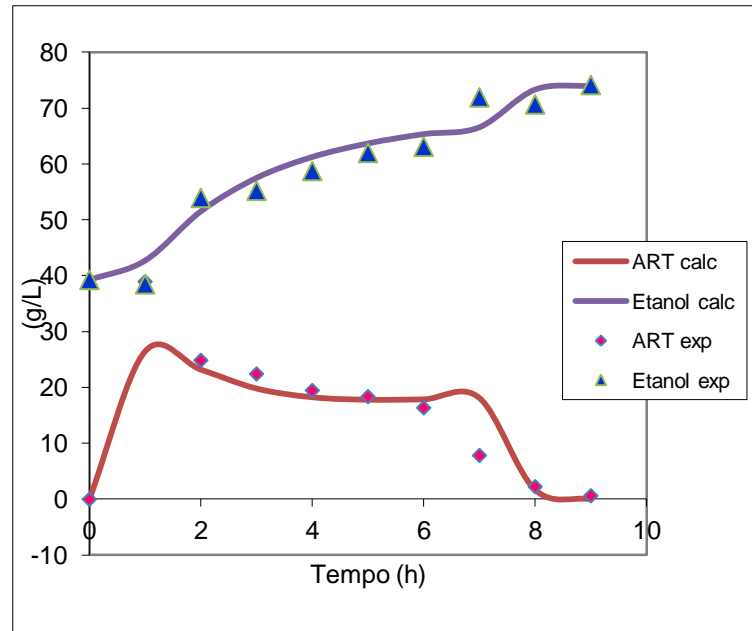


Figura 13 – Ajustes aos dados experimentais do ensaio 1, utilizando o modelo cinético para um substrato.

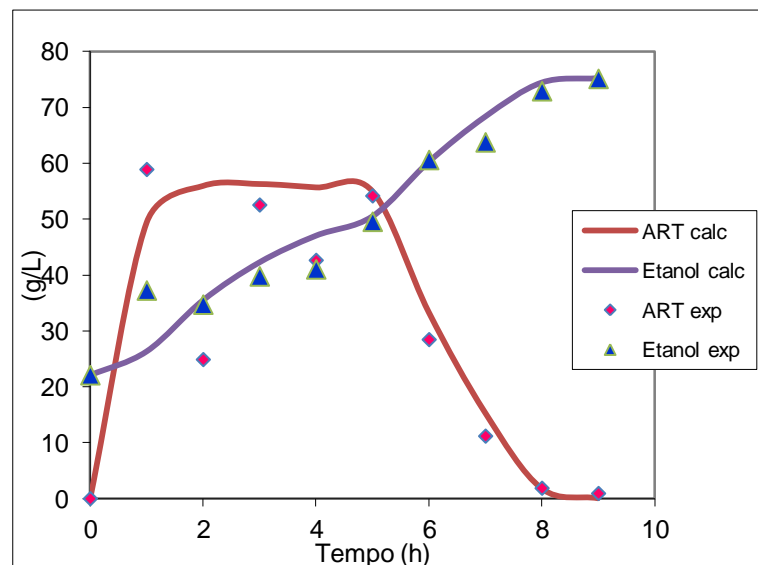


Figura 14 – Ajustes aos dados experimentais do ensaio 8, utilizando o modelo cinético para um substrato.

As fermentações dos ensaios 1 e 8 apresentam perfis de concentração de ART e etanol parecidas, porém com faixas de valores para o ART diferentes. Nota-se que no ensaio 1, cuja alimentação foi feita de forma mais lenta (tempo de alimentação = 7h) e havia muito fermento na dorna (concentração de levedo = 30%), as concentrações de ART ficaram mais baixas quando comparadas ao ensaio 8 (com condições experimentais opostas). Nos dois ensaios, nota-se que 9 horas de fermentação foi suficiente para consumir todo o substrato alimentado (o fim das fermentações ocorreu próximo a 8 horas de fermentação).

A Tabela 11 apresenta os valores dos parâmetros cinéticos que foram usados para os dois ensaios simulados, para o modelo cinético que considera apenas um substrato:

Tabela 11 - Resultados dos parâmetros cinéticos para o modelo que considera apenas um substrato (modelo de Lee, Pollard e Coulman).

	K_S	K_I	$P_{m\acute{a}x}$	n	$X_{m\acute{a}x}$	m	Desvio
Ensaio 1	3,0	40	105	2,2	100	1,2	354,87
Ensaio 8	1,5	55	105	2,0	70	1,8	1469,40

Os valores de n e m obtidos para os ensaios simulados mostram que a inibição por produto e a inibição celular não são lineares (n e $m \neq 1$). Os valores de K_S e K_I estão consistentes. Segundo Rehm e Reed (1985), o valor de K_S deve corresponder à concentração de substrato para que a velocidade específica de crescimento seja igual à metade do valor máximo e K_I deve corresponder à concentração de substrato onde se inicia a inibição pelo mesmo; assim, K_I jamais poderia ser menor que K_S , conforme ocorreu com os parâmetros obtidos.

O valor do desvio do ensaio 8 ficou prejudicado por um ponto experimental inconsistente na análise de ART, na segunda hora de fermentação; se desconsiderarmos este ponto experimental, o desvio reduz-se para o valor de 503,01, valor mais coerente e mais próximo ao obtido para o ensaio 1.

Entretanto o valor de $X_{m\acute{a}x}$, que é uma característica da linhagem da levedura, não deveria variar entre os ensaios, embora não é possível garantir que estávamos

com as mesmas leveduras nos 2 ensaios, pois conforme a cariotipagem realizada na época dos ensaios, já estávamos com mais de uma linhagem em processo.

O modelo utilizado é flexível, se ajusta bem aos pontos experimentais, mas apresenta algumas inconsistências quando se variam parâmetros de processo.

As Figuras 15 e 16 apresentam o ajuste das curvas de concentração dos substratos (glicose e frutose) e produto (etanol) aos pontos experimentais, para o modelo cinético que considera dois substratos (equações 21 e 22), para os dois ensaios simulados.

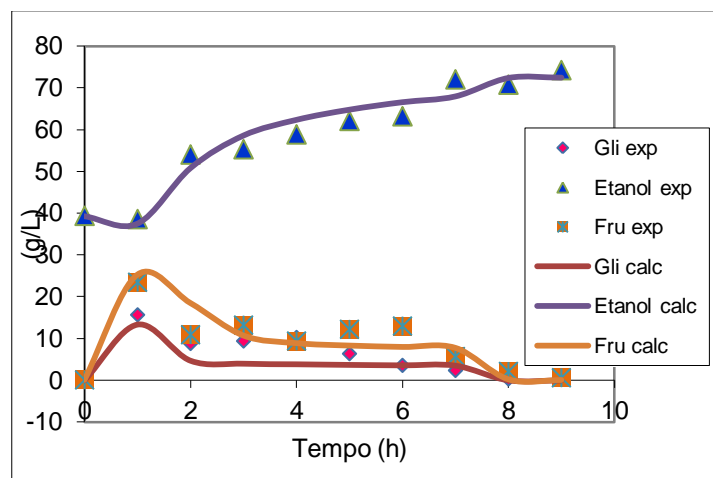


Figura 15 – Ajustes aos dados experimentais do ensaio 1, utilizando o modelo cinético para dois substratos.

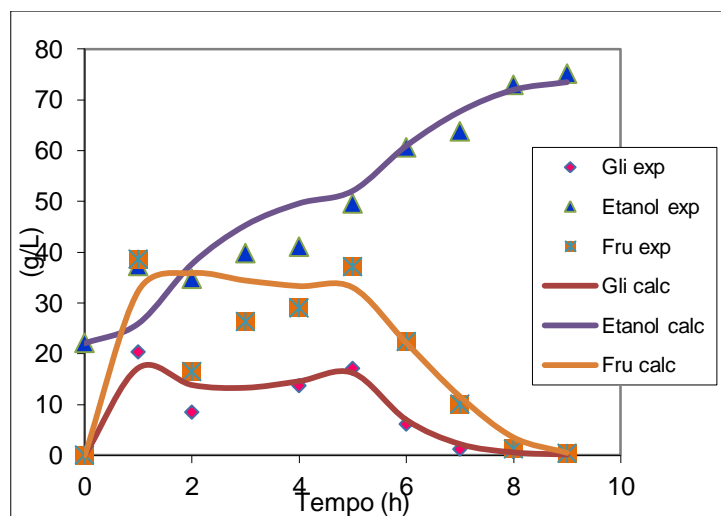


Figura 16 – Ajustes aos dados experimentais do ensaio 8, utilizando o modelo cinético para dois substratos.

Analisando-se as Figuras 15 e 16 nota-se que os dois substratos são consumidos ao final das fermentações, entretanto, a glicose é consumida mais rapidamente que a frutose, apresentando suas concentrações sempre mais baixas que a frutose. Segundo a literatura, isso se explica pelo fato de a levedura ter uma maior afinidade do transportador de hexose pela glicose (BIOCONTAL(b), 2013).

A Tabela 12 apresenta os valores dos parâmetros cinéticos que foram usados para os dois ensaios simulados, para o modelo cinético que considera dois substratos:

Tabela 12 - Resultados dos parâmetros cinéticos para o modelo que considera dois substratos (Tosetto modificado)

	K_S (G)	K_S (F)	K_I (G)	K_I (F)	$P_{m\acute{a}x}$ (G)	$P_{m\acute{a}x}$ (F)	n (G)	n (F)	$X_{m\acute{a}x}$ (G)	$X_{m\acute{a}x}$ (F)	m (G)	m (F)	Desvio
Ensaio 1	5,0	5,0	50	40	105	105	2,1	1,9	100	100	1,9	1,7	291,94
Ensaio 8	3,0	5,0	30	40	105	105	3,2	2,0	70	70	1,8	2,1	1001,45

Os valores de n e m obtidos para os ensaios simulados mostram que a inibição por produto e a inibição celular não são lineares (n e $m \neq 1$). Os valores de K_S e K_I estão consistentes ($K_S < K_I$). Os valores de desvio entre os dados experimentais e os ajustes foram menores quando utilizamos o modelo com dois substratos (comparados ao modelo com apenas um substrato), ou seja, o modelo de Tosetto (2002) modificado, para dois substratos, ajustou-se melhor aos pontos experimentais, o que é coerente já que a glicose e a frutose têm velocidades de consumo diferentes (BIOCONTAL(b), 2013).

E assim como para o modelo com um substrato, o valor de $X_{m\acute{a}x}$, variou entre os ensaios, indicando que provavelmente não havia as mesmas leveduras nos 2 experimentos.

5. CONCLUSÕES

É impossível produzir etanol por fermentação alcoólica sem produzir concomitantemente, glicerol, sendo que a relação entre a formação destes dois produtos segue uma regressão linear.

Em escala industrial, o tempo de alimentação reduzido e baixa concentração de fermento, afetam o rendimento fermentativo, desviando substrato de forma mais intensa para a produção de glicerol.

Os dois modelos cinéticos testados são bem flexíveis, ajustando-se bem aos pontos experimentais e o modelo para dois substratos apresenta menores desvios entre os dados e as curvas de ajuste, ressaltando o consumo diferenciado entre a glicose e a frutose.

6. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J.R. **Processo de recuperação de levedura ou processo Melle-Boinot.** In: Semana da Fermentação Alcoólica, Anais, p.254-262, Piracicaba, 1960.

AMORIM, H.V. **Introdução à bioquímica da fermentação alcoólica.** Ed. IAA – Planalsucar, Piracicaba, 1977. 95p.

AMORIM, H.V. **Fermentação Alcoólica: ciência e tecnologia.** Piracicaba, Fermentec, 2005, 448p.

AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G. **Processo de Produção de Álcool – controle e monitoramento.** 2ª Ed, FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP. Piracicaba, 1996. 103p.

ANDRIETTA, S.R. **Apostila do Curso de Engenharia de Fermentação.** p. 71; 99, 2007.

ANDRIETTA, S.R. **Modelagem, simulação e controle de fermentação alcoólica contínua em escala industrial.** 1994. 178 f. Tese de doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 1994.

ANDRIETTA; S.R.; STUPIELLO, J.P. **Simulação e modelagem para processos de fermentação alcoólica por batelada alimentada.** STAB, Piracicaba, p. 36-40, 1990

ANFAVEA. Estatísticas. Disponível em: <<http://www.anfavea.com.br/tabelas.html>>. Acesso em: 18 de maio de 2010.

ANGELIS, D.F. de. Agentes físicos, químicos e microbiológicos que afetam a fermentação alcoólica. In: MUTTON, M.J.R.; MUTTON, M.A. **Aguardente de cana – produção e qualidade.** Jaboticabal, FUNEP, p.49-66, 1992.

ARRUDA, G. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analítica**, n.26, p. 56-62, 2007.

ATALA, D.I.P.; COSTA, A.C.; MACIEL FILHO, R.; MAUGERI FILHO, F. Fermentação alcoólica com alta densidade celular: modelagem cinética e convalidação de parâmetros. In: XIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA. **Resumos**, 2000.

BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. **Biochemical engineering fundamentals**. 2a ed. New York, McGraw Hill, 1986. 984p.

BARRE, P; BLONDIN, B; DEQUIN, S; FEUILLAT, M; SABLAYROLLES, J.M.; BASSO, L.C. Fisiologia e ecologia microbiana. I Workshop Tecnológico sobre Produção de Etanol, ESALQ/USP, Piracicaba, SP, Brasil, 2004.

BASSO, L.C. Fisiologia e ecologia da fermentação alcoólica. I Workshop Tecnológico sobre Produção de Etanol, ESALQ/USP, Piracicaba, SP, Brasil, 2004.

BEROVIC et al. Influence of heat shock on glycerol production in alcohol fermentation, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia, 2006.

BIOCONTAL (a). **Rendimento fermentativo por subproduto e suas distorções. 2013.** Disponível em: <http://www.biocontal.com.br/index_post.php?page=noticias/rendimentos_fermentativo.html>. Acesso em: 21 de jun de 2013.

BIOCONTAL (b). **25 anos de fermentação: o que aprendemos? 2013.** Disponível em: <<http://stab.org.br/fermentacao/Silvio.pdf>>. Acesso em: 20 de set de 2013.

BRUMM, P.J.; HEBEDA, R.E. Glycerol production in industrial alcohol fermentations. **Biotechnology Letters**, Surrey, v.10, p. 677-682, 1988.

CARDOSO, M.G. **Produção de aguardente de cana**. 2ª ed. UFLA, Lavras, 2006. 445p.

CARVALHEIRO, F.; ROSEIRO, J.C.; GÍRIO, F.M. Interactive effects of sodium chloride and heat shock on trehalose accumulation and glycerol production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Microbiology**, v.16, p. 543-550, 1999.

CARVALHO, J.C.M.; SATO, S.; BORZANI, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. Engenharia Bioquímica, Vol. 3, **Fermentação Descontínua**. cap. 9, p. 105-111. 1975.

CHATTAWAY, T.; GOMA, G.; RENAUD, P.Y. Modeling ethanol and secondary inhibitions of ethanol fermentation in a multistage reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.32, n.3, p. 271-273, 1988.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Quarto levantamento cana-de-açúcar – Abril/2013**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_04_09_10_30_34_boletim_cana_portugues_abril_2013_4o_lev.pdf> Acesso em: 04 de Jun de 2013.

COSTA, A.C.; LIMA, E.L.; ALVES, T.L.M. **Otimização de processos fermentativos em batelada alimentada através da Teoria de Controle Singular**. In XI Sinaferm – Simpósio Nacional de Fermentações, vol 1, 1996.

CTC. **Manual de Métodos de Análises para Açúcar e Álcool**. Piracicaba, CTC (Centro de Tecnologia Canavieira) – Álcool - CTC-LA-MT2-008 – versão 03 26/04/2011. Disponível em CD ROM.

CYSEWSKI, G.R.; WILKIE, C.W. Process design and economic studies of fermentation methods for the production of ethanol. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.20, p. 1421-1430, 1978.

DAUGULIS, A.J.; SWAINE, D.E. Examination of substrate and product inhibition kinetics on the production of ethanol by suspended and immobilized cell reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.29, p.639-645, 1987.

DOURADO, A.; GOMA, G.; ALBUQUERQUE, U.; SEVELY, Y. Modeling and statistic optimization of the ethanol production in a cascade reactor I. modeling. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.29, n.2, p. 187-194, 1987.

ERASMUS, D.J.; VAN DER MERWE, G.K.; VAN VUUREN, H.J.J. Genome-wide expression analyses: metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. **FEMS Yeast Res.** v.3, 2003.

FACCIOTTI, M.C.R. **Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica**. In: Schimidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W. vol 2, cap.12: Fermentação Contínua, p.223-225, 2001.

FERMENTEC. **Métodos Analíticos para o Controle da Produção de Açúcar e Álcool**. Piracicaba, 2012.

FERREIRA, A.A. **Simulação da fermentação alcoólica de meios à base de glicose por *Saccharomyces cerevisiae***. 1998. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 1998.

FERREIRA, E. **Contribuição para o estudo da otimização da fermentação alcoólica operando em batelada-alimentada**. 2005. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP, Campinas, 2005.

GNANSOUNOU, E.; DAURIAT, A. Ethanol fuel from biomass: A review. **Journal Sci Industrial Res**, v.64, p. 809-822, 2005.

JARZEBSKI, A.B.; MALINOWSKI, J.J.; GOMA, G. Modeling of ethanol fermentation at high yeast concentrations. **Biotechnology and Bioengineering**, v.34, n.9, p.1225-1230, 1989.

KELLER, R.; DUNN, I.J. Computer of biomass production rate of cyclic fed batch continuous culture. **Journal of Applied Chemistry and Biotechnology**, v.28, p. 784-790, 1978.

LEE, J.M.; POLLARD, J.F.; COULMAN, G.A. Ethanol fermentation with cell recycling: computer simulation. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.25, n.2, p.497-511, 1983.

LESSMANN, W.F. **Estudo do processo descontínuo alimentado para a produção de amiloglicosidase por *Aspergillus awamori* NRRL3112 para concentrações de polissacarídeo de 40 e 80 g/L**. 1993. Dissertação (Mestrado) Escola Politécnica - USP, São Paulo, Brasil, 1993.

LIMA, U.A.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. **Biotecnologia Industrial – Processos Fermentativos e Enzimáticos**. In: Schimidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W. vol.1, cap.1: Produção de Etanol, p.1-43, 2001.

LIMA, L.R.; MARCONDES, A.A. **Álcool carburante: uma estratégia brasileira**. Ed. UFPR, Curitiba, 2002. 248 p.

LUONG, J.H.T. Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.27, n.3, p.285, 1985.

MAIORELLA, B.L.; BLANCH, H.W.; WILKE, C.R. **Alcohol Production and Recovery**. In: Flechter, A., Advances in Biochemical Engineering. Heidelberg: Spring Verlag, v.20, p.41-73, 1981.

MARTINEZ, D.S. **Estudo dos processos industriais de produção de etanol por fermentação**. 2007. Dissertação de mestrado – Faculdade de Engenharia Química / Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

McNEIL, B.; HARVEY, L.M. Fermentation – a practical approach. IRL PRESS, 1a ed. Oxford, 1990.

MELO, H.F. **Resposta ao estresse ácido em leveduras da fermentação alcoólica industrial**. 2006. Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Pernambuco, Recife, p.118, 2006.

MOMBOUQUETE, G.H. **Modeling** high-biomass-density cell recycle fermenters. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.39, n.5, p.498-503, 1992.

MONACO, M.A.S.L. **Efeito protetor do magnésio no choque térmico e estresse pelo etanol em leveduras *Saccharomyces cerevisiae***. 2007. Dissertação de mestrado – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” / USP. Piracicaba, p.64, 2007.

NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Ed. da Unicamp. Campinas, 2003. 399p.

NEVOIGT, E.; STAHL, U. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v.21, p. 231-241, 1997.

OLIVEIRA, M.C.S. **Avaliação do processo de fermentação alcoólica de suco de maçã obtido por liquefação enzimática.** 2006. Dissertação de mestrado – Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2006.

OURA, E. Reaction products of yeast fermentations. **Process Biochemistry**, London, v.12, p. 19-21, 35, 1977.

PINTO, F.H.P.B. **Etanol celulósico: um estudo de viabilidade econômico-financeira.** 2010. Dissertação de Mestrado - Escola de Economia de São Paulo, EESP – FGV, São Paulo, 2010.

REHM, H.J.; REED, G. **Biotechnology** v.2. Fundamentals of Biochemical Engineering. Reading: Anton Moser, 1985. Cap 14: Kinetics of Batch Fermentations, p.243-283, 1985.

SANTOS, M.R. **Estudo de viabilidade técnico-econômica da interação cana soja/amendoim para usina de açúcar e etanol.** 2010. Dissertação de Mestrado - Escola de Economia de São Paulo, EESP – FGV, São Paulo, 2010.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M.C.R. **Biorreatores e Processos Fermentativos.** In: Schmidell, W. et al. (Coord.). **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica.** Edgar Blücher, São Paulo, p. 179-192, 2001.

SHULLER, M.L.; KARGIL, F. **Bioprocess Engineering – Basic Concepts, Anaerobic Process – Ethanol Production**, v.17, p.515-518, 2002.

SILVA FILHO, E.A.; MEOL, H.F.; ANTUNES, D.F.; SANTOS, S.K.B.; RESENDE, A.M.; SIMÕES, D.A.; MORAIS JR, M.A. Isolation by genetic and physiological characteristics of fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v.32, p. 481-486, 2005.

STREMEL, D.P. Desenvolvimento de modelos estruturados alternativos para o processo de produção de etanol. 2001. 283 p.

STUPIELLO, J.P.; HORII, J. Condução da fermentação alcoólica. *Saccharum*, v.17, p.43-46, 1981.

SUHAIMI, S.N.; PHANG, L.Y.; MAEDA, T.; ABD-AZIZ, S.; WAKISAKA, M.; SHIRAI, Y.; HASSAN, M.A. Bioconversion of glycerol for bioethanol production using isolated *Escherichia coli* SS1. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.43, n.2, p.506-516, 2012.

TOSETTO, G.M. **Influência da matéria-prima no comportamento cinético de levedura na produção de etanol**. 2002. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP, Campinas, 2002.

UNICA – União da Indústria da Cana-de-Açúcar. Disponível em: <<http://www.unica.com.br>>. Acesso em: 01 de mar de 2010.

VASCONCELOS, J.N. & VALDMAN, B. **Otimização do Processo de Fermentação Alcoólica através da Batelada Alimentada**. V Simpósio de Avaliação de Safra da Agroindústria da Cana-de-Açúcar em Alagoas. Brasil Açucareiro, Rio de Janeiro, v.106, n° 2, 38-48, 1988.

VIEGAS, M.C. **Desenvolvimento de um reator de bancada de leito fluidizado para produção de etanol utilizando linhagens de leveduras flocculantes**. 1999. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP, Campinas, 1999.

WYMAN, C.E. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. **Trends Biotechnology**, v.25, p.153-157, 2007.

APÊNDICE

APÊNDICE A

Obtenção dos resultados, para o ensaio 1.

Tabela A.1 - Concentrações de produtos, volumes da dorna e cálculos de massa dos produtos ao longo do tempo para o ensaio 1

	Etanol (g/L)	Vol Dorna (L)	Massa P (kg)	Glicerol (g/L)	Massa G (kg)
Amostra 0	39,3	181.493	7.131	1,08	196
Amostra 1	38,5	264.000	3.034	1,03	76
Amostra 2	54,0	368.000	12.729	1,42	327
Amostra 3	55,2	444.000	17.391	1,63	528
Amostra 4	58,8	520.000	23.435	1,71	693
Amostra 5	62,0	605.000	30.388	1,85	923
Amostra 6	63,1	684.000	36.043	2,13	1.261
Amostra 7	72,0	758.000	47.412	2,40	1.623
Amostra 8	70,7	762.000	46.738	2,38	1.618
Amostra 9	74,2	762.000	49.383	2,39	1.625

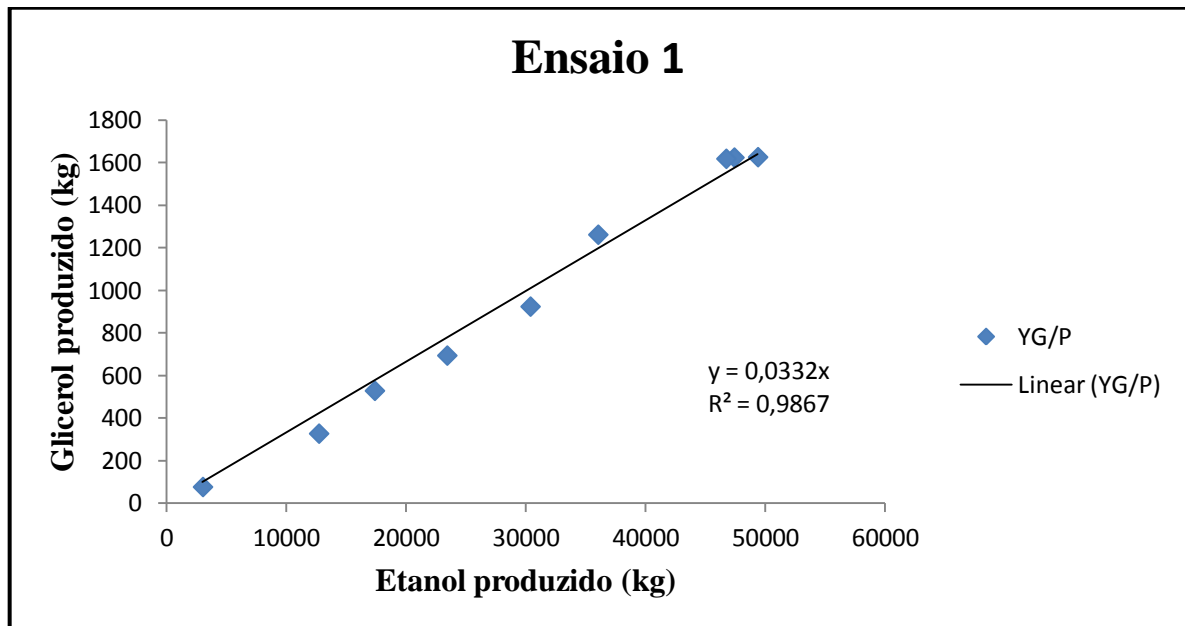


Figura A.1 – Gráfico da regressão linear entre as massas de etanol e glicerol e obtenção da equação da reta e do coeficiente de determinação (R^2) para o ensaio 1.

Tabela A.2 - Concentrações de substrato, volumes da dorna, massa de ART ao longo do tempo e cálculo do rendimento $Y_{P/S}$ e Produtividade para o ensaio 1

	Vol Dorna (L)	Conc. ART mosto1 (g/L)	Massa ART entrado (kg)
Amostra 0	181.493	207,0	
Amostra 1	264.000	207,0	17.082
Amostra 2	368.000	207,0	21.531
Amostra 3	444.000	207,0	15.734
Amostra 4	520.000	207,0	15.734
Amostra 5	605.000	207,0	17.598
Amostra 6	684.000	207,0	16.356
Amostra 7	758.000	207,0	15.320
Amostra 8	762.000	207,0	828
Amostra 9	762.000	207,0	-
		Massa S (ART) entrada	120.184
		Massa P (etanol) produzida	49.383
		$Y_{P/S}$	0,411
		Produtividade (g/L.h)	7,20