



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA
MESTRADO

CULTIVO CONTÍNUO DE *Saccharomyces cerevisiae* EM MEL INVERTIDO CLARIFICADO

MESTRANDO:

VICTOR HENRIQUE SILVA

PG: 400240

ORIENTADOR:

JOSÉ EDUARDO OLIVO

ENGENHEIRO QUÍMICO, DSc

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
SETEMBRO 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**CULTIVO CONTÍNUO DE *Saccharomyces cerevisiae* EM MEL INVERTIDO
CLARIFICADO**

Victor Henrique Silva

Engº Químico, UEM, 2016

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Olivo

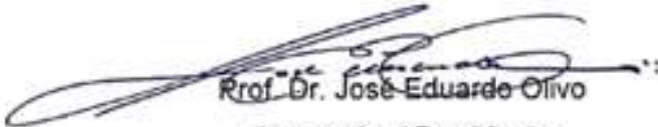
Dissertação de Mestrado submetida à Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química, área de Desenvolvimento de Processos.

**Maringá – PR – Brasil
26 de Setembro de 2019**

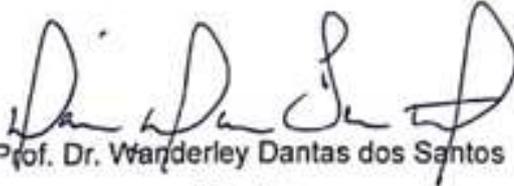
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

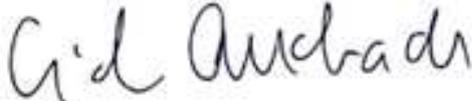
Esta é a versão final da dissertação de Mestrado apresentada por Victor Henrique Silva perante a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Engenharia Química em 26 de setembro de 2019.

COMISSÃO JULGADORA


Prof. Dr. José Eduardo Olivo
Orientador / Presidente


Prof. Dr. Gisella Maria Zanin
Membro


Prof. Dr. Wanderley Dantas dos Santos
Membro


Prof. Dr. Cid Marcos Gonçalves Andrade
Membro

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

S586c

Silva, Victor Henrique

Cultivo contínuo de *Saccharomyces Cerevisiae* em mel invertido clarificado / Victor Henrique Silva. -- Maringá, PR, 2019.

142 f.color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Olivo.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2019.

1. Fermentação alcoólica. 2. Mel invertido. 3. Clarificação - mel. 4. *Saccharomyces Cerevisiae*. 5. Bioquímica. I. Olivo, José Eduardo, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Tecnologia. Departamento de Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

CDD 23.ed. 660.53

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo.

Agradeço ao professor doutor José Eduardo Olivo, que me proporcionou a oportunidade de adentrar no mestrado para realizar este trabalho de pesquisa, contribuindo também como orientador, direcionando e ensinando com toda sua dedicação.

Agradeço aos meus amigos pela amizade, paciência e companhia.

Aos colegas pesquisadores pelo auxílio em alguns ensaios, pelo companheirismo e por compartilhar conhecimento sobre as práticas no laboratório e pesquisas.

Aos alunos de iniciação científica que disponibilizaram seu tempo para aprender e colaborar com a realização dos ensaios e das análises.

À GC Química – Campo Mourão que disponibilizou os polímeros utilizados neste trabalho.

À Usina Santa Terezinha – Iguatemi que disponibilizou o mel de cana utilizado nos ensaios como substrato.

Agradeço aos meus pais Silvio Silva e Marta Mori Silva e aos meus sogros Paulo e Valquíria pelo apoio e por estarem presentes nesta etapa da minha vida.

Agradeço à minha noiva Scarlet Pelisson pela paciência, por me ajudar nos momentos difíceis e pela sua companhia.

Agradeço à CAPES pelo apoio à pesquisa no País e pela concessão da bolsa de estudos que me ajudou a me manter e custear alguns materiais.

Agradeço ao PEQ e à UEM pela oportunidade de fazer mestrado em engenharia química proporcionando excelentes docentes e colaboradores que prezam pelo ensino e pelo bem dos alunos.

CULTIVO CONTÍNUO DE *Saccharomyces cerevisiae* EM MEL INVERTIDO CLARIFICADO

AUTOR: VICTOR HENRIQUE SILVA

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ EDUARDO OLIVO

Dissertação de Mestrado; Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química; Universidade Estadual de Maringá; Av. Colombo, 5790, BL E46 – 09; CEP: 87020-900 – Maringá – PR, Brasil, defendida em 26 de Setembro de 2019. 142 p.

RESUMO

O objetivo dessa pesquisa foi o de realizar ensaios fermentativos em regime contínuo utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como agente fermentativo e meio composto de melaço de cana-de-açúcar invertido e clarificado. A inversão da sacarose foi realizada utilizando a enzima Novozymes® Invertase® IV031040 em banho térmico a 50°C com duração de duas horas. Para clarificação do mel foram feitos testes para definir que mistura dos polímeros AGP-1009 (catiônico) e AGP-1000 (aniônico) era mais eficiente, sendo decidido o uso de polímero catiônico em concentração de 25 ppm para cada 70 g/L de sacarose. Ensaio em regime descontínuo se sucederam após a definição da metodologia de clarificação com o objetivo de estudar a influência desta no rendimento de etanol. Outros ensaios foram feitos ainda em regime descontínuo para investigar o comportamento do microrganismo em diferentes concentrações iniciais de substrato (50 a 200 g/L) com mel clarificado. Os ensaios fermentativos em regime contínuo foram conduzidos no biorreator New Brunswick® BioFlo®-3 com volume útil de 1L e utilizando bombas peristálticas para circulação de meio. Ensaio foram realizados utilizando como base taxas de diluição variando de 0,080 h⁻¹ a 0,14 h⁻¹ para um $\mu_{X_{máx}}$ de 0,30 $\frac{g_{células\ novas}}{g_{células}h}$. Os resultados apresentaram diferentes regiões de estabilidade de concentração de células, substrato e etanol no decorrer dos ensaios. Os melhores resultados foram obtidos no ensaio realizado com taxa de diluição inicial de 0,084 h⁻¹, que apresentou estabilidade até 120 horas de fermentação. Durante este período a concentração de glicose ficou nula, com concentração de ART em valores próximos a 10 g/L, etanol acima de 35 g/L até 44 horas de fermentação e, posteriormente, os valores de etanol reduziram para 20 g/L até 120 horas.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*; fermentação contínua; mel invertido.

**CONTINUOUS CULTURE OF *Saccharomyces cerevisiae* IN CLARIFIED
INVERTED MOLASSES**

AUTHOR: VICTOR HENRIQUE SILVA

SUPERVISOR: PROF. DR. JOSÉ EDUARDO OLIVO

Master Thesis; Chemical Engineering Graduate Program; State University of Maringá; Av. Colombo, 5790, BL E46 – 09; CEP: 87020-900 – Maringá – PR, Brazil, presented on 26th September 2019. 142p.

ABSTRACT

The objective of this research was to do fermentative experiments in continuous operation using *Saccharomyces cerevisiae* as fermentative agent and medium composed of inverted and clarified sugarcane molasses. The inversion of sucrose was done using the enzyme Novozymes® Invertase® IV031040 in a thermostatic bath at 50°C for two hours.

For the molasses clarification experiments were done to define which mixture of the polymers AGP-1009 (cathionic) and AGP-1000 (anionic) was more efficient, being decided for the use of the cathionic polymer in a 25 ppm concentration for each 70 g/L of sucrose. Experiments with discontinuous operation were done after defining the methodology of clarification with the objective of studying the influence of the clarification on the yield of ethanol. Other experiments in discontinuous operation were done to investigate the behavior of the microorganism in different initial substrate concentrations (50 to 200 g/L) with clarified molasses.

The fermentative experiments in continuous operation were done in a New Brunswick® BioFlo®-3 reactor with an operational volume of 1 L and using peristaltic pumps for the circulation of medium. Experiments were done using dilution rates varying from 0.080 h^{-1} to $0,14\text{ h}^{-1}$ for a $\mu_{X_{\max}}$ of $0.30\text{ g}_{\text{new cells}} \cdot \text{g}_{\text{cells}}^{-1} \text{h}^{-1}$. The results showed different regions of stability for concentration of cells, ethanol and substrate during the experiments. The best results were obtained at the essay done with the initial dilution rate of $0,084\text{ h}^{-1}$, that showed stability until 120 hours of fermentation. During this period, the concentration of glucoses was null, total reducing sugars with values next to 10 g/L and ethanol above 35 g/L until 44 hours of fermentation and then, ethanol reduced to 20 g/L until 120 hours.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; continuous fermentation; inverted molasses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Gráfico sobre a produção mundial de etanol no ano 2018. Elaboração própria com dados da Renewable Fuel Association (https://ethanolrfa.org/statistics/annual-ethanol-production/).....	4
Figura 2 - Células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> via microscopia eletrônica. Adaptado de: ALBERTINI, 2001.....	8
Figura 3 - Esquema de cultura de células em regime contínuo de um estágio. ...	12
Figura 4 - Mel sendo invertido em banho termostático a 50°C com agitação mecânica.....	25
Figura 5 - Tubo de centrífuga contendo mel invertido a 300 g/L com precipitado formado por ação de polímeros como precipitado.	29
Figura 6 - Centrífuga do DEQ.....	30
Figura 7 – Diagrama do arranjo dos reatores dentro da incubadora com agitação.	31
Figura 8 - Ilustração com os reatores já montados na incubadora.....	32
Figura 9 - Redução percentual (pH 4,95) de coloração em relação ao branco para 420 nm em espectrofotometria para o polímero catiônico AGP-1009.	39
Figura 10 - Amostras com polímero catiônico AGP-1009 após centrifugação em pH 4,95, tubos 1 ao 10 + branco.....	39
Figura 11 - Amostras com polímero aniônico AGP-1000 após centrifugação em pH 4,95, tubos 11 ao 20 + branco.....	40
Figura 12 - Redução percentual (pH 4,95) de coloração em relação ao branco para 420nm em espectrofotometria com polímero catiônico.	41
Figura 13 - Redução percentual (pH 7) de coloração em relação ao branco para 420nm em espectrofotometria com polímero catiônico.	43
Figura 14 - Redução percentual (pH 7) de coloração em relação ao branco para 420nm em espectrofotometria com polímero aniônico.....	43
Figura 15 - Amostras com polímero catiônico AGP-1009 após centrifugação em pH 7, tubos 1 ao 10 + branco.....	44
Figura 16 - Amostras com polímero aniônico AGP-1000 após centrifugação em pH 7, tubos 11 ao 20 + branco.....	44
Figura 17 - Redução percentual (pH 7) de coloração em relação ao branco para 420nm em espectrofotometria com polímero aniônico e catiônico combinados...	46

Figura 18 - Curvas ajustadas de X, S e P (g/L) em função do tempo (h) para $S_0 = 50$ g/L.	57
Figura 19 - Gráfico de μ_X [g células novas/g células.h], μ_S [g substrato/g células.h] e μ_P [g produtos/g células.h] para $S_0 = 50$ g/L.	58
Figura 20 - Curvas ajustadas de X, S e P (g/L) em função do tempo (h) ensaio 125 g/L.	60
Figura 21 - Gráfico de μ_X , μ_S e μ_P para $S_0 = 125$ g/L.	60
Figura 22- Curvas ajustadas de X, S e P (g/L) em função do tempo (h) para $S_0 = 150$ g/L.	62
Figura 23- Gráfico de μ_X , μ_S e μ_P para $S_0 = 150$ g/L.	63
Figura 24 - Curvas ajustadas de X, S e P (g/L) em função do tempo (h) para $S_0 = 200$ g/L.	65
Figura 25 - Gráfico de μ_X , μ_S e μ_P para $S_0 = 200$ g/L.	65
Figura 26 - Biorreator New Brunswick™ BioFlo®III.	68
Figura 27 - Gráfico resultante do ajuste para o teste de homogeneidade realizado no reator New Brunswick™ Bioflo®-III.	70
Figura 28 – Vazão (F) e taxa de diluição (D) em função do tempo (t) para o ensaio em regime contínuo com $D = 0,1$ h ⁻¹	75
Figura 29 - Produtividade (P.D) e concentração celular (X) em função do tempo (t) para ensaio em regime contínuo com $D = 0,1$ h ⁻¹	76
Figura 30 – Produtividade(P.D) em função da taxa de diluição (D) para o ensaio em regime contínuo com $D = 0,1$ h ⁻¹	77
Figura 31 - Dados obtidos durante ensaio em regime contínuo com $D = 0,1$ h ⁻¹	78
Figura 32 - Vazão (F) e taxa de diluição (D) em função do tempo (t) para o ensaio em regime contínuo com $D = 0,13$ h ⁻¹	81
Figura 33- Produtividade (P.D) e concentração celular (X) em função do tempo(h) para ensaio em regime contínuo com $D = 0,13$ h ⁻¹	82
Figura 34 - Produtividade (P.D) em função da taxa de diluição (D) para o ensaio em regime contínuo com $D = 0,13$ h ⁻¹	83
Figura 35 - Dados obtidos durante ensaio em regime contínuo com $D = 0,13$ h ⁻¹	85
Figura 36 - Vazão (F) e taxa de diluição (D) em função do tempo (t) para o ensaio em regime contínuo com $D = 0,14$ h ⁻¹	88

Figura 37- Produtividade (P.D) e concentração de células (X) em função do tempo (t) para ensaio em regime contínuo com $D = 0,14 \text{ h}^{-1}$	89
Figura 38 - Produtividade (P.D) em função da taxa de diluição (D) para o ensaio em regime contínuo com $D = 0,14 \text{ h}^{-1}$	89
Figura 39 - Dados obtidos durante ensaio em regime contínuo com $D = 0,14 \text{ h}^{-1}$	91
Figura 40 - Funil de separação contendo o mosto fermentado retirado do reator e as células decantadas.	94
<i>Figura 41 – Vazão (F) e taxa de diluição (D) em função do tempo (t) para o ensaio em regime contínuo com $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$ a $0,10 \text{ h}^{-1}$.</i>	<i>96</i>
Figura 42- Produtividade (P.D) e concentração de células (X) em função do tempo (t) para ensaio em regime contínuo com $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$ a $0,10 \text{ h}^{-1}$	97
Figura 43 - Dados de produtividade em função da taxa de diluição para o ensaio em regime contínuo com $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$ a $0,10 \text{ h}^{-1}$	97
Figura 44 - Dados obtidos durante ensaio em regime contínuo com $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$ a $0,10 \text{ h}^{-1}$	99
Figura 45 - Representação do microdestilador Tecnal-TE-012. Fonte: http://tecnal.com.br/	112
Figura 46 - Cilindros de gases do cromatógrafo.	115
Figura 47 - Manômetros da saída de gás dos cilindros para o cromatógrafo.	115
Figura 48 - Curva Padrão da análise de concentração de massa celular úmida.	118
Figura 49 - Curva Padrão da análise DNS.	118
Figura 50 - Curva Padrão da análise GOD-PAP.	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Especificações do etanol hidratado de acordo com a ANP. Adaptado de UDOP.....	5
Tabela 2 - Compilação da escolha de nutrientes de vários autores em diferentes trabalhos.....	14
Tabela 3 - Experimentos em pH natural (4,95) do mel.....	38
Tabela 4 - Repetição dos ensaios em pH 4,95 para polímeros catiônicos.....	41
Tabela 5 - Ensaios em pH 7 do mel.....	42
Tabela 6 - Ensaios em pH 7 com adição posterior de polímeros de forma cruzada.....	45
Tabela 7 - Condições iniciais ensaio batelada a 33 g/L de substrato.....	48
Tabela 8 - Condições iniciais ensaio batelada a 50g/L de substrato.....	48
Tabela 9 - Condições iniciais ensaio batelada a 70g/L de substrato.....	48
Tabela 10 - Resultados de massa celular, ART, glicose e etanol para concentração inicial de 33 g/L ART.....	50
Tabela 11 - Massa celular, ART, glicose e etanol para concentração inicial de 50 g/L ART.....	52
Tabela 12 - Massa celular, ART, glicose e etanol para concentração inicial de 70 g/L ART.....	53
Tabela 13 - Dados do ensaio em batelada com $S_0 = 50$ g/L.....	56
Tabela 14 - Dados do ensaio em batelada com $S_0 = 100$ g/L.....	58
Tabela 15 - Dados do ensaio em batelada com $S_0 = 150$ g/L.....	61
Tabela 16 - Rendimentos fermentativos do ensaio batelada à 150g/L de substrato inicial.....	61
Tabela 17 - Dados do ensaio em batelada com $S_0 = 200$ g/L.....	64
Tabela 18 - Rendimentos fermentativos do ensaio batelada à 200g/L de substrato inicial.....	64
Tabela 19 - Dados de velocidade específica de crescimento celular máxima e velocidades específicas de consumo de substrato e produção de etanol para quando a de produção de células é máximo para os ensaios descontínuos realizados.....	66
Tabela 20 - Produtividade dos ensaios descontínuos de substrato inicial de 50 g/L a 200 g/L.....	67

Tabela 21 - Rendimentos para os ensaios com substrato inicial de 50 g/L a 200 g/L	67
Tabela 22 - Dados obtidos para teste de homogeneidade no reator New Brunswick™ Bioflo®-III	69
Tabela 23 - Condições utilizadas nos ensaios em regime contínuo.....	70
Tabela 24 - Dados de substrato e células inicial e final obtidos nas etapas descontínuas de cultivo dos ensaios fermentativos em regime contínuo 1, 2, 3 e 4.	100
Tabela 25 - Dados de rendimentos fermentativos obtidos nas etapas descontínuas de cultivo dos ensaios fermentativos em regime contínuo 1, 2, 3 e 4.	100
Tabela 26 - Dados de velocidade específica de produção de células, substrato e etanol obtidos nas etapas descontínuas de cultivo dos ensaios fermentativos em regime contínuo 1, 2, 3 e 4.....	101
Tabela 27 - Valores de pH, agitação do eixo do reator, vazão de retirada de meio do reator e concentrações celular em base úmida (X), de açúcares redutores totais (ART), glicose e etanol expressas em g/L para o ensaio realizado a 32°C e planejado com taxa de diluição $D = 0,10 \text{ h}^{-1}$	120
Tabela 28 - Valores de pH, agitação do eixo do reator, vazão de retirada de meio do reator e concentrações celular em base úmida (X), de açúcares redutores totais (ART), glicose e etanol expressos em g/L para o ensaio realizado a 32°C e planejado com taxa de diluição $D = 0,13 \text{ h}^{-1}$	121
Tabela 29 - Valores de pH, agitação do eixo do reator, vazão de retirada de meio do reator e concentrações celular em base úmida (X), de açúcares redutores totais (ART), glicose e etanol expressos em g/L para o ensaio realizado a 32°C e planejado com taxa de diluição $D = 0,14 \text{ h}^{-1}$	122
Tabela 30 - Valores de pH, agitação do eixo do reator, vazão de retirada de meio do reator e concentrações celular em base úmida (X), de açúcares redutores totais (ART), glicose e etanol expressos em g/L para o ensaio realizado a 32°C e planejado com taxa de diluição $D = 0,08 \text{ a } 0,10 \text{ h}^{-1}$	124

Lista de símbolos ou nomenclatura

ART – Açúcares Redutores Totais (Glicose, Frutose, Sacarose e Outros);

D – Taxa de diluição (h^{-1});

F – Vazão (mL / min);

K_s – Constante de saturação;

P – Concentração de Produto [g/L];

P₀ – Concentração de Produto Inicial [g/L];

S – Concentração de Substrato [g/L];

S₀ – Concentração de Substrato Inicial [g/L];

t_d – tempo de duplicação;

X – Concentração de Células [g/L];

X₀ – Concentração de Células Inicial [g/L];

V = Volume (L);

Y_{X/S} – Rendimento de crescimento celular [$\text{g de células} / \text{g de substrato}$];

Y_{P/X} – Rendimento de produto baseado na massa de células [$\text{g de etanol} / \text{g de células}$];

Y_{P/S} – Rendimento de produto baseado no substrato limitante [$\text{g de etanol} / \text{g de substrato}$];

μ_P – Velocidade específica de produção de produtos [$\text{g}_{\text{produtos}} \cdot \text{g}_{\text{células}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$];

μ_S – Velocidade específica de consumo de substrato [$\text{g}_{\text{substrato}} \cdot \text{g}_{\text{células}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$];

μ_X – Velocidade específica de crescimento celular [$\text{g}_{\text{células novas}} \cdot \text{g}_{\text{células}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$];

μ_{X máx} – Velocidade específica máxima de crescimento celular [$\text{g de células} / (\text{g de células} \cdot \text{tempo})$].

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
Etanol	3
Matéria-prima	5
2.1.1. Cana-de-açúcar.....	5
2.1.2. Mel Invertido.....	6
2.1.3. Clarificação do mel.....	7
Microrganismo: Saccharomyces cerevisiae.....	8
Fermentação alcoólica	9
2.1.4. Descontínuo.....	9
2.1.5. Descontínuo-alimentado.....	9
2.1.6. Contínuo.....	10
Fatores que afetam a fermentação.....	12
2.1.7. Nutrientes e meio de cultura.....	12
2.1.8. Concentração de açúcares	15
2.1.9. Temperatura.....	15
2.1.10. pH.....	16
2.1.11. Inibidores da fermentação.....	16
2.1.12. Contaminação bacteriana.....	17
Cinética de um processo fermentativo	18
3. OBJETIVOS	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
Descrição do meio de cultura	23
Microrganismo	23
Diluição do mel.....	23

Preparo da solução da enzima Novozymes® Invertase® IV031040	24
Inversão do mel.....	25
Suplementação de nutrientes	25
Esterilização dos materiais	26
Teste de Homogeneidade do Reator	26
Clarificação do mel utilizando polímeros	27
Clarificação do mel	28
4.1.1. Filtração com filtro prensa.....	28
4.1.2. Centrifugação.....	29
Preparo para ensaios em batelada.....	30
Análise de amostras	33
4.1.3. Retirada de amostras	33
4.1.4. Concentração de células por espectrofotometria (OLIVO, 1985)	33
4.1.5. Leitura de pH.....	34
4.1.6. Concentração de etanol por cromatografia em fase gasosa	34
4.1.7. Concentração de açúcares redutores pelo método DNS modificado (ZANIN & MORAES, 1987)	34
4.1.8. Concentração de glicose método GOD-PAP	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
Testes de clarificação.....	37
5.1.1. Experimentos realizados em pH 4,95.....	38
5.1.2. Repetição dos ensaios em pH 4,95 para polímero catiônico.....	40
5.1.3. Testes dos polímeros em pH neutro.....	41
5.1.4. Ensaios em pH 7 com adição cruzada de polímeros em tubos selecionados da segunda série.....	44
Fermentações em regime descontínuo.....	46
5.1.5. Ensaios exploratório de polímeros em fermentação descontínua	

5.1.6.	Ensaio exploratório de polímeros em fermentação descontínua com $S_0 = 33$ g/L	49
5.1.7.	Ensaio exploratório de polímeros em fermentação descontínua com $S_0 = 50$ g/L	51
5.1.8.	Ensaio exploratório de polímeros em fermentação descontínua com $S_0 = 70$ g/L.	52
5.1.9.	Fermentações em regime descontínuo para estudo de velocidades específicas	55
5.1.10.	Ensaio em regime batelada com $S_0 = 50$ g/L.....	56
5.1.11.	Ensaio em regime batelada com $S_0 = 100$ g/L.....	58
5.1.12.	Ensaio em regime batelada com $S_0 = 150$ g/L.....	61
5.1.13.	Ensaio em regime batelada com $S_0 = 200$ g/L.....	63
	Fermentação em regime contínuo.....	67
5.1.14.	Teste de homogeneidade do Reator.....	69
5.1.15.	Preparo dos ensaios contínuos	70
5.1.16.	Ensaio em regime contínuo com $D = 0,1$ h ⁻¹	72
5.1.17.	Ensaio em regime contínuo com $D = 0,13$ h ⁻¹	79
5.1.18.	Ensaio em regime contínuo com $D = 0,14$ h ⁻¹	86
5.1.19.	Ensaio em regime contínuo com $D = 0,080$ h ⁻¹ a $0,10$ h ⁻¹	92
6.	CONCLUSÕES	102
	Da Clarificação:.....	102
	Dos Ensaio em regime descontínuo:	102
	Dos Ensaio em regime contínuo:	103
7.	REFERÊNCIAS	105
	Apêndice A – Preparo de soluções	111
	A.1. Preparação da Solução de Ureia.....	111
	A.2. Preparação da Solução de Fosfato.....	111
	A.3. Preparo das soluções de nutrientes.....	111

Apêndice B – Metodologias.....	112
B.1. Operação de microdestilador TECNAL TE-012.....	112
B.2. Operação do Microdestilador de Vidro.....	113
B.3. Operação do Cromatógrafo	114
Apêndice C – Curvas padrão para as análises	118
C.1. Curva padrão de concentração celular em massa úmida.....	118
C.2. Curva padrão para análise DNS	118
C.3. Curva padrão para análise GOP-PAP	119
Apêndice D – Dados obtidos nos ensaios fermentativos.....	120
D.1. Dados do ensaio em regime contínuo com $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$.....	120
D.2. Dados do ensaio em regime contínuo com $D = 0,13 \text{ h}^{-1}$.....	121
D.3. Dados do ensaio em regime contínuo com $D = 0,14 \text{ h}^{-1}$.....	122
D.4. Dados do ensaio em regime contínuo com $D = 0,08$ a $0,10 \text{ h}^{-1}$.....	124

1. INTRODUÇÃO

As alterações provocadas pelo aumento dos gases intensificadores do efeito estufa fez com que se buscasse fontes de energia alternativas e uma destas é o etanol, um composto orgânico produzido a partir da fermentação alcoólica de açúcares utilizando microrganismos. Está presente na economia na forma de bebidas alcoólicas, como agente desinfetante e usado também como combustível em sua forma hidratada ou aditivo na gasolina (27% de etanol anidro no Brasil).

Como fonte de açúcares em sua produção são utilizados a beterraba (Europa), cana-de-açúcar (Brasil) ou milho (Estados Unidos) e também nas últimas décadas se estuda a utilização de biomassa para produção de etanol de segunda geração. A tecnologia mais difundida para produção do etanol é a partir da fermentação alcoólica em reatores no regime descontínuo por se tratar de um processo simples e de fácil operação. Como alternativa a este processo existem também os processos em regime descontínuo alimentado e o regime de alimentação contínua. Os ensaios fermentativos nesta pesquisa utilizaram como agente fermentativo a *Saccharomyces cerevisiae* e na composição do meio composto de mel invertido clarificado. O microrganismo utilizado é uma levedura de característica mesófila e aeróbia facultativa que possui a capacidade de obter energia a partir dos açúcares no meio, se desenvolve em meio aquoso e apresenta elevada resistência a meios ácidos. É encontrado disponível na forma de fermento fresco ou seco e amplamente utilizada em indústria de bebidas, panificação e de biocombustível.

O mel utilizado nos experimentos foi disponibilizado pela Usina Santa Terezinha - Unidade Iguatemi. A inversão do mel consiste na hidrólise da sacarose em glicose e frutose. Esta, pode ser feita por meio de hidrólise ácida ou enzimática. Nesse trabalho foi realizada utilizando a enzima Novozymes® Invertase® IV031040 em banho térmico a 50°C com duração de duas horas. A clarificação do mel teve o objetivo de remover impurezas que podem afetar negativamente a fermentação e a remoção de cor, também teve como objetivo facilitar a leitura da concentração celular, a qual foi feita por método espectrofotométrico (OLIVO, 1985). Para definir como se procederia a clarificação foram realizados ensaios com diferentes combinações dos polímeros disponibilizados (aniônico e catiônico) pela empresa GC Química. Foram selecionadas diferentes condições de clarificação, que foram testadas em ensaios de fermentação a 33 g/L, 50 g/L e 70 g/L de ART com objetivo

de selecionar uma boa condição de processo. Nesta etapa se decidiu pelo uso de polímero catiônico em concentração de 25 ppm para cada 70 g/L de sacarose.

Novos ensaios em regime descontínuo se sucederam após a definição da metodologia de clarificação com objetivo de estudar a influência desta no rendimento fermentativo utilizando diferentes condições de substrato inicial. Com base nos resultados destes ensaios foi possível definir quando era o momento para início da alimentação contínua. Este ocorre quando a concentração de açúcares residuais atinge o valor de 50 g/L, pois neste valor a velocidade específica de crescimento atinge seu valor máximo. Os ensaios fermentativos em regime contínuo foram conduzidos em um biorreator New Brunswick®BioFlo®-3, com agitação, controle de temperatura e sensores de pH e temperatura, foi utilizado como volume útil 1 litro e para a circulação de meio no reator utilizou-se bombas peristálticas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ETANOL

O etanol é um composto químico orgânico com a fórmula molecular C_2H_5OH . Possui massa molar de 46,069 g/mol, massa específica de 0,7893 g/cm³ (20°C), ponto de fusão -114,1 °C e ponto de ebulição em 78,2 °C (PUBCHEM).

Pode ser utilizado em bebidas, desinfecção, solvente e como combustível. Pode ser produzido por síntese, a partir da hidratação do etileno e etino ou a partir de gases de petróleo e hulha. Outra maneira de obtenção e também a mais comum, é por meio de fermentação alcoólica com leveduras e bactérias, sendo a *Saccharomyces cerevisiae* o microrganismo mais utilizado para produção de etanol de 1ª geração.

O uso do etanol como combustível havia sido testado no início do século XX, com testes de motores à explosão utilizando etanol. Porém, apenas a partir de 1970 com a alta do preço do petróleo, que foram realizados esforços para produção em larga escala de etanol comburente. Foi criado então o Programa Nacional do Álcool (Próalcool), cujo objetivo era incentivar a produção de etanol. No fim da década de 80, o programa declinou devido à queda do preço do petróleo. A partir de 2003, com o surgimento dos carros “flex”, que eram capazes de utilizar tanto etanol quanto gasolina como combustível, que a produção de etanol no Brasil voltou a crescer até 2008, quando ocorreu uma nova crise internacional (MORAES; BACCHI, 2014).

Mais recentemente o mundo voltou a discutir a redução de gases atmosféricos que intensificam o efeito estufa. Surgindo assim um esforço conjunto de países do mundo todo para a realização de um acordo, que seriam responsáveis em reduzir as emissões, principalmente de CO₂ e outros gases. Este acordo, foi denominado o Acordo de Paris (MMA, 2018), cujo período para inscrição de países encerrou-se em 21 de abril de 2017. O Brasil, participa deste acordo com um compromisso de redução de gases do efeito estufa em 37% abaixo dos níveis de emissão do ano de 2005 até 2025 e mais adiante de 43% até 2030 (MMA). Para atingir este objetivo, foi elaborado o programa RenovaBio do Ministério de Minas e Energia (MME, 2017), cujo objetivo é aumentar a participação de biocombustíveis na matriz energética do país em até 18% até 2030, estabelecer parâmetros para assegurar a previsibilidade do mercado de biocombustíveis nacionais.

Os maiores produtores de etanol no mundo são os Estados Unidos e o Brasil, responsáveis no ano de 2018 por respectivamente por 57,66% e 27,44% da produção mundial de etanol (Figura 1). Utilizando como matéria-prima milho e cana-de-açúcar, respectivamente. Outras matérias primas são utilizadas também, como a beterraba açucareira na Europa.

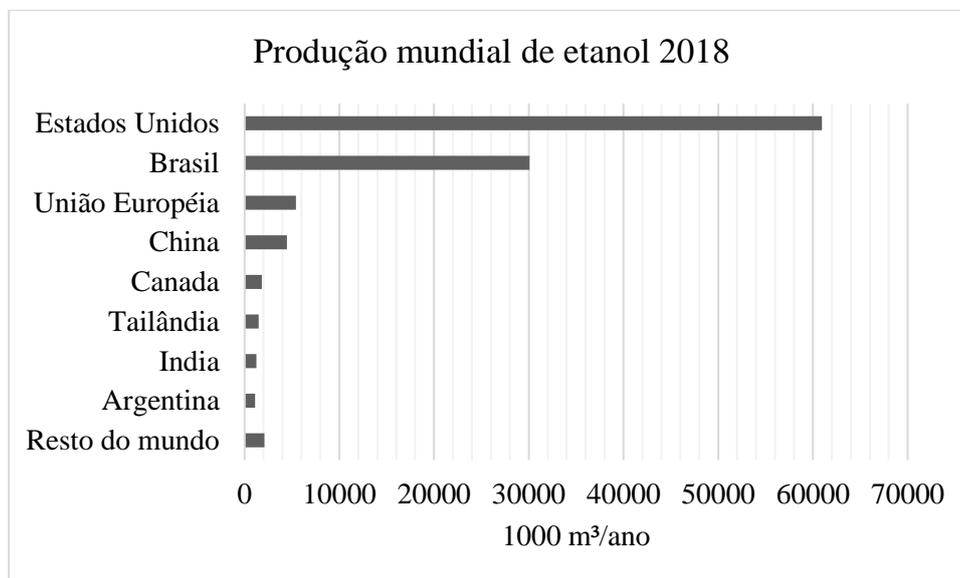


Figura 1 - Gráfico sobre a produção mundial de etanol no ano 2018. Elaboração própria com dados da Renewable Fuel Association (<https://ethanolrfa.org/statistics/annual-ethanol-production/>).

Nestes países as matérias-primas utilizadas são respectivamente o milho e a cana-de-açúcar. O principal uso do etanol é como combustível e no Brasil também é utilizado como aditivo da gasolina. Sendo obrigatória a adição de 27% de etanol anidro na gasolina comum, pela Portaria Nº 75 (05/03/2015) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

No Brasil as especificações de qualidade do etanol hidratado (tabela 1) e anidro são definidas pela Agência Nacional do Petróleo (ANP), a qual regula o mercado de combustíveis e derivados de petróleo no país, além de reger as normas sobre sua qualidade.

Tabela 1 - Especificações do etanol hidratado de acordo com a ANP. Adaptado de UDOP.

Característica	Unidade	
Aspecto	Límpido	-
Cor	Incolor.	-
Acidez total, máx. (em miligramas de ácido acético)	30	mg/L
Condutividade elétrica, máx.	350	µS/m
Massa específica a 20°C	807,6 a 811,0	kg/m ³
Teor Alcólico (°GL)	95,1 a 96,0	% volume
	92,5 a 93,8	%massa
pH	6,0 a 8,0	-
Teor de etanol, mín.	94,5	% volume
Teor de água, máx.	4,9	% volume
Teor de metanol, máx.	1	% volume
Resíduo por evaporação, máx.	5	mg/100 mL
Goma Lavada	5	mg/100 mL
Teor de hidrocarbonetos, máx.	3	% volume
Teor de cloreto, máx.	1	mg/kg
Teor de sulfato, máx.	4	mg/kg

MATÉRIA-PRIMA

2.1.1. Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum L.*) é uma gramínea perene, constituída de colmo, folha e raízes. Pertence à família Poaceae e é originária do sudeste da Ásia e se desenvolve melhor em clima tropical, não sendo adaptada a climas temperados (SANTOS; DIOLA, 2015).

A colheita pode ser realizada mais de uma vez sem a necessidade de novos plantios e nas usinas do Brasil a colheita ocorre durante um período de aproximadamente 200 dias ao ano (EMBRAPA; REIS *et al.*, 2013). A produtividade média do cultivo da cana é de 53 ton/hectare e a composição varia de 10% a 18% para sacarose e 11% a 16% para quantidade de fibras, sendo o restante de sua composição água (SANTOS; DIOLA, 2015).

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo. O cultivo de cana-de-açúcar foi introduzido no período colonial, e transformou-se em uma das principais culturas da economia brasileira. A cana é cultivada principalmente nas regiões Nordeste e Centro-Sul do país, sendo que a região centro-sul é responsável por 90% da produção nacional.

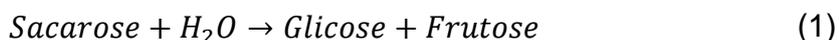
Na safra brasileira de 2018 produziu-se 620,41 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, uma redução de 2% em relação ao ano de 2017. Com produção de 29,039 milhões de toneladas de açúcar e 33,142 bilhões de litros de etanol. (CONAB, 2019).

Além da cana-de-açúcar, outras fontes de biomassa podem ser utilizadas, desde que contenham conteúdo elevado de açúcares ou fontes de carbono como a sacarose ou amido. Atualmente as matérias primas mais utilizadas são: cana-de-açúcar, beterraba, sorgo, milho, mandioca, trigo e centeio. Dentre estas, a cana-de-açúcar possui a vantagem energética em relação às outras fontes de carbono possíveis e com a cana é possível realizar cogeração de energia elétrica utilizando o bagaço da planta, suprimindo assim as necessidades de energia elétrica e térmica do processo, sendo possível até mesmo a venda de energia elétrica excedente das usinas (MANOCHIO *et al.*, 2017).

2.1.2. Mel Invertido

Os açúcares da cana-de-açúcar estão presentes em maior quantidade na forma de sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$), um açúcar indiretamente fermentescível, o qual deve ser hidrolisado em açúcares simples para ser processado pelo microrganismo. Apenas 5% dos açúcares presentes no vegetal estão presentes na forma de glicose e frutose (EMBRAPA). Neste trabalho foi utilizado mel invertido, ou sacarose hidrolisada, como substrato para a fermentação. A partir da hidrólise da sacarose tem-se a liberação de glicose e frutose para serem consumidas para a produção de etanol sem a necessidade do microrganismo ter de produzir/secretar enzimas para realizar esta hidrólise (SILVA, 2016).

O processo da inversão/hidrólise de sacarose (Equação 1), desdobramento da molécula de sacarose em glicose e frutose, pode ocorrer em meio ácido ou por meio da enzima Novozymes® Invertase® IV031040. Este processo é comumente denominado de inversão pois ocorre a inversão do desvio da luz polarizada.



No processo industrial ocorre a hidrólise ácida da sacarose durante o processo do tratamento de clarificação do caldo, que é realizado em meio ácido com adição de sulfatos, os quais diminuem consideravelmente o pH do caldo (ACORSI *et al.*, 2013; SILVA, 2016). Nessa pesquisa foi utilizado o mel rico de usina sucroalcooleira (altamente concentrado em sacarose) após processo de inversão por enzimas, para aumentar a disponibilidade de glicose para a fermentação.

2.1.3. Clarificação do mel

Após a extração do caldo de cana-de-açúcar estão presentes algumas impurezas que podem afetar a fermentação, além de causar desgaste e entupimentos em equipamentos. Dentre os compostos que dão cor ao mel pode haver aqueles que são tóxicos, sendo separados nesta etapa ou inativados. (BOUALLAGUI *et al.*, 2013; SANTOS; DIOLA, 2015; YAMAKAWA *et al.*, 2017). Estas são removidas empregando-se tratamentos físico, como peneiramento e filtração para remoção de areia, bagacilho e outros sólidos em suspensão (LOPES *et al.*, 2011). E tratamentos químicos como sulfitação e calagem ou floculação-decantação com ação de polímeros, que auxiliam na remoção de compostos solúveis e coloidais (YAMAKAWA *et al.*, 2017).

Em indústrias este processo é feito com a adição de cal e polímeros no caldo extraído da cana-de-açúcar, esta adição insolubiliza componentes que são posteriormente removidos por decantação e o lodo formado, constitui aproximadamente 10% do volume do caldo, é posteriormente filtrado em filtros rotativos e filtro prensa. O filtrado obtido a partir deste material retorna ao processo e a torta de filtração vai para as lavouras para ser utilizada em adubação (GUIDINI, 2013; LOPES *et al.*, 2011).

MICROORGANISMO: SACCHAROMYCES CEREVISIAE

O agente de fermentação alcoólica mais utilizado é a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 2), um organismo heterótrofo, que obtém energia a partir da glicose e possui a capacidade de realizar fermentação alcoólica (REIS *et al.*, 2017; MACHÍN *et al.*, 2016).

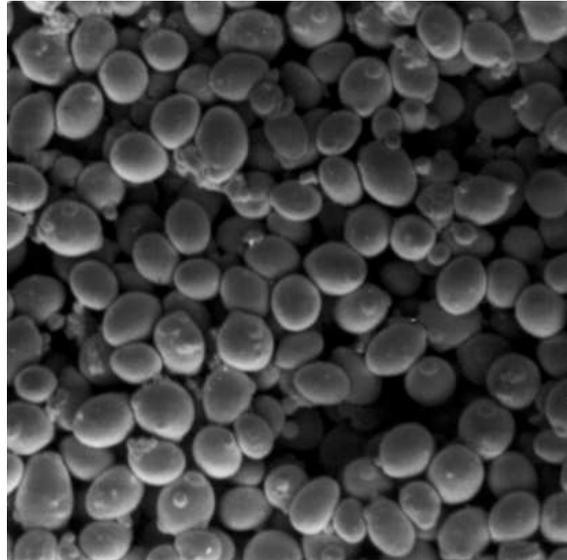


Figura 2 - Células de *Saccharomyces cerevisiae* via microscopia eletrônica. Adaptado de: ALBERTINI, 2001.

A *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo mesófilo, ou seja, está mais ativa nas temperaturas de 20 a 40°C. Também apresenta elevada resistência à meios ácidos, suportando pH 2,0 (REIS *et al.*, 2017).

Este microrganismo se desenvolve disperso no meio, mas também pode formar flocos, colônias rudimentares e pseudo-hifas. Porém, a presença destas formas agregadas de células pode ser um sinal de desvios no processo e elas dificultam os processos fermentativos devido à diminuição de área superficial das células em contato com o meio de cultivo (REIS *et al.*, 2017).

A formação de flocos durante a fermentação pode ser preocupante ao tentar pensar em trabalhar com fermentação em regime contínuo, pois traria um desafio para manter as células na dorna. Pois os flocos podem ser arrastados junto à corrente de retirada de meio ou sedimentarem no fundo do reator. Por outro lado, também pode ser uma característica positiva, pois existe a possibilidade de trabalhar com recipientes de fermentação construídos em colunas, controlando sua vazão de maneira que a dorna opere como um reator de leito fluidizado, com os

flocos não atingindo nível superior da coluna de maneira a evitar a perda de células ou recuperando células utilizando decantação (SANTOS; DIOLA, 2015).

FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

A fermentação é um processo metabólico anaeróbico para obtenção de energia a partir de fontes de carbono. Um exemplo é a utilização de hexoses (glicose e frutose) tendo como principais produtos o etanol e o CO₂ (Equação 2) também formando como subprodutos o glicerol, ácido pirúvico, ácido succínico e álcoois superiores. Esta reação parece simples, porém na verdade é composta de uma série de reações envolvendo enzimas do agente da fermentação (AIBA; HUMPHREY; MILLIS, 1973; BAILEY; OLLIS, 1985; BORZANI *et al.*, 2001).



2.1.4. Descontínuo

Processo descontínuo ou em batelada é realizado carregando-se o meio e o agente de fermentação no biorreator, dando assim início ao processo, que ocorre sem adição ou retirada de material durante a fermentação. Ocorrendo apenas o descarregamento do reator após o tempo de reação, onde se obtém uma mistura com os produtos em solução. Sua principal vantagem é sua principal característica, a simplicidade operacional do processo, enquanto sua desvantagem está atrelada a isto também, que é o tempo gasto entre as fermentações para carga, descarga e esterilização do reator para reinício do processo (AIBA; HUMPHREY; MILLIS, 1973; BAILEY; OLLIS, 1985; SCHMIDELL *et al.*, 2001).

É o processo mais utilizado nas indústrias nacionais, com a tecnologia atualmente disponível o tempo de fermentação foi reduzido para 9 horas. O tempo de descarga e esterilização do reator para reinício do ciclo depende da capacidade de processo de cada unidade industrial (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

2.1.5. Descontínuo-alimentado

Um processo operando em regime descontínuo-alimentado ocorre ao adicionar uma corrente líquida, contendo um ou mais nutrientes e aditivos, a um biorreator operando em regime descontínuo. Esta adição de nutrientes durante o curso da

fermentação têm o objetivo de estender a fase estacionária de maior consumo/produção do produto desejado mantendo adição constante de nutrientes e mantendo-os em nível baixo suficiente para minimizar a repressão catabólica, pois substrato que possa ser rapidamente metabolizado pode reprimir a expressão genética de enzimas relacionadas a caminhos metabólicos alternativos (CARVALHO & SATO, 2001; SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Para operar neste regime deve-se levar em conta que o volume do cultivo pode ser alterado enquanto durar a adição de líquidos ao reator, isto pode levar a diferentes perfis de concentração no meio. Um processo descontínuo-alimentado bem ajustado pode reduzir drasticamente o tempo de fermentação para uma determinada cultura (BAILEY; OLLIS, 1986; CARVALHO; SATO, 2001; SCHMIDELL *et al.*, 2001).

2.1.6. Contínuo

A principal motivação para desenvolvimento de um processo de fermentação em regime contínuo é a possibilidade de trabalhar em estado estacionário sob condições ótimas para a obtenção de um produto desejado, de maneira a otimizar o processo de maneira que o microrganismo empregado esteja sempre em sua máxima atividade de produção. Uma vantagem de se realizar um processo neste regime é a redução do tempo em que o equipamento ficaria inoperante devido à pausas ou limpezas e conseqüentemente obtendo uma maior produção do que fermentações realizadas em regime batelada (AIBA; HUMPHREY; MILLIS, 1973; COONEY, 1986; SCHMIDELL *et al.*, 2001). Outras possibilidades de uso para processos fermentativos neste tipo de operação são o estudo da ação de substâncias no metabolismo dos microrganismos, a obtenção de informações sobre o metabolismo e a otimização de condições de operação (GREGORI, 1974).

O que caracteriza um processo contínuo é o meio de cultura ser constantemente renovado, assim, a partir da inoculação, as condições começam a variar de forma progressiva (BORZANI *et al.*, 2001). Logo, ao trabalhar com reatores do tipo tanque agitado deve-se analisar com maior cuidado a taxa de diluição, a quantidade de inóculo e a concentração que se deseja manter no reator. Pois a característica principal de reatores do tipo tanque agitado é que a concentração do meio é a mesma de sua saída. Deste modo, se tem na corrente de saída uma quantidade de

células, produto formado e açúcares residuais de acordo com o tempo de residência, o qual varia com a taxa de diluição empregada no processo.

No entanto, operar um processo em regime contínuo requer estudo das características e do metabolismo do microrganismo que será o agente da fermentação, de maneira que se possa explorar suas rotas metabólicas com objetivo de minimizar o crescimento e maximizar a produção de um metabólito específico. De maneira que é vital conhecer todas as necessidades nutricionais para se evitar inviabilizar o microrganismo ou inibir a formação do produto desejado.

Um dos problemas que afetam a fermentação nesse tipo de operação é a **manutenção da esterilidade do reator**, pois um processo em regime contínuo tem maior sensibilidade à contaminação. Pode-se reduzir a formação do produto desejado devido ao consumo do substrato pela cepa contaminante. É importante prevenir que isto aconteça e também o preparo contra medidas para esta contaminação ou até mesmo uma paralisação e reinício do processo fermentativo de acordo com o índice da contaminação (BORZANI *et al.*, 2001; AIBA; HUMPHREY; MILLIS, 1973; COONEY, 1979).

Outro problema é a **falta de homogeneidade no reator**, a qual causa quedas de rendimento devido à formação de zonas mortas no reator. Este problema se torna mais grave quanto mais espesso e viscoso for o meio e é percebido com maior intensidade à baixas taxas de diluição. Pode ser minimizado com agitação e com aeração em sistemas que necessitam de O₂. Além deste, também podem ocorrer **problemas com a estabilidade**, pois pode surgir mutação na levedura com diferentes características de modo que as condições de trabalho não sejam mais adequadas e ocorra queda de rendimento ou de viabilidade celular. Em relação à operação em regime contínuo é recomendado evitar trabalhar com taxas de diluição próximas ao ponto de “lavagem” e alterações na alimentação do reator podem causar instabilidade na concentração celular e formação de produtos. (AIBA; HUMPHREY; MILLIS, 1973; SCHMIDELL *et al.*, 2001)

Trabalhar com processos em regime contínuo é possível ao adaptar os equipamentos disponíveis, ou utilizar equipamentos já projetados para funcionar em regime contínuo, em escala laboratorial, pode-se utilizar um recipiente com agitação e bombas peristálticas para manter um fluxo de alimentação e retirada contínuas, lembrando sempre que é necessário definir a taxa de diluição para definir a vazão de trabalho.

Neste trabalho foi utilizado um sistema simples de um estágio em recipiente fechado, com retirada de gases de exaustão por meio de um filtro de ar acoplado à uma mangueira, controles de temperatura, fluxos constantes de alimentação de meio e retirada de produtos utilizando bombas peristálticas. Similar ao da Figura 3.

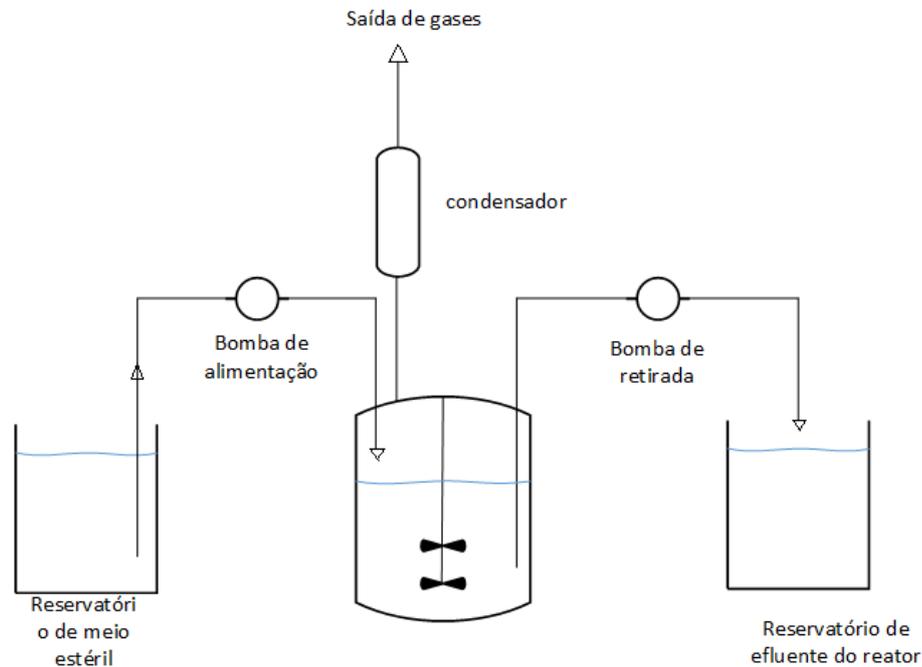


Figura 3 - Esquema de cultura de células em regime contínuo de um estágio.

FATORES QUE AFETAM A FERMENTAÇÃO

2.1.7. Nutrientes e meio de cultura

O mosto obtido a partir da cana é um meio rico em açúcares e possui também alguns nutrientes. Sua composição varia de acordo com a espécie da planta, clima e solo. Podendo ser necessário a suplementação de nutrientes secundários para a manutenção e crescimento de células. A concentração adequada de nutrientes é importante, pois se estiverem faltando ou em excesso podem prejudicar a fermentação (BORZANI *et al*, 2001; SOUZA; MONTEIRO, 2011).

O microrganismo *Saccharomyces cerevisiae* utiliza o nitrogênio nas formas amoniacal (NH_4^+), amídica (uréia) ou amínica (na forma de aminoácidos) e é incapaz de utilizar o nitrato e as proteínas presentes no meio de cultura. O fósforo é absorvido na forma de íon H_3PO_4^- (predominante no pH 4,5); enquanto o enxofre pode ser assimilado a partir de: sulfato, sulfito ou tiosulfato (MACHÍN *et al.*, 2016).

Portanto, é necessário garantir que no meio estejam presentes fontes de carbono, nitrogênio, fósforo, hidrogênio, enxofre, potássio, magnésio, cálcio, zinco, manganês, cobre, ferro, cobalto, iodo e micronutrientes (BORZANI *et al.*, 2001).

A adição de fontes de fósforo e nitrogênio no mosto minimiza a produção de metabólitos secundários contaminantes, auxiliando no processo fermentativo pois a presença destes afeta negativamente a fermentação pela sua toxicidade e também a qualidade do etanol (SILVA *et al.*, 2006).

Na Tabela 2 estão dispostos quais compostos foram adicionados ao mosto para vários trabalhos envolvendo fermentação com *Saccharomyces cerevisiae* e substrato proveniente do processamento de cana-de-açúcar. Em vários trabalhos é utilizado extrato de levedura na composição de seu meio. Em relação ao fósforo e potássio os nutrientes que mais aparecem sendo utilizados, são o fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e o superfosfato triplo. A adição de magnésio de acordo com os estudos de D'Amore (1992) também auxilia na produção de etanol utilizando *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabela 2 - Compilação da escolha de nutrientes de vários autores em diferentes trabalhos.

Autor	CaCl ₂ .H ₂ O (g/L)	Extrato de levedura (g/L)	KCl (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	MgSO ₄ . 7H ₂ O (g/L)	Na ₂ HPO ₄ (g/L)	(NH ₂) ₂ CO (g/L)	NH ₄ Cl (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	NH ₄ H ₂ PO ₄ (g/L)	Peptona (g/L)	ZnSO ₄ .7 H ₂ O (g/L)	superfosfato triplo (g/L)
Acorsi, R. L. (2012)							0,4						1
Borzani, W.; Falcone, M.; Vairo, M. L. R. (1960)					0,25					2			
Bouallagui <i>et al</i> (2013)		10		0,5	0,5			2			5		
Bueno, J. V. S. (2018)		4,5		5	0,5				4,5				
De Carvalho, <i>et al.</i> (1993)		3		2	1		0,5		1		3,5		
De Souza, J. L. U.; Monteiro, R. A. (2011)									0,1				0,1
Vasconcelos, J. N.; Lopes, C. E.; De França, F. P. (2004)							0,5						0,5
Gregory, R. E. (1974)					0,25	2,4							
Najafpour, G. D. (2017)		1		0,44		0,044							
Saha, <i>et al.</i> (2019)	0,2	10		10	0,5				5		10		
Silva, F. H. (2016)							0,4						1
Taylor, <i>et al.</i> (1998)	0,06	8,5			0,12			1					
Viegas, <i>et al.</i> (2002)		6	1	5	1			5					
Yamakawa, <i>et al.</i> (2017)					1		5			1,1		0,005	

2.1.8. Concentração de açúcares

As hexoses (glicose, frutose, sacarose, maltose ou galactose) são reagentes primários no metabolismo da fermentação alcoólica. Sob as condições fermentativas, a taxa de produção de etanol pode ser avaliada, sob o ponto de vista da concentração de açúcar no mosto, pela clássica equação de Monod (AIBA; HUMPHREY; MILLIS, 1973), Equação (3):

$$\mu_x = \mu_{m\acute{a}x} \frac{[S]}{K_s + [S]} \quad (3)$$

μ_x = produtividade específica de células (g células / (g de células. tempo));

[S] = concentração de açúcar no substrato (g/L)

K_s = constante de saturação

Nesta equação, o significado físico de K_s é que quando $S = K_s$ no modelo de Monod, tem-se que a velocidade específica de crescimento é igual à metade da velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_x = \mu_{m\acute{a}x}/2$). Segundo Schmidel *et al.* (2001), no início de um cultivo, quando há uma elevada concentração de substrato, o microrganismo apresenta μ_x próximo de $\mu_{m\acute{a}x}$ e pode permanecer com este comportamento até que a concentração de substrato diminua razoavelmente. De acordo com Moulin *et al.* (1980) a glicose se torna um composto inibidor da fermentação alcoólica quando em altas concentrações.

2.1.9. Temperatura

As leveduras são mesófilas (temperaturas ótimas entre 26°C a 35°C). À medida que a temperatura aumenta, a velocidade da fermentação (reação) aumenta, mas isto favorece a contaminação bacteriana e a sensibilidade da levedura à toxicidade do etanol e à desnaturação celular.

Temperaturas elevadas causam maior perda do etanol por evaporação em dornas abertas. Na fermentação alcoólica deve-se ter em mente o ponto crítico (maior intensidade de produção), que acontece de 12 a 15 horas após o início do processo e quando se observa o maior calor do meio. As informações supracitadas justificam o controle da temperatura no processo industrial (LIMA *et al.*, 2001).

De acordo com o trabalho de Tan *et al.* (2015), que estudaram os efeitos da temperatura em fermentação contínua utilizando caldo de beterraba como substrato e a *Saccharomyces cerevisiae* como microrganismo, observou-se que para temperaturas acima de 33°C, o número de células diminuiu. Porém, isto não afetou a concentração de etanol até temperaturas de 35°C. Em temperaturas acima disto, observou-se que a concentração de etanol diminuiu junto da viabilidade celular.

2.1.10. pH

A faixa de valores de pH mais adequada para a fermentação alcoólica é de 4 a 5. Nas usinas da região de Maringá, trabalha-se com pH do mosto entre 4,5 e 5,5. (LIMA *et al.*, 2001). Na etapa de processo de fermentação industrial ocorre a recuperação das leveduras de uma batelada para serem utilizadas em novas bateladas, para isso, faz-se tratamento com gotejamento de ácido sulfúrico, em um tanque contendo creme de leveduras centrifugado, até que o pH atinja 2,0 a 3,2. Este tratamento possui finalidade de controlar a contaminação e remoção de leveduras fragilizadas, pois a *Saccharomyces cerevisiae* resiste a esses níveis de pH (MACHÍN *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2001)

Para a etapa de fermentação em destilarias, o pH acaba sendo corrigido para a faixa entre 4 e 5 durante o processo, pois o caldo que vêm da etapa de tratamento chega às dornas com pH entre 5 e 7. Fermentações conduzidas em meios ácidos (<7) resultam em maiores rendimentos em etanol, ao restringir o crescimento do fermento, conseqüentemente menor produção de glicerol.

2.1.11. Inibidores da fermentação

Etanol é um elemento tóxico para as leveduras mesmo em pequenas quantidades (MOULIN *et al.*, 1980), por isso recomenda-se utilizar variedades de leveduras de alta tolerância nos processos industriais. O efeito da inibição do etanol sobre as leveduras é pequeno em baixas concentrações de etanol (menor que 20 g/L), mas aumenta rapidamente em altas concentrações. Para concentrações maiores que 110 g de etanol/L a atividade das leveduras cessa rapidamente (BAZUA; WILKIE, 1977). O etanol ataca a membrana plasmática e as membranas de várias organelas de microrganismos e leveduras, modificando a permeabilidade destas de maneira que começam a ocorrer perdas de cofatores e coenzimas, além

de outros efeitos inibitórios no metabolismo e desnaturação de proteína intracelular (D'AMORE, 1992).

O processo fermentativo pode ser inibido também por outras substâncias que podem estar presentes nos mostos. Como alguns minerais como potássio e cálcio, que apesar de serem nutrientes necessários para o metabolismo do microrganismo, em quantidades excessivas resultam em efeitos negativos na fermentação pois pode ocorrer o fenômeno de inibição de algumas enzimas e também alteração da pressão osmótica nas membranas celulares e das organelas (LIMA *et al.*, 2001).

O uso de uma etapa de sulfitação do caldo de cana para a clarificação, pode resultar em melaços com elevados teores de sulfito, elevando a toxicidade do meio para a levedura comprometendo a fermentação, bem como aumentar a acidez do etanol obtido. Por outro lado, o aumento da acidez do meio auxilia também no controle de contaminação bacteriana (LIMA *et al.*, 2001).

2.1.12. Contaminação bacteriana

A maior preocupação em processos fermentativos é em relação à contaminação. Pois a competição de agente fermentativo com outros microrganismos indesejados diminui o rendimento de produtos por consequência do consumo do substrato direcionado à formação de células do microrganismo contaminante e do consumo oriundo de seu metabolismo. Manter a contaminação sob controle faz necessário um maior rigor nas condições de higiene do processo desde a etapa da colheita da cana-de-açúcar até a etapa de fermentação. Para controle de contaminação pode-se utilizar temperaturas, pH, radiação, filtração, rompimento de células por vibrações, desinfetantes e agentes antibióticos. (BORZANI *et al.*, 2001).

A contaminação inicial em processos industriais ocorre durante a etapa de colheita quando a cana entra em contato com o solo. Esta contaminação já no início do processo provoca perdas de açúcares que seriam utilizados para produção de etanol ao serem consumidos para proliferação de bactérias. Dos principais agentes contaminantes presentes no caldo de cana, destacam-se as bactérias dos gêneros *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Aerobacter*, *Streptococcus* e *Leuconostoc* (AMORIM, 1982). Deste modo a matéria-prima nas indústrias fica exposta à proliferação de bactérias desde o momento da colheita até o momento

em que ocorre o tratamento do caldo, onde etapas de concentração e clarificação do caldo auxiliam também no controle de microrganismos, por ação do pH e temperaturas elevadas.

Em um processo de laboratório os cuidados que devem ser tomados são a esterilização prévia de todos equipamentos, recipientes e ferramentas que serão utilizadas para conter o meio, as soluções e de manuseio destes e do microrganismo. Pois os ensaios em regime de fermentação contínuo são bastante longos, o que os torna mais sensíveis à uma contaminação inicial. Deve-se tomar bastante cuidado com a assepsia também no momento da retirada de amostras pelos mesmos motivos supracitados.

CINÉTICA DE UM PROCESSO FERMENTATIVO

O estudo cinético de um processo fermentativo consiste em analisar a evolução dos parâmetros de concentração de seus componentes, normalmente a concentração de células, de substrato e de um produto de interesse, que neste caso é o etanol. Realizar este tipo de estudo, permite obter dados comparativos para diferentes condições de cultivo.

De acordo com Schmidel *et al.* (2001), a concentração celular pode mudar ao longo de uma fermentação, portanto convém analisar as velocidades instantâneas de transformação com relação à concentração celular para cada instante. Tais velocidades são denominadas velocidades específicas de crescimento, consumo e formação de produto (Equações 4 a 6):

$$\mu_X = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (4)$$

$$\mu_S = \frac{1}{X} \cdot \left(-\frac{dS}{dt} \right) \quad (5)$$

$$\mu_P = \frac{1}{X} \cdot \frac{dP}{dt} \quad (6)$$

Em que:

X = concentração de células (g/L).

S = concentração de substrato (g/L).

P = Concentração de produtos (g/L).

t = tempo (horas).

μ_X = velocidade específica de crescimento celular ($\text{g}_{\text{células novas}} \cdot \text{g}_{\text{células}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

μ_S = velocidade específica de consumo de substrato ($\text{g}_{\text{substrato}} \cdot \text{g}_{\text{células}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

μ_P = velocidade específica de produção de produtos ($\text{g}_{\text{produtos}} \cdot \text{g}_{\text{células}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

É importante lembrar que em cultivo descontínuo, a velocidade específica de crescimento atinge seu máximo durante a fase logarítmica. Nesta condição a velocidade é constante e máxima ($\mu_X = \mu_{\text{máx}}$) e é possível obter o tempo de duplicação (t_d) de acordo com a Equação (7):

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu_{\text{máx}}} = \frac{0,693}{\mu_{\text{máx}}} \quad (7)$$

Em que:

t_d = tempo de duplicação.

Conceitos de rendimento para processos fermentativos:

Rendimento de crescimento celular ($Y_{X/S}$), que nada mais é do que a quantidade de células produzidas pela quantidade de substrato consumido em um determinado intervalo de tempo, Equação (8):

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{\mu_X}{\mu_S} \quad (8)$$

Rendimento de produto baseado na massa de células ($Y_{P/X}$), ou seja, a quantidade de produto produzido por grama de células:

$$Y_{P/X} = \frac{P - P_0}{X - X_0} = \frac{\Delta P}{\Delta X} = \frac{\mu_P}{\mu_X} \quad (9)$$

Rendimento de produto baseado no substrato limitante ($Y_{P/S}$), que diz o quanto de produto foi formado em relação ao substrato consumido:

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} = -\frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{\mu_P}{\mu_S} \quad (10)$$

$$Y_{P/S} = Y_{X/S} Y_{P/X} \quad (11)$$

Onde:

X = concentração de massa de células (g/L).

S = Concentração de substrato limitante (g/L).

P = Concentração do produto (g/L).

No estudo de processos fermentativos utilizando um substrato limitante para controlar a atividade do microrganismo pode-se utilizar o modelo proposto por Monod, 1942 (Equação 3).

Para um reator em regime contínuo:

Definição de taxa de diluição (D):

$$D = F/V \quad (12)$$

Em que:

D = Taxa de diluição (h^{-1}).

F = Vazão (L / h)

V = Volume (L)

Segundo Aiba *et al.*, 1973, obtém-se a Equação (13) no caso de 1 reator do tipo tanque agitado em regime contínuo. Deste modo a velocidade específica de crescimento para o reator fica de acordo com a equação:

$$\mu_1 = D = \mu_{max} \frac{S_1}{K_S + S_1} \quad (13)$$

Da Equação (3) ou (13) tem-se que:

μ_{max} = velocidade máxima de crescimento quando o substrato é ilimitado ($\text{g}_{\text{células novas}} \cdot \text{g}_{\text{células}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

K_S = a concentração de substrato em que a velocidade específica de crescimento observada é metade do valor máximo, constante de saturação. Observa-se que, se $[S_1 / (K_S + S_1)]$ for menor do que a unidade, portanto $\frac{S_1}{K_S + S_1} < 1$, a velocidade máxima de crescimento possível no primeiro fermentador é sempre menor do que aquela teoricamente possível, isto é $D < \mu_{max}$. Isto só não é válido para o fermentador que não é perfeitamente misturado, quando há efeitos de concentração no encanamento de saída ou quando se usa reciclo.

Quanto ao estado estacionário para o produto: P, a equação que o representa é dada por:

$$P_1 = \frac{Y_{P/X} \mu_1 X_1}{D} = Y_{P/X} X_1 \quad (14)$$

O mesmo acontecendo para o substrato limitante no estado estacionário, que é dado por:

$$S_1 = S_0 - \frac{Y_{P/X}}{Y_{P/S}} \mu_1 X_1 = S_0 - \frac{Y_{P/X}}{Y_{P/S}} X_1 = S_0 - \frac{1}{Y_{X/S}} X_1 \quad (15)$$

$$S_1 = S_0 - \frac{1}{Y_{X/S}} X_1 \quad (16)$$

Considerando o primeiro recipiente individual, se tem a equação:

$$S = \frac{\mu_1 K_S}{\mu_{m\acute{a}x} - \mu_1} \quad (17)$$

Que substituída por $D = \mu_1$, na equação anterior, leva a equação que se segue:

$$S = \frac{DK_S}{\mu_{m\acute{a}x} - D} = \frac{K_S}{\frac{\mu_{m\acute{a}x}}{D} - 1} \quad (18)$$

Pela equação do estado estacionário para o substrato no caso especial que $D \ll \mu_{m\acute{a}x}$, tem-se:

$$X_1 = Y_{X/S}(S_0 - S_1) \quad (19)$$

Nota-se pelas equações anteriores que o valor de S_1 , a concentração de um substrato limitante no meio de cultura do recipiente individual, inicia-se de zero e aumenta na proporção do aumento de D , enquanto $D \ll \mu_{m\acute{a}x}$.

Quando o valor de D se aproxima de $\mu_{m\acute{a}x}$, o valor de S_1 aumenta rapidamente. Para a concentração de células X_1 , para valores baixos de D é aproximadamente $Y_{X/S}S_0$. Este fenômeno que ocorre quando os valores de D se aproximam de $\mu_{m\acute{a}x}$, onde $S_1 - S_0$ se aproxima de zero é denominado de "lavagem", que é quando a taxa de crescimento não consegue mais se manter nesta situação. Portanto, é recomendado evitar operar em condições próximas da "lavagem", pois pequenas variações na taxa de diluição podem causar grandes variações de S_1 e X_1 .

3. OBJETIVOS

Estabelecer um estudo do processo fermentativo, em um reator do tipo tanque agitado, em regime contínuo, com baixas vazões de alimentação de mel diluído, invertido e clarificado de cana-de-açúcar, com o microrganismo *Saccharomyces cerevisiae*, como agente da fermentação. Verificando ainda a possibilidade do estabelecimento de estado estacionário em reatores de bancada operando com baixas vazões de alimentação do meio nutriente.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

DESCRIÇÃO DO MEIO DE CULTURA

O meio de cultura utilizado foi uma solução preparada a partir do mel rico final de cana-de-açúcar, disponibilizado pela Usina Santa Terezinha – Unidade Iguatemi, o qual foi coletado na corrente de abastecimento dos tanques do setor de destilaria da unidade, local onde procede-se a fermentação e posterior separação do etanol na unidade. Conforme avaliado, a concentração de açúcares redutores totais (ART) do mel era de aproximadamente 600 g/L. Com este mel, foi preparado uma diluição com posterior inversão enzimática utilizando a enzima Novozymes® Invertase® IV031040, depois clarificado de acordo com a metodologia de clarificação estabelecida por Mendonça (2018) e finalmente diluído até a concentração que era utilizada em cada ensaio.

De acordo com Silva (2016) e Acorsi (2013), o meio preparado a partir do mel rico de cana-de-açúcar pode não ter quantidade de nitrogênio e fósforo suficiente, o que afeta o metabolismo das leveduras. Portanto, se realizou a suplementação durante o preparo do meio para garantir que o substrato limitante da fermentação fosse somente a concentração de ART. O preparo do meio a partir do mel rico de cana-de-açúcar foi feito conforme as etapas a seguir: Diluição, inversão, clarificação, suplementação de nutrientes e esterilização.

MICROORGANISMO

Foi utilizado o microrganismo *Saccharomyces cerevisiae* na forma de fermento seco comercial da marca Itaiquara® nos ensaios fermentativos para que fosse utilizado sempre o mesmo lote nos ensaios de fermentação.

DILUIÇÃO DO MEL

O mel utilizado, possuía alta concentração de ART, apresentando uma alta viscosidade, retenção nas paredes do recipiente que o contém, dificultando a transferência precisa em volume. De acordo com Silva (2016), a melhor maneira de utilizá-lo foi por medidas mássicas, com o preparo de suspensões de concentração de substrato bem definidas.

Porém, nesta abordagem faz-se necessário realizar a conversão de volume para massa da medida de mel. Para isto Silva (2016) sugeriu a utilização de uma equação obtida com base em uma tabela de massas específicas de soluções açucaradas da empresa SUCRANA, assim, se obteve uma equação que relaciona

a densidade da solução açucarada ($\rho_{solução}$) com a concentração de açúcares presente em solução ($C_{açúcares}$), com $R^2 = 0,9999$:

$$\rho_{solução} \left(\frac{g}{L} \right) = 0,4 \cdot C_{Açúcares} \left(\frac{g}{L} \right) + 1001,9 \quad (20)$$

A partir da massa específica obtida na Equação (20), utilizou-se a Equação (21) e calculou-se massa de mel (M_{mel}) que foi adicionada na diluição para o volume de mel (V_{mel}) que se desejava preparar:

$$M_{Mel}(g) = \rho_{solução}(g/L) \cdot V_{mel}(L) \quad (21)$$

PREPARO DA SOLUÇÃO DA ENZIMA NOVOZYMES® INVERTASE® IV031040

Para proceder a inversão do mel, deve-se estabelecer uma quantidade de sacarose que seria invertida, portanto foi necessário estabelecer a massa de mel que seria invertida e conhecer sua concentração, pois utilizou-se apenas a quantidade de enzima suficiente no preparo da solução de enzima Novozymes® Invertase® IV031040, que foi utilizada imediatamente após o preparo.

O cálculo da quantidade de enzima é proporcional à quantidade de sacarose máxima presente no mel (Equação 24), considerando que todo açúcar presente fosse sacarose, na proporção de 0,0002 g de enzima Novozymes® Invertase® IV031040 por grama de sacarose, conforme o equacionamento a seguir:

$$M_{SacaroseMaxMel}(g) = C_{Mel}(g/L) \cdot V_{mel}(L) \quad (22)$$

$$M_{Invertase}(g_{Invertase}) = 0,0002 \left(\frac{g_{Invertase}}{g_{sacarose}} \right) \cdot M_{SacaroseMaxMel}(g_{Sacarose}) \quad (23)$$

$$M_{Invertase}(g_{Invertase}) = 0,0002 \left(\frac{g_{Invertase}}{g_{sacarose}} \right) \cdot C_{Mel}(g_{Sacarose}/L) \cdot V_{mel}(L) \quad (24)$$

Com a massa de enzima definida, procedia-se a pesagem em um béquer de 10 mL, em uma balança analítica de precisão. Após a pesagem, transferia-se quantitativamente esta massa a um balão volumétrico de 250 mL com auxílio de uma pisseta com água destilada. Em seguida agitava-se o balão até obter-se uma solução homogênea de enzima e completava-se com água destilada.

INVERSÃO DO MEL

Em um béquer ou erlenmeyer, de tamanho adequado para comportar o volume final da diluição, era pesada a massa de mel rico definida pelo cálculo da concentração do meio que se desejava preparar (Equações 20 a 24). Após isto, adicionava-se uma solução tampão de acetato (pH 4,5) na concentração de 1 mol/L, previamente preparada, em uma quantidade de 5% do volume final da diluição, com auxílio de uma proveta.

Em seguida era adicionada a solução contendo a enzima Novozymes® Invertase® IV031040 e completava-se o volume com água destilada até atingir o volume total da solução que se desejava preparar. Homogeneizava-se a solução com auxílio de um bastão de vidro, recomenda-se posteriormente tampar a solução, que deve ser levada a um banho termostático a 50°C com agitação mecânica por um período de 2 horas (Figura 4), tempo suficiente para que ocorra a inversão de toda a sacarose presente na solução.



Figura 4 - Mel sendo invertido em banho termostático a 50°C com agitação mecânica.

SUPLEMENTAÇÃO DE NUTRIENTES

Para suprir a falta de alguns nutrientes essenciais no mel, é recomendado realizar a suplementação com adição de nitrogênio, fósforo e magnésio. Neste trabalho foram utilizados o fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) e sulfato de

magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em concentração de 1g/L e ureia ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$) na concentração de 0,4 g/L.

Para cada ensaio foram preparadas soluções destes nutrientes nas concentrações de 40 g/L de ureia ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$), 100g/L de sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e 100 g/L de fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4). Destas soluções foram utilizados volumes para que no meio houvesse 1,0 g/L de K_2HPO_4 , 1,0 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,40 g/L de ureia.

Com o objetivo de minimizar a contaminação nos ensaios, as soluções dos nutrientes foram preparadas no dia do preparo do meio para serem utilizadas e o meio esterilizado em autoclave de maneira que já ficasse pronto para o ensaio experimental. Assim, evitou-se guardar material por períodos prolongados.

ESTERILIZAÇÃO DOS MATERIAIS

Todas as soluções preparadas (substrato, nutrientes, tampão), instrumentos e recipientes utilizados foram previamente esterilizados antes do preparo de cada ensaio com objetivo de evitar contaminação. Para a esterilização fez-se uso de autoclave a 120°C e pressão manométrica de 1 atm com duração mínima de 20 minutos. Depois os recipientes contendo as soluções foram secados em estufa e armazenados em geladeira até o uso. Os instrumentos e as soluções, com exceção da levedura, foram colocados em um banho de ultravioleta na câmara de fluxo laminar durante 20 a 40 minutos antes da utilização.

TESTE DE HOMOGENEIDADE DO REATOR

Segundo metodologia realizada por Gregory (1973), a verificação da homogeneidade do sistema pode ocorrer colocando-se no fermentador uma suspensão do microrganismo em água destilada.

Com o fermentador nas condições dos ensaios, inicia-se a alimentação da dorna com água destilada e periodicamente retirando-se amostras de 10mL da suspensão existente no fermentador e mede-se a absorbância em um espectrofotômetro a 610 nm (OLIVO, 1985).

Se o fermentador se comportar como um sistema perfeitamente homogêneo, a variação da absorbância de suspensão deve se ajustar bem à equação (25):

$$\log A = \log A_0 - \frac{D}{2,303} t \quad (25)$$

Em que:

A_0 = Absorbância no instante zero;

A = Absorbância no instante t ;

D = vazão específica de alimentação do fermentador.

CLARIFICAÇÃO DO MEL UTILIZANDO POLÍMEROS

A clarificação ocorreu com polímeros disponibilizados pela empresa GC Química, sendo os polímeros AGP-1009 (catiônico) e AGP-1000 (aniônico), que são utilizados para tratamento de água e efluentes na remoção de compostos orgânicos, agindo como agentes floculantes. Nessa pesquisa foram realizados testes com os polímeros citados em combinação, isolados e com concentrações diferentes para definir como seria realizada a clarificação do mel para os ensaios fermentativos.

Os polímeros disponibilizados se encontram na forma de pequenos cristais. Para a utilização era recomendado preparar suspensões de cada um, adicionando lentamente em água com aquecimento brando para que fosse realizada a suspensão. De acordo com instruções do fornecedor, suspensões podem ser preparadas nas concentrações mássicas de 0,2% e 0,1%, respectivamente, para os polímeros catiônico e aniônico. Para o preparo da suspensão dos polímeros fez-se uso de um agitador magnético por um período de 30 a 60 minutos com leve aquecimento.

Para se obter um parâmetro de alteração na cor/turbidez do mel, foram realizadas leituras em um espectrofotômetro Shimadzu UVmini-1240 no comprimento de onda de 420 nm (MANDRO *et al.*, 2017), comparando amostras com e sem ação de polímeros para verificar a efetividade deles.

Ensaio foram realizados em tubos de centrífuga, onde mel e polímero foram adicionados utilizando pipetas e micropipetas. Após cada tubo estar com a quantidade estabelecida de material os tubos foram agitados em um agitador de soluções Phoenix AP56.

Após um período de no mínimo duas horas em repouso, os tubos foram centrifugados a 5000 rpm por 10 minutos para precipitação dos flocos formados pelos polímeros. Em seguida, preparou-se diluições para a leitura em espectrofotômetro a 420 nm, utilizando como branco água destilada.

CLARIFICAÇÃO DO MEL

Para utilização de maiores quantidades de melaço clarificado, preparou-se próximo à data de cada experimento, suspensões de polímeros na concentração recomendada pelo fabricante e em volume adequado ao necessário para cada ensaio. Era necessário preparar próximo ao período em que seria utilizado, dado o fato que a suspensão de polímeros poderia se degradar com o tempo. Fato este que foi observado com solução armazenada na geladeira, a qual, apresentou sinais de crescimento de microrganismos com formação de aglomerados.

Para utilização da suspensão de polímero no mel já previamente invertido, primeiramente as suspensões devem ser esterilizadas em um banho de luz ultravioleta por no mínimo 20 minutos dentro da câmara de fluxo laminar. Posteriormente com auxílio de um bico de Bunsen, evitava-se a contaminação pelo ar, na transferência de suspensões de um recipiente para outro contendo melaço. Após adição da solução de polímeros, fechava-se e agitava-se o recipiente, promovendo nova etapa de esterilização por luz ultravioleta por mais 20 minutos, pois o recipiente ficaria em repouso por um período de algumas horas para aguardar a formação de flocos, que posteriormente seriam separados do meio.

A separação da fração coloidal formada pelos polímeros fez-se de duas maneiras: 1) Por filtração em filtro prensa com duas camadas, com filtros de celulose e algodão, com filtro terras diatomáceas. 2) Por meio de centrifugação do meio ainda concentrado.

4.1.1. Filtração com filtro prensa

Para utilização do filtro prensa foi necessário primeiramente esterilizar os filtros, para isto foram colocados em solução com ácido acético e depois lavados com água destilada e secos em estufa.

Foram utilizadas camadas de pré-filtração com terras diatomáceas sobre fibras de celulose em suspensões obtidas pelo processamento de papel filtro. Para a formação das camadas de pré-filtração, foram adicionadas primeiramente as fibras de celulose em um béquer de 4 litros contendo meio estéril e este foi passado através do filtro até não se verificar mais a presença das fibras em suspensão no meio, o que significava que todas as fibras teriam sido depositadas nas camadas do filtro. A mesma operação foi realizada com terras diatomáceas para depois filtrar todo o meio preparado, que em seguida foi levado à autoclave para ser esterilizado.

4.1.2. Centrifugação

A centrífuga (Figura 6) foi utilizada para separar as células de levedura em suspensão do vinho para realização das análises de massa celular via espectrofotometria e também no preparo do meio utilizado nos ensaios fermentativos com meio clarificado realizando a separação dos flocos formados durante a etapa de clarificação com polímeros. Para precipitar o material formado pela ação dos polímeros (Figura 5) foram utilizados tubos de 50 mL, de maneira a se conseguir processar 300 mL de meio por vez, devido à centrífuga ter suporte para 6 tubos em seu cesto de agitação. O sobrenadante foi coletado em um recipiente dentro da câmara de fluxo laminar para manter a esterilidade e o precipitado (fração coloidal) foi descartado.



Figura 5 - Tubo de centrífuga contendo mel invertido a 300 g/L com precipitado formado por ação de polímeros como precipitado.

Para a operação da centrífuga observa-se que ao se colocar material neste equipamento deve-se certificar de que os tubos estão colocados em arranjo espelhado e com massas iguais para evitar desbalanceamento do eixo, pois isto leva a danificar o aparelho e provocar acidentes.



Figura 6 - Centrífuga do DEQ.

Após posicionar os tubos contendo material nos suportes do equipamento, deve-se fechar a tampa e acionar a chave de liga-desliga da centrífuga e ajustar o temporizador até a posição de 5 minutos. No caso de se observar vibração ou barulho no equipamento, acionar o botão de parada para abortar.

Após a separação da fração coloidal, coletava-se uma amostra do recipiente contendo o sobrenadante antes de nova esterilização, da qual, foi analisada a quantidade de açúcares redutores totais via método DNS (item 4.12.5), pois podem ocorrer alterações na concentração e perda de açúcares durante a etapa de clarificação-separação.

Após mensurar a concentração, são preparadas as diluições de meio contendo os açúcares nas concentrações utilizadas em cada ensaio.

PREPARO PARA ENSAIOS EM BATELADA

Como havia a possibilidade de os polímeros influenciarem negativamente o rendimento da fermentação devido a de remoção de nutrientes do mel, experimentos foram necessários para verificar esta hipótese. Para as fermentações em batelada realizadas em incubadora agitada com controle de temperatura, ou “shaker”, preparou-se 900 mL de solução de mel invertido com concentração de

açúcares de 300 g/L para passar por clarificação com polímeros, utilizando diferentes combinações destes, para posteriormente ser diluído e utilizado nas fermentações. Como reatores foram utilizados erlenmeyers de 250 mL previamente esterilizados, e de acordo com as condições de cada ensaio, foram separados em grupos.

Para cada sequência de reatores, estes foram preparados utilizando uma suspensão concentrada de mel, da qual foi adicionado a quantidade necessária em cada recipiente para atingir a concentração de cada ensaio. Deste modo, preparou-se cada frasco considerando o volume final da diluição de 150 mL ou 165 mL após adição de mel invertido e clarificado concentrado, leveduras em suspensão, nutrientes e água destilada. O mel foi adicionado com auxílio de uma proveta de 250 mL e pipetas de volume variável para adição dos outros componentes (células e nutrientes).

Para iniciar as fermentações, cada reator foi inoculado individualmente após todos materiais, exceto as leveduras, ficarem sob luz ultravioleta por 20 minutos em uma câmara de fluxo laminar. Após adição do meio, nutrientes e levedura, retira-se a amostra inicial e liga-se um cronômetro para marcar o início da fermentação. Em seguida os reatores eram fechados utilizando rolhas perfuradas acopladas a uma mangueira para retirada de CO₂ e posicionados na incubadora agitada com controle de temperatura tal como utilizado por Bueno (2018) (Figuras 7 e 8).

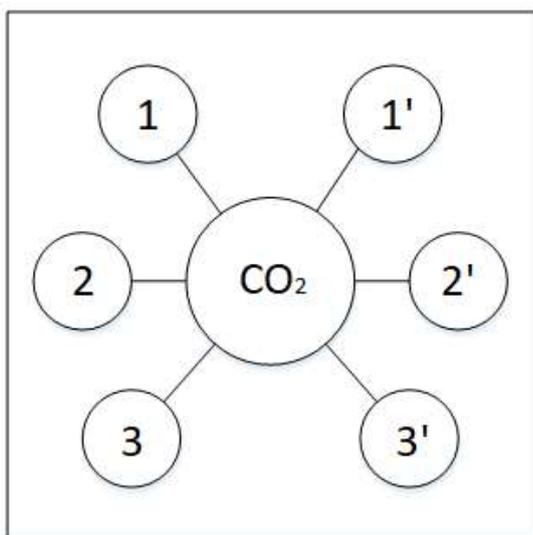


Figura 7 – Diagrama do arranjo dos reatores dentro da incubadora com agitação.



Figura 8 - Ilustração com os reatores já montados na incubadora.

A concentração de açúcares nos ensaios descontínuos foi estabelecida de acordo com dados de Acorsi (2012), que indicaram maior atividade de crescimento celular em baixas concentrações de substrato. Deste modo a investigou-se neste trabalho o comportamento do microrganismo *Saccharomyces cerevisiae* em mel invertido com concentrações de açúcares de 33, 50 e 70 g/L. A quantidade de células no inóculo foi de 15 g/L em massa seca de células (50 g/L massa úmida), uma alta concentração para minimizar a velocidade de crescimento celular e verificar apenas efeito do agente clarificante na produção de etanol.

Nestes ensaios, amostras foram retiradas (15mL) nos pontos inicial e final da fermentação. O ponto final foi estimado de acordo com a duração dos experimentos realizados por Acorsi (2012) e Silva (2016), que realizaram vários experimentos em regime batelada e diferentes faixas de concentração inicial de substrato. Destas amostras foram feitas análises de: pH, concentração de células de acordo com o método desenvolvido por Olivo (1985), concentração de etanol por microdestilação seguida de cromatografia gasosa e quantidade de açúcares redutores totais pelo método DNS modificado.

ANÁLISE DE AMOSTRAS

4.1.3. Retirada de amostras

Retirou-se as amostras de maneira asséptica com auxílio de um bico de bunsen próximo ao ponto de retirada de amostras do reator para manter uma zona de esterilidade. Logo após a retirada das alíquotas de amostra do reator, estas foram levadas a um banho de gelo por duração de no mínimo 3 minutos, com a finalidade de inativar a “reação” de fermentação devido à queda de temperatura, que desfavorece o metabolismo das leveduras. Dessa maneira cessando o consumo de substrato. Passados os 3 minutos, as amostras foram levadas à centrífuga para separar as células do meio.

- Procedimento de utilização da centrífuga:

As amostras foram separadas em um tubo falcon com outro tubo como contrapeso, para evitar o desbalanceamento no eixo da centrífuga. Ao colocar os tubos, sempre tentar colocá-los em arranjo espelhado. Em seguida colocar os tubos na bandeja da centrífuga, fechar a tampa e liga-la com o temporizador em 5 minutos e 5000 rpm. Após a centrifugação, separar o sobrenadante em um recipiente/frasco estéril e congelar ambos sobrenadante e células para análise em posterior.

4.1.4. Concentração de células por espectrofotometria (OLIVO, 1985)

Após a centrifugação, verifica-se que o sedimentado da centrifugação (células de levedura) está com coloração escura devido à presença do mel. Procedia-se a lavagem do sedimentado por 2 a 3 lavagens com água destilada, sendo cada lavagem feita da seguinte maneira: adiciona-se água destilada até completar um volume de aproximadamente 10 mL, em seguida se ressuspendia a amostra, utilizando um agitador do tipo vortex, que novamente era levada à centrífuga por 5 minutos. Descartando-se o sobrenadante a cada vez com objetivo de limpar as leveduras para obter uma melhor leitura no espectrofotômetro.

Para proceder com a leitura no espectrofotômetro preparava-se uma diluição das amostras com objetivo de baixar a concentração de células para a faixa de 0,1 a 1 g/L, na qual foi feita uma curva padrão para células que fornece a concentração de células de *S. cerevisiae* a 610 nm em função da absorbância detectada.

4.1.5. Leitura de pH

As amostras foram lidas no pHmetro disponível no laboratório do DEQ logo após a retirada das amostras, em seguida foram levadas ao refrigerador/congelador para análise posterior de concentração de células, concentração de substrato residual, concentração de etanol.

Antes de realizar a leitura, recomendava-se ligar o equipamento algumas horas antes de utilizá-lo e realizar o procedimento de calibração. Para realizar a leitura, colocava-se uma alíquota da amostra suficiente para mergulhar completamente a ponta do eletrodo de pH.

4.1.6. Concentração de etanol por cromatografia em fase gasosa

Do sobrenadante da centrifugação retirava-se uma alíquota de 10 mL e realizava-se a destilação desta amostra de acordo com o procedimento descrito no apêndice (B.2) de como utilizar o microdestilador. Ao utilizar 10 mL, coletava-se este mesmo volume em uma proveta, na saída do condensador do microdestilador. Em seguida guardava-se a amostra de destilado sob refrigeração para posteriormente analisar no cromatógrafo a gás.

Realizava-se o procedimento de leitura no cromatógrafo das amostras com gás hélio como fase móvel, com o procedimento de acordo ao descrito no apêndice (B.3) para operação do cromatógrafo, utilizando um tempo de residência de 3 minutos, 100°C para temperatura do injetor, 120°C na coluna, 150°C no detector e 200°C no filamento. Retirando as amostras do congelador aos poucos para tentar reduzir possíveis perdas por evaporação no caso de existir um número muito elevado de amostras.

4.1.7. Concentração de açúcares redutores pelo método DNS modificado (ZANIN & MORAES, 1987)

Foi utilizado o método DNS para determinação de açúcares redutores (monossacarídeos e dissacarídeos), foi proposto por Sumner (1921), que consiste na redução do ácido 3,5 dinitrosalicílico em ácido 3-amino-5-nitrosalicílico ao mesmo tempo em que o grupo aldeído dos açúcares redutores é oxidado a um grupo carboxílico, ocorrendo coloração avermelhada intensa, lida em espectrofotometria em 540 nm.

O procedimento utilizado nessa pesquisa baseia-se em modificações: no preparo do reagente e no comprimento de onda para realização da leitura no

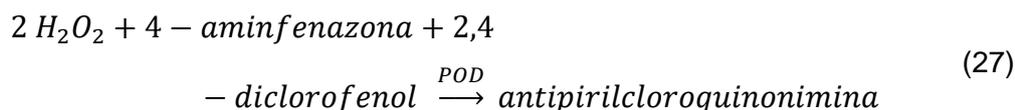
espectrofotômetro de 540 nm para 600 nm propostas pelo laboratório Lawrence Berkeley (Universidade da Califórnia) e também com a modificação proposta por Zanin & Moraes (1987) que consiste na diluição da amostra após o desenvolvimento da cor para depois prosseguir-se com a leitura.

Do sobrenadante da centrifugação, tem-se que preparar uma diluição para cada amostra, com objetivo de reduzir a concentração de açúcares redutores presente para chegar a concentrações na faixa de 0 g/L a 1 g/L de açúcares redutores, visto que o equipamento foi calibrado com uma curva padrão em faixa de concentração de açúcares redutores adequadas ao método.

Após o preparo da diluição, levava-se a um banho de água fervente por 10 minutos em um tubo de ensaio com rolha perfurada para inativar as reações que pudessem ocorrer. Em seguida as amostras eram resfriadas e adicionava-se 2,5 mL de DNS e 3 mL de água destilada. Agitou-se as amostras em agitador do tipo vortex e levou-as ao fogo novamente por 10 minutos para que a reação do DNS com os açúcares redutores acontecesse, formando um composto corante, de forma que quanto maior a concentração de ART, mais escurecido se tornava a amostra. Após as etapas de preparo para a leitura, procedia-se a leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm.

4.1.8. Concentração de glicose método GOD-PAP

O método colorimétrico para medição da concentração de glicose neste trabalho foi feito utilizando o reagente enzimático colorimétrico Laborclin Bioliquid® (GOD-PAP) lote: 70914053, cujo princípio de funcionamento do reagente é tal como descrito nas Equações 25 e 26, sendo a quantidade de substância corante formada proporcional à concentração de glicose na amostra:



As amostras para esta análise são preparadas diluindo-as para que a concentração de glicose esteja entre 0,1 g/L e 0,6 g/L. Em seguida transferir 0,1 mL de amostra (em duplicata) para um tubo de ensaio e adicionar exatamente 2 mL do

reagente GOD-PAP e agitar. Após agitação as amostras devem ser levadas a um banho termostático agitado na temperatura de 37°C por 15 a 20 minutos. Após as amostras serem retiradas do banho, adiciona-se 3 mL de água destilada em cada tudo de ensaio e agita-se novamente. Em seguida são realizadas as leituras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 525 nm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios experimentais deste trabalho ocorreram em 3 fases de experimentos tais como descritas a seguir:

- 5.1: Ensaios de **clarificação** para determinar as melhores condições de clarificação com os polímeros disponibilizados.
- 5.2: Ensaios de **cultivo descontínuo** realizados em “shaker” para verificar se a clarificação afeta a fermentação e, posteriormente, ensaios para o estudo do metabolismo com a obtenção de parâmetros cinéticos.
- 5.3: Ensaios de **fermentação em regime contínuo** realizados no biorreator New Brunswick™ Bioflo® III com as condições definidas na fase 2 dos experimentos.

TESTES DE CLARIFICAÇÃO

Ensaios preliminares foram necessários para encontrar as condições de clarificação do melado disponibilizado. Foram realizados de maneira exploratória seguindo inicialmente as orientações de utilização do fornecedor, esses ensaios foram preparados em tubos de centrífuga contendo 10 mL da solução açucarada e concentração de polímeros entre 0,1 a 1,0 ppm. Inicialmente não se misturou polímeros, pois havia a possibilidade de ocorrer interação entre eles, enfraquecendo inicialmente sua capacidade clarificante.

Deste modo, preparou-se uma série de ensaios utilizando quantidades diferentes de polímeros para pH do mosto sem neutralização e outra série com o pH neutralizado utilizando solução de NaOH com o objetivo de verificar o comportamento sob pH neutro.

Inicialmente não se verificou alteração nas leituras nestas concentrações, portanto, novos testes foram realizados com concentrações em uma faixa maior de concentração de polímeros (Tabela 3). Os polímeros foram testados de forma isolada para verificar seu efeito no o mel já invertido.

5.1.1. Experimentos realizados em pH 4,95

Tabela 3 - Experimentos em pH natural (4,95) do mel.

Tube	Cationic polymer (ppm)	Anionic polymer (ppm)	Absorbance at 420 nm
branco	0		0,656
1	0,5		0,596
2	5		* 0,798
3	10		0,427
4	15		* 0,764
5	25		0,307
6	30		0,433
7	35		0,617
8	40		0,356
9	50		0,523
10	100		0,364
11		0,5	0,656
12		5	0,656
13		10	0,656
14		15	0,656
15		25	0,656
16		30	0,656
17		35	0,656
18		40	0,656
19		50	0,656
20		100	0,656

* = anomalous points with value above the blank.

In the first series of tests, performed at natural pH (4,95) of the inverted honey suspension at 70 g/L, it was verified that the cationic polymer formed a precipitate (Figure 10). When observing the percentage difference in relation to the blank (Figure 9), it was verified that the greatest color removal occurred at the concentration of 25 ppm of cationic polymer, and that the addition of variable quantities of polymer did not present a linear behavior, since in different concentrations

encontram-se outros valores de máximos e mínimos. Também comparando os valores em relação ao branco (Tabela 3), verificou-se que os valores das amostras dos tubos 2 e 4 estavam com valores acima do branco, assim posteriormente foi realizado um novo teste destas condições.

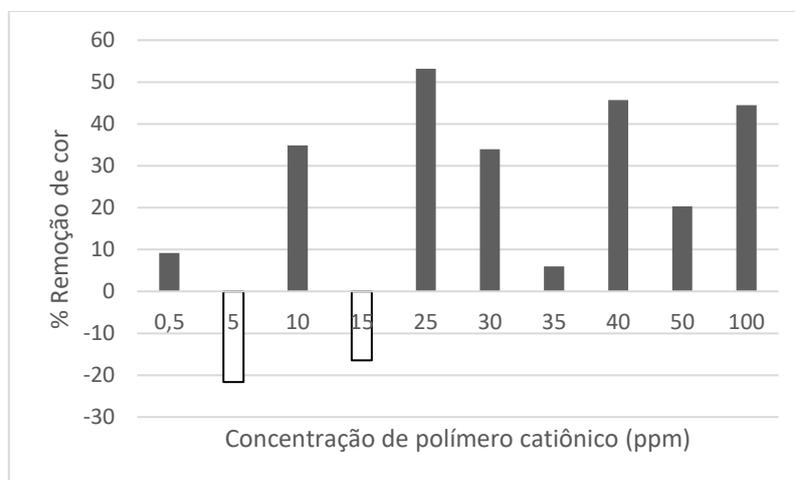


Figura 9 - Redução percentual (pH 4,95) de coloração em relação ao branco para 420 nm em espectrofotometria para o polímero catiônico AGP-1009.



Figura 10 - Amostras com polímero catiônico AGP-1009 após centrifugação em pH 4,95, tubos 1 ao 10 + branco.

Verificou-se que não houve uma alteração substancial com uma posterior adição de polímero aniônico, pois todos os tubos contendo diferentes concentrações de polímeros obtiveram características visuais semelhantes (Figura 11) e leituras iguais em espectrofotômetro (Tabela 2). Assim, foi possível afirmar

que o polímero aniônico disponibilizado foi incapaz de gerar flocos no meio em pH 4,95.

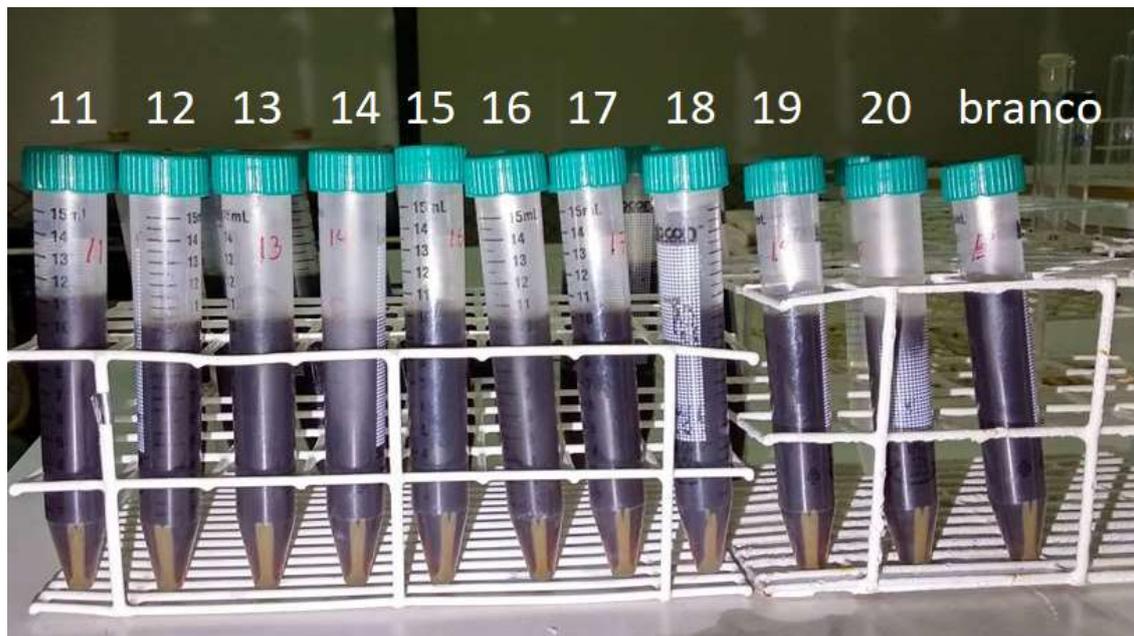


Figura 11 - Amostras com polímero aniônico AGP-1000 após centrifugação em pH 4,95, tubos 11 ao 20 + branco.

5.1.2. Repetição dos ensaios em pH 4,95 para polímero catiônico

Como foram observados que os valores dos tubos 2 e 4 na Tabela 3 apresentaram aumento na absorbância em relação ao branco, foram refeitos os ensaios para apenas o polímero catiônico (Tabela 4), pois o polímero aniônico não apresentou atividade aparente (Figura 11). Com os novos testes, observou-se uma média de redução de cor na ordem de 17% (Figura 12). Pode-se observar também que os maiores valores de remoção de cor foram para 25 e 40 ppm na primeira sequência e em um segundo teste nas concentrações de 25, 40 e 50 ppm. Com remoção de 22,38%, 23,85% e 21,75% respectivamente.

Tabela 4 - Repetição dos ensaios em pH 4,95 para polímeros catiônicos.

Tubo	Polímero catiônico (ppm)	Absorbância 420 nm
branco	0	0,478
1	0,5	0,414
2	5	0,424
3	10	0,398
4	15	0,422
5	25	0,371
6	30	0,378
7	35	0,400
8	40	0,364
9	50	0,374
10	100	0,388

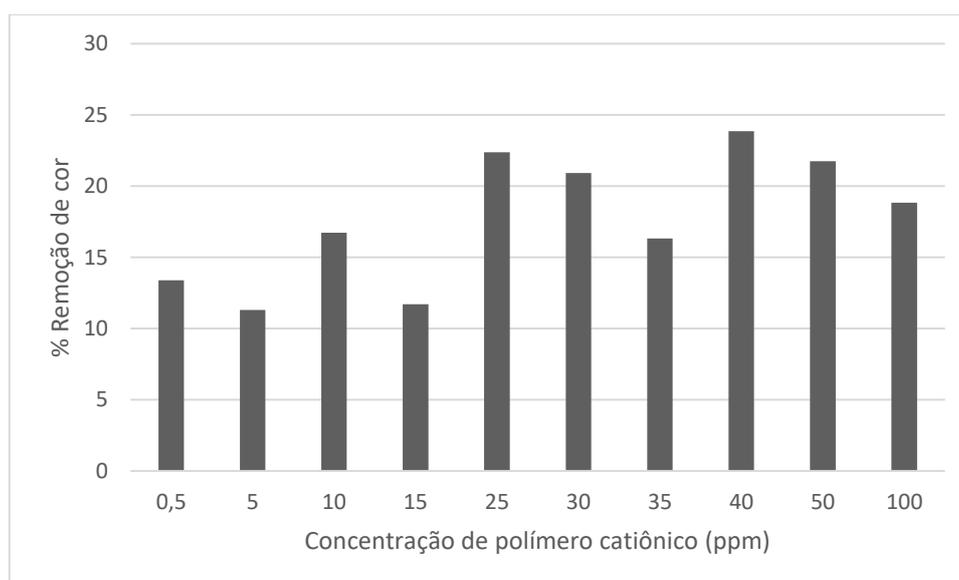


Figura 12 - Redução percentual (pH 4,95) de coloração em relação ao branco para 420nm em espectrofotometria com polímero catiônico.

5.1.3. Testes dos polímeros em pH neutro

A segunda série de ensaios dos polímeros foi realizada em pH 7, neutralizado com solução de NaOH a 1 N antes da adição dos polímeros, para verificar se a alteração no pH poderia melhorar a atividade floculante dos polímeros, os testes foram realizados nas mesmas concentrações da série anterior. Com os resultados e as concentrações destacados na Tabela 5.

Tabela 5 - Ensaio em pH 7 do mel.

Tubo	Polímero catiônico (ppm)	Polímero aniônico (ppm)	Absorbância 420 nm
branco	0		0,376
1	0,5		0,339
2	5		0,354
3	10		0,354
4	15		0,348
5	25		0,338
6	30		0,348
7	35		0,344
8	40		0,336
9	50		0,336
10	100		0,315
11		0,5	0,349
12		5	0,351
13		10	0,353
14		15	0,347
15		25	0,344
16		30	0,344
17		35	0,344
18		40	0,339
19		50	0,330
20		100	0,339

Observou-se que ambos os polímeros formaram precipitados (Figuras 15 e 16) sugerindo que ambos tiveram efeitos de formação de flocos em pH neutro. A partir dos resultados obtidos para remoção de cor nos ensaios realizados em pH 7, verificou-se que o polímero catiônico obteve eficiência de remoção de cor em média de 9% (figura 13), sendo os melhores valores obtidos nos tubos 1 (0,5 ppm), 5 (25 ppm), 8 (40 ppm), 9 (50 ppm) e 10 (100 ppm). Para o polímero aniônico (Figura 14) houve uma distribuição mais uniforme na remoção de cor, com média de 8,5% e máximo em 40 ppm com 10% de remoção de cor.

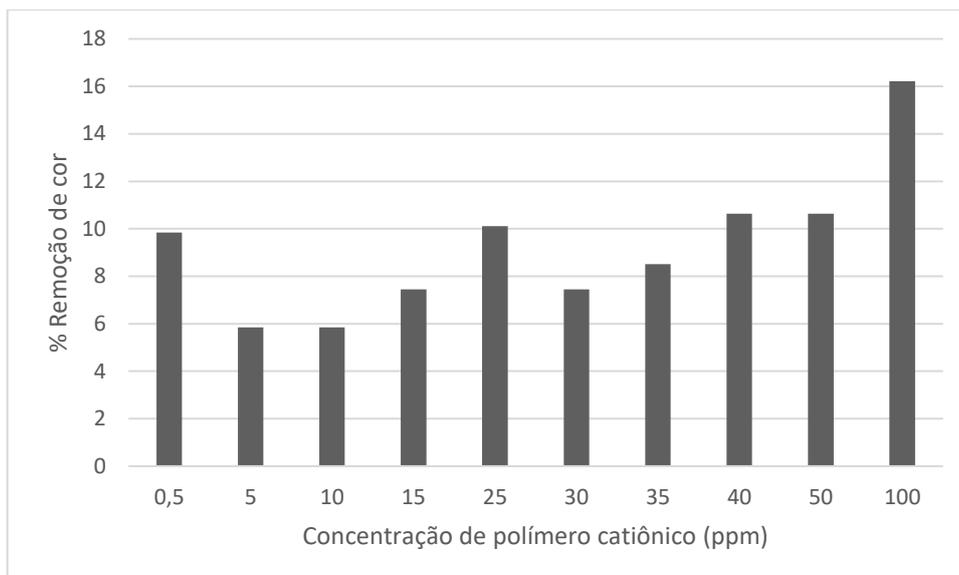


Figura 13 - Redução percentual (pH 7) de coloração em relação ao branco para 420nm em espectrofotometria com polímero catiônico.

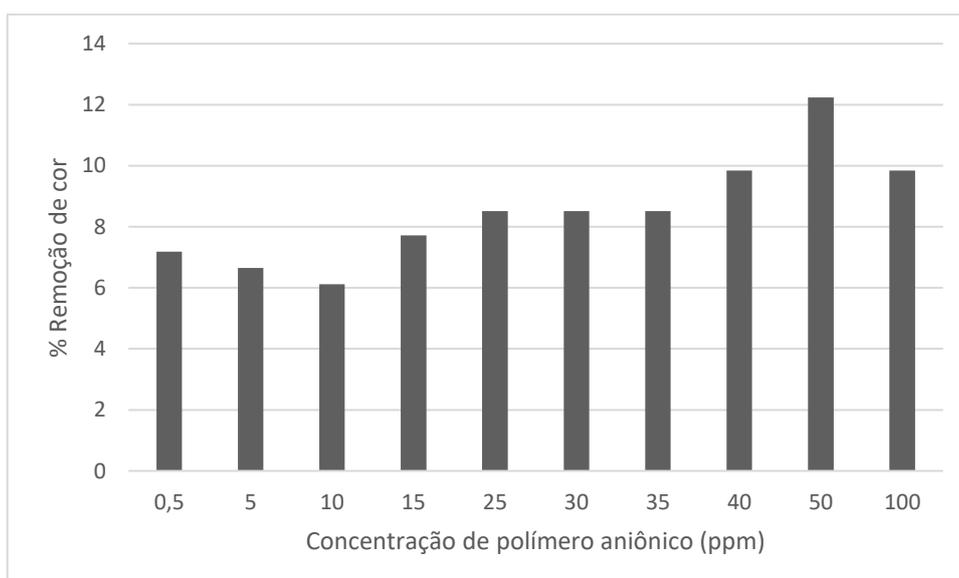


Figura 14 - Redução percentual (pH 7) de coloração em relação ao branco para 420nm em espectrofotometria com polímero aniônico.

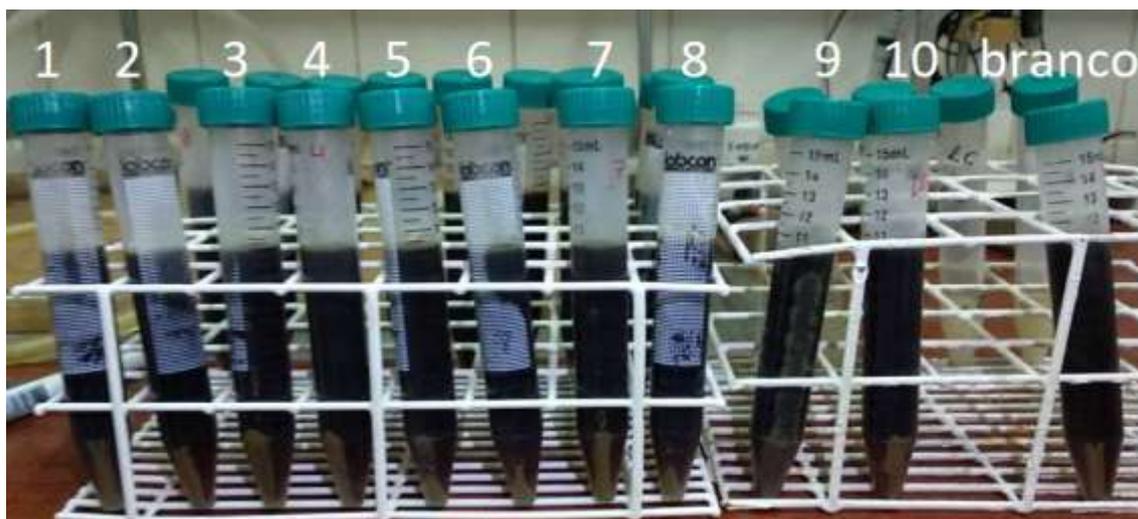


Figura 15 - Amostras com polímero catiônico AGP-1009 após centrifugação em pH 7, tubos 1 ao 10 + branco.

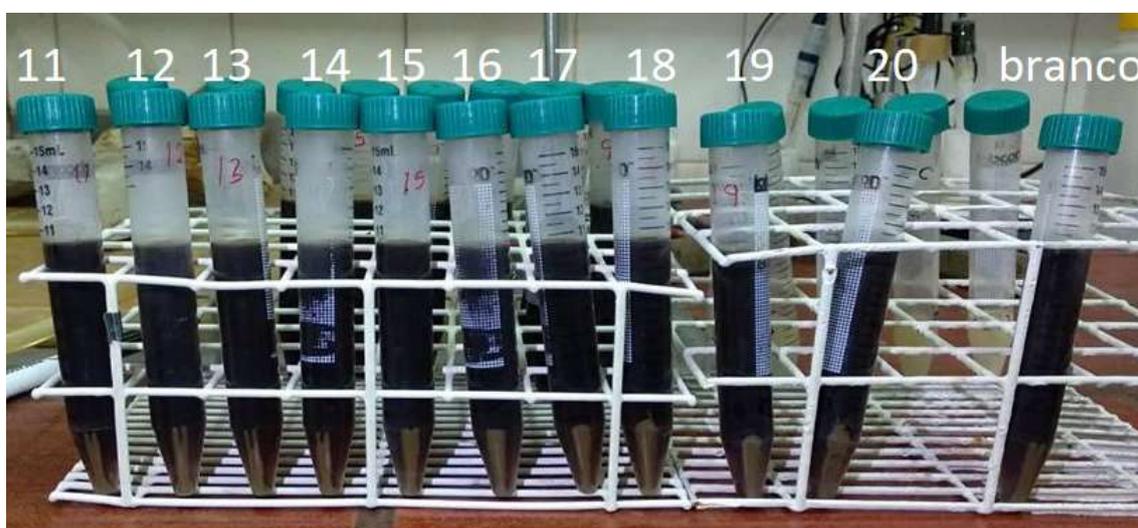


Figura 16 - Amostras com polímero aniônico AGP-1000 após centrifugação em pH 7, tubos 11 ao 20 + branco.

5.1.4. Ensaio em pH 7 com adição cruzada de polímeros em tubos selecionados da segunda série.

Como houve ação de redução na medida de absorbância para os dois polímeros separadamente, foram realizados novos testes a partir dos melhores valores obtidos anteriormente para verificar se ocorreria melhora na clarificação ao se utilizar ambos polímeros.

Para isto, nesse ensaio foram utilizados os dados da Tabela 6. Assim, com adição de 25 ppm de polímero catiônico, que foi o melhor resultado obtido este polímero isoladamente, nos valores das amostras de 11 a 19, os quais continham

apenas polímero aniônico. De modo a verificar se a ação combinada dos polímeros era melhor.

Adicionando-se 5 ppm de polímero aniônico para os valores de concentração nos tubos 5, 8, 9 e 10 e adição de 25 ppm de polímero catiônico para os valores do 11 ao 19. No tubo 18 foi adicionado invés de polímero catiônico, uma pequena quantidade de cascas de crustáceos moídas para observar se seria possível utilizar este material para clarificação, adsorvendo compostos coloridos. Porém neste não se observou efeito de melhora na cor em relação ao valor medido anteriormente.

Tabela 6 - Ensaios em pH 7 com adição posterior de polímeros de forma cruzada.

Tubo	Polímero		Absorbância ¹	Absorbância ²
	catiônico (ppm)	aniônico (ppm)	420 nm	420 nm
branco			0,376	0,379
5	25	5	0,338	0,314
8	40	5	0,336	0,311
9	50	5	0,336	0,297
10	100	5	0,315	0,293
11	25	0,5	0,349	0,324
12	25	5	0,351	0,320
13	25	10	0,353	0,330
14	25	15	0,347	0,286
15	25	25	0,344	0,291
16	25	30	0,344	0,287
17	25	35	0,344	0,298
18		40	0,339	0,339
19	25	50	0,330	0,305

¹ = absorbância antes de adição de novos polímeros; ² = absorbância após adição de mais polímeros.

Com os resultados (Figura 17), observou-se que a adição cruzada de polímeros resultou em um aumento de 7,95% de remoção da cor para os tubos que inicialmente continham apenas polímero catiônico (5, 8, 9 e 10). E um aumento médio de 11,31% de remoção de cor para os tubos que continham apenas polímero aniônico. Os melhores resultados para a combinação de polímeros foram bastante próximos (entre 18 e 24%) nos tubos 9, 10, 14, 15, 16, 17. Porém não houve uma

melhora significativa comparado à utilização de polímeros catiônicos sem neutralização do pH, onde foi possível chegar a 22,38% com 25 ppm e 23,85% 40 ppm de polímeros catiônicos.

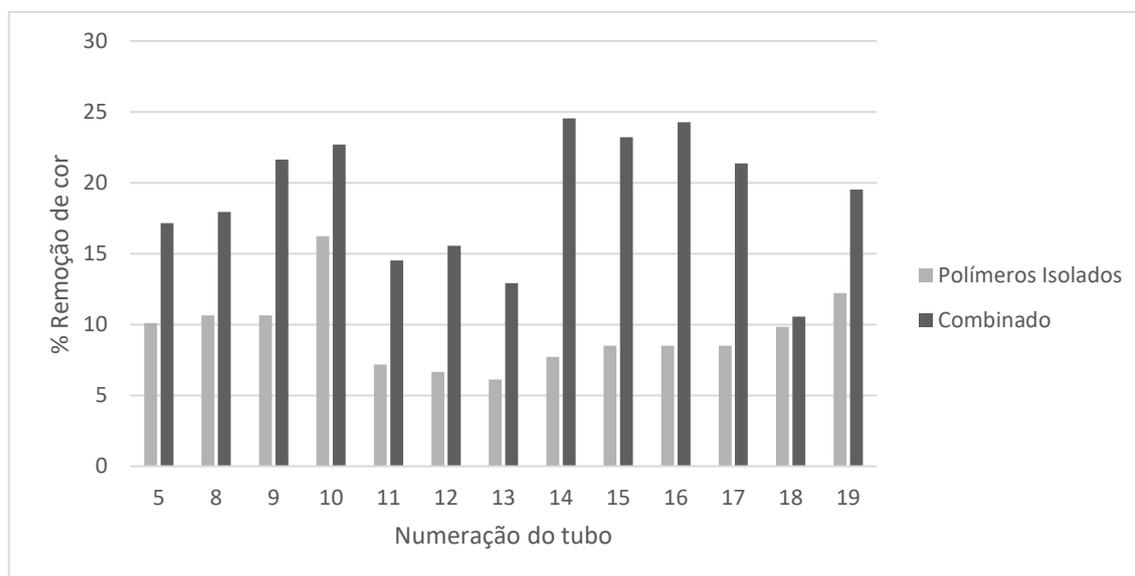


Figura 17 - Redução percentual (pH 7) de coloração em relação ao branco para 420nm em espectrofotometria com polímero aniônico e catiônico combinados.

Para os ensaios fermentativos subsequentes nessa pesquisa, foram utilizados 25 ppm de polímero catiônico na etapa de clarificação, pois a mudança para 40 ppm não apresentou alterações significativas, pois com concentração de polímeros 60% superior obteve-se apenas um aumento de 1,5% na remoção de cor do mel. Desse modo, não foi interessante a utilização de uma quantidade maior de polímeros pois também haveria a possibilidade do polímero continuar em solução e precipitar os nutrientes que serão adicionados no meio para fermentação.

FERMENTAÇÕES EM REGIME DESCONTÍNUO

Foram realizadas duas etapas de fermentações em regime batelada, uma primeira que consistiu em realizar a fermentação em regime batelada para avaliar se a clarificação poderia ter afetado o rendimento final fermentativo de alguma maneira, coletando-se apenas amostras nos pontos iniciais e finais.

Uma segunda etapa de experimentos em regime batelada foi executada com a finalidade de obtenção de dados de velocidade específica de consumo de substrato e produção de células e do produto de interesse (etanol). Para isto, a combinação de polímeros que se sobressaiu nos resultados dos testes de clarificação foi definida para o preparo dos meios clarificados. Sendo realizadas fermentações com

concentração inicial de substratos a 50, 100, 150 e 200 g/L. Os diferentes ensaios forneceram dados sobre as velocidades de produção de etanol e de células em função das diferentes concentrações iniciais de substrato limitante, a fonte de carbono. Com isso, pode-se escolher, com base nos dados destas fermentações, a concentração a ser mantida durante os ensaios fermentativos em regime contínuo. A temperatura definida para os ensaios fermentativos foi de 32°C e o pH ficou livre para alteração durante o percurso de cada experimento.

5.1.5. Ensaios exploratório de polímeros em fermentação descontínua

Para averiguar se o processo de clarificação utilizando os polímeros AGP-1009 (catiônico) e AGP-1000 (aniônico), disponibilizados pela GC Química, afetavam o rendimento fermentativo de maneira negativa foram realizados ensaios em regime batelada, utilizando a incubadora refrigerada com agitação Tecnal TE-422. Foram realizadas três séries de testes, respectivamente com concentração inicial de substrato de 33 g/L, 50 g/L e 70 g/L, agitação em 180 rpm.

O microrganismo utilizado foi a *Saccharomyces cerevisiae* disponível na forma de fermento biológico fresco Itaiquara® com quantidade inicial de inóculo de 50 g/L de massa úmida celular. Como reatores foram utilizados erlenmeyers de 250 mL arrolhados com uma mangueira para saída de gás carbônico proveniente da fermentação com uma das extremidades submersa em água para evitar entrada de ar, conforme mostra a Figura (8).

As quantidades de polímero a serem adicionadas nos reatores foram combinações de 25 ppm de polímero catiônico e 15 ppm de polímero aniônico (Tabelas 7,8 e 9), para experimentos com e sem neutralização de pH e com os nutrientes que foram adicionados. As concentrações iniciais de substrato foram definidas para ficarem próximas de uma região de máxima atividade das leveduras, que é de 50 g/L aproximadamente, a qual foi definida utilizando os dados de fermentações obtidos por Acorsi (2013).

Para esses ensaios o mel foi preparado em um único recipiente para garantir que todos os reatores tivessem a mesma concentração inicial de substrato. O mesmo foi feito para o microrganismo, foi preparada uma suspensão do fermento Itaiquara® com concentração de células em massa úmida de 275 g/L, desta foram utilizados 30 mL em cada reator para que todos tivessem a mesma concentração

inicial de células. Após a inoculação dos reatores iniciou-se a contagem do tempo no momento da retirada da amostra inicial.

Tabela 7 - Condições iniciais ensaio batelada a 33 g/L de substrato.

reator	S ₀ (g/L)	X ₀ úmido (g/L)	Pol. Cat. (ppm)	Pol. Ani. (ppm)	pH	Uréia (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)
1	33	50	25	0	4,95	0,4	1
1'	33	50	25	0	4,95	0,4	1
2	33	50	25	15	7,00	0,4	1
2'	33	50	25	15	7,00	0,4	1
3	33	50	0	15	7,00	0,4	1
3'	33	50	0	15	7,00	0,4	1
branco	33	50	0	0	4,95	0,4	1

Tabela 8 - Condições iniciais ensaio batelada a 50g/L de substrato.

reator	S ₀ (g/L)	X ₀ úmido (g/L)	Pol. Cat. (ppm)	Pol. Ani. (ppm)	pH	Uréia (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)
4	50	50	25	0	4,95	0,4	1
4'	50	50	25	0	4,95	0,4	1
5	50	50	25	15	7,00	0,4	1
5'	50	50	25	15	7,00	0,4	1
6	50	50	0	15	7,00	0,4	1
6'	50	50	0	15	7,00	0,4	1
branco	50	50	0	0	4,95	0,4	1

Tabela 9 - Condições iniciais ensaio batelada a 70g/L de substrato.

reator	S ₀ (g/L)	X ₀ úmido (g/L)	Pol. Cat. (ppm)	Pol. Ani. (ppm)	pH	Uréia (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)
7	70	50	25	0	4,95	0,4	1
7'	70	50	25	0	4,95	0,4	1
8	70	50	25	15	7,00	0,4	1
8'	70	50	25	15	7,00	0,4	1
9	70	50	0	15	7,00	0,4	1
9'	70	50	0	15	7,00	0,4	1
branco	70	50	0	0	4,95	0,4	1

5.1.6. Ensaios exploratório de polímeros em fermentação descontínua com $S_0 = 33$ g/L

Este primeiro ensaio fermentativo em regime batelada, foi realizado na concentração inicial de 33 g/L de substrato e 50 g/L de massa úmida celular. Verificou-se que a concentração inicial de células não foi uniforme nas leituras nos reatores (Tabela 10) apesar de terem sido inoculados com a mesma suspensão e em quantidades iguais para todos os reatores. Verificaram-se variações na concentração celular em relação aos pontos iniciais e finais dos reatores (Tabela 10), era esperado que se mantivessem constantes devido ao curto tempo de fermentação e a utilização de elevadas concentrações de fermento. O que sinaliza que ocorreram problemas ao realizar a leitura de células que foram corrigidos em ensaios posteriores.

Quanto ao substrato, percebeu-se que todos os reatores não estavam com a quantidade inicial estipulada, apresentaram em média 20% de desvio para menos em todos os ensaios, menos para o ensaio em branco (ensaio sem adição de polímeros realizado posteriormente). E nas amostras finais para ART detectou-se uma média de açúcares residuais de 23,05%, 10,2% e 18,94% dos açúcares iniciais, respectivamente, nos ensaios dos reatores 1, 2 e 3 e com as suas respectivas duplicatas. Comparando-se estes resultados dos reatores 1, 2 e 3 com o ensaio em branco, que em sua amostra final de ART estava com 30,79% dos açúcares iniciais, indicou a possibilidade dos ensaios terem sofrido inibição devido à presença de compostos tóxicos ao microrganismo dentre aqueles que são removidos no processo de clarificação (BOUALLAGUI *et al.*, 2013; YAMAKAWA *et al.*, 2017). A utilização de polímeros no meio afetou os efeitos de inibição de produção alcoólica e consumo de substrato em diferentes proporções (Tabela 10), com os reatores 2 e 2' apresentando melhor resultado de consumo dos açúcares no mesmo tempo. Os açúcares remanescentes ao final da fermentação eram compostos na maior parte de frutose, pois as leituras de glicose realizadas pelo método GOD-PAP sem diluição (1:1), resultaram em valores próximos de zero para todas as amostras finais.

Em relação ao rendimento do produto desejado (etanol) os dados obtidos para $Y_{P/S}$ mostraram o valor de 0,253 $g_{\text{produto}}/g_{\text{substrato}}$ no ensaio em branco, nos reatores utilizando somente o polímero catiônico a média foi de 0,391 $g_{\text{produto}}/g_{\text{substrato}}$ nos reatores 1 e 1'. Para a combinação dos dois polímeros e mosto

com pH inicial neutro, obteve-se os valores de $Y_{P/S}$ dos reatores 2 e 2' a média de 0,419 $g_{\text{produto}}/g_{\text{substrato}}$. E no uso de apenas o polímero aniônico (reatores 3 e 3'), também com meio de pH inicial neutro, a média de $Y_{P/S}$ foi igual a 0,474 $g_{\text{produto}}/g_{\text{substrato}}$. Deste modo os resultados obtidos com substrato inicial de 33 g/L de açúcares mostraram que a utilização de polímeros como agente clarificante fez com que aumentasse o rendimento de etanol obtido por unidade de substrato consumida, sendo que os reatores com polímero aniônico neste caso foi 21% superior ao uso de polímero catiônico e 13% superior ao uso dos polímeros em combinação.

Tabela 10 - Resultados de massa celular, ART, glicose e etanol para concentração inicial de 33 g/L ART.

Reator	amostra	X (g/L)	ART (g/L)	Glicose (g/L)	P (g/L)	$Y_{P/S}$	$Y_{P/S}$ teorico	$Y_{P/X}$	$Y_{P/X}$ teorico																																																																																					
1	0	43,44	26,97	12,82	0,29	0,382	0,310	0,333	0,199																																																																																					
	final	29,89	0,92	0,10	10,23					1'	0	46,01	26,38	13,95	0,27	0,400	0,306	0,234	0,173	final	36,90	4,79	0,50	8,90	2	0	51,15	27,07	13,07	1,43	0,388	0,317	0,168	0,204	final	60,50	0,84	0,09	11,61	2'	0	42,50	25,53	13,22	0,35	0,449	0,346	0,178	0,225	final	63,30	0,49	0,10	11,59	3	0	29,18	28,10	13,53	0,20	0,443	0,372	0,230	0,228	final	49,51	2,41	0,17	11,59	3'	0	52,79	25,39	12,97	0,15	0,505	0,382	0,234	0,240	final	51,38	1,59	0,11	12,16	branco	0	72,60	36,75		0,00	0,253	0,297	0,108	0,129
1'	0	46,01	26,38	13,95	0,27	0,400	0,306	0,234	0,173																																																																																					
	final	36,90	4,79	0,50	8,90					2	0	51,15	27,07	13,07	1,43	0,388	0,317	0,168	0,204	final	60,50	0,84	0,09	11,61	2'	0	42,50	25,53	13,22	0,35	0,449	0,346	0,178	0,225	final	63,30	0,49	0,10	11,59	3	0	29,18	28,10	13,53	0,20	0,443	0,372	0,230	0,228	final	49,51	2,41	0,17	11,59	3'	0	52,79	25,39	12,97	0,15	0,505	0,382	0,234	0,240	final	51,38	1,59	0,11	12,16	branco	0	72,60	36,75		0,00	0,253	0,297	0,108	0,129	final	59,45	11,32		6,44										
2	0	51,15	27,07	13,07	1,43	0,388	0,317	0,168	0,204																																																																																					
	final	60,50	0,84	0,09	11,61					2'	0	42,50	25,53	13,22	0,35	0,449	0,346	0,178	0,225	final	63,30	0,49	0,10	11,59	3	0	29,18	28,10	13,53	0,20	0,443	0,372	0,230	0,228	final	49,51	2,41	0,17	11,59	3'	0	52,79	25,39	12,97	0,15	0,505	0,382	0,234	0,240	final	51,38	1,59	0,11	12,16	branco	0	72,60	36,75		0,00	0,253	0,297	0,108	0,129	final	59,45	11,32		6,44																									
2'	0	42,50	25,53	13,22	0,35	0,449	0,346	0,178	0,225																																																																																					
	final	63,30	0,49	0,10	11,59					3	0	29,18	28,10	13,53	0,20	0,443	0,372	0,230	0,228	final	49,51	2,41	0,17	11,59	3'	0	52,79	25,39	12,97	0,15	0,505	0,382	0,234	0,240	final	51,38	1,59	0,11	12,16	branco	0	72,60	36,75		0,00	0,253	0,297	0,108	0,129	final	59,45	11,32		6,44																																								
3	0	29,18	28,10	13,53	0,20	0,443	0,372	0,230	0,228																																																																																					
	final	49,51	2,41	0,17	11,59					3'	0	52,79	25,39	12,97	0,15	0,505	0,382	0,234	0,240	final	51,38	1,59	0,11	12,16	branco	0	72,60	36,75		0,00	0,253	0,297	0,108	0,129	final	59,45	11,32		6,44																																																							
3'	0	52,79	25,39	12,97	0,15	0,505	0,382	0,234	0,240																																																																																					
	final	51,38	1,59	0,11	12,16					branco	0	72,60	36,75		0,00	0,253	0,297	0,108	0,129	final	59,45	11,32		6,44																																																																						
branco	0	72,60	36,75		0,00	0,253	0,297	0,108	0,129																																																																																					
	final	59,45	11,32		6,44																																																																																									

5.1.7. Ensaios exploratórios de polímeros em fermentação descontínua com $S_0 = 50$ g/L

Nestes ensaios foram utilizadas as condições elencadas no início desta seção (Tabela 8) com concentração inicial de 50 g/L de substrato. Dos resultados obtidos (Tabela 11), tem-se que a concentração celular inicial e final para os reatores foi mais próximo do esperado, quase sem crescimento celular ou com pouco crescimento.

As concentrações iniciais de açúcares redutores totais (Tabela 11) estavam de acordo com o esperado e observou-se que a glicose representa em média 29% destes açúcares iniciais para este ensaio, comparando-se com o ensaio anterior que resultou em quase 50% na proporção de glicose para açúcares totais, obteve-se um valor mais próximo do esperado, que seria em torno de 40 a 45%. Esta quantidade de glicose no melão estava de acordo com o detectado por Acorsi (2013) e Silva (2016). Ao término deste ensaio, os açúcares residuais apresentaram a proporção de 20,05%, 17,64% e 21,67% para os reatores 4, 5 e 6 respectivamente, considerando a média com os valores obtidos por suas duplicatas. No ensaio em branco o residual de açúcares redutores totais foi de 35,78% do que havia presente no início da fermentação. Notou-se que os açúcares não foram totalmente consumidos e que na amostra final, os resultados para glicose foram menores do que 0,50 g/L (diluição 1:1), o que sugeriu que os açúcares remanescentes ao final da fermentação eram majoritariamente constituídos de frutose.

Considerando a quantidade de açúcares consumidos em relação à quantidade de etanol obtido, obteve-se um valor médio de $Y_{P/S}$ para os reatores 4 e 4' de 0,445 $g_{\text{produto}}/g_{\text{substrato}}$. Para os reatores 5 e 5' o valor de $Y_{P/S}$ foi de 0,426 $g_{\text{produto}}/g_{\text{substrato}}$ e finalmente, para os reatores 6 e 6' o valor médio foi de 0,300 $g_{\text{produto}}/g_{\text{substrato}}$. A partir desses dados observou-se que o uso de polímeros catiônicos (reatores 4 e 4') forneceu a maior quantidade de produto desejado por unidade de substrato consumido com concentração inicial de 50 g/L de substrato. Em segundo lugar de desempenho foram os reatores com polímeros em uso combinado (6 e 6') e os que obtiveram desempenho pior foram os que utilizaram polímeros aniônicos (reatores 5 e 5'). Porém, todos mostraram resultados superiores ao branco (fermentação sem uso de polímeros) que forneceu para $Y_{P/S}$ um valor de 0,246.

Tabela 11 - Massa celular, ART, glicose e etanol para concentração inicial de 50 g/L ART.

Reator	amostra	X (g/L)	ART (g/L)	Glicose (g/L)	P (g/L)	$Y_{P/S}$	$Y_{P/S}$ teorico	$Y_{P/X}$	$Y_{P/X}$ teorico
4	0	56,54	51,29	16,48	0,88	0,420	0,431	0,316	0,402
	final	63,53	3,45	0,12	20,96				
4'	0	61,40	47,76	16,48	0,15	0,470	0,448	0,326	0,443
	final	67,92	0,66	0,13	22,27				
5	0	61,58	48,49	13,79	0,31	0,371	0,359	0,274	0,345
	final	62,97	1,99	0,11	17,56				
5'	0	59,87	51,08	13,99	0,42	0,481	0,494	0,290	0,390
	final	67,27	10,61	0,11	19,89				
6	0	67,37	56,17	14,94	0,49	0,277	0,322	0,181	0,245
	final	67,69	11,96	0,14	12,74				
6'	0	60,29	51,91	13,22	0,25	0,302	0,314	0,235	0,301
	final	64,04	2,10	0,14	15,28				
branco	0	59,22	48,17		0,00	0,246	0,234	0,124	0,176
	final	71,07	12,38		8,82				

5.1.8. Ensaios exploratórios de polímeros em fermentação descontínua com $S_0 = 70$ g/L.

A terceira sequência de ensaios em batelada foi realizada de acordo com as condições elencadas no início desta seção (Tabela 9). Nestes ensaios os resultados obtidos para concentração de massa celular (Tabela 12) no reator 7 acusaram redução na concentração, enquanto nos demais reatores e em sua duplicata, o reator 7', forneceram aumento nas concentrações de células. Era esperado que não ocorresse aumento na concentração ou que houvesse pouco aumento nesses reatores, devido à grande quantidade inicial de células utilizadas na inoculação. A amostra final do reator 9 está ausente, pois perdeu-se a amostra durante centrifugação com um tubo de centrífuga danificado, assim este ponto para células foi descartado.

Os resultados de açúcares redutores totais iniciais em comparação com a glicose forneceram a proporção de 25,24% de glicose presente neste mel. Isto pode ser um indicativo de que houve desvios nas medidas de açúcares ART pelo método DNS, provavelmente devido ao manuseio durante as diluições. Levando em

consideração que o substrato inicial para os reatores deveria ser de 70 g/L, obteve-se um desvio de 22,08% ao considerar a média para todos os reatores. Os reatores com apenas polímero catiônico neste caso foram os que tiveram mais açúcar residual ao final da fermentação, com 19,61% do que havia inicialmente. Os reatores com a mistura dos dois polímeros ficaram em segundo lugar com maior quantidade de açúcares residuais, com 15,68% e o que houve maior consumo dos açúcares foram os reatores que continham polímero aniônico, restando 11,21%.

Na obtenção do produto desejado, o etanol, as quantidades obtidas em todos os reatores, exceto o ensaio em branco, foram similares todos com resultados próximos de 20 g/L e o branco com 13,62 g/L. Deste modo, é possível afirmar que os polímeros auxiliaram de alguma maneira na obtenção de uma maior conversão dos açúcares em etanol nestes ensaios. A variável $Y_{P/S}$ nestes ensaios ficou próxima considerando-se a média dos reatores junto de suas respectivas duplicatas, seguindo com valores de 0,278 $g_{\text{produto}}/g_{\text{substrato}}$ para os reatores 7 e 7', nos reatores 8 e 8': 0,276 $g_{\text{produto}}/g_{\text{substrato}}$ e 0,304 $g_{\text{produto}}/g_{\text{substrato}}$ para os reatores 9 e 9'.

Tabela 12 - Massa celular, ART, glicose e etanol para concentração inicial de 70 g/L ART.

Reator	amostra	X (g/L)	ART (g/L)	Glicose (g/L)	P (g/L)	$Y_{P/S}$	$Y_{P/S}$ teorico	$Y_{P/X}$	$Y_{P/X}$ teorico
7	0	47,84	86,17	22,85	0,16	0,259	0,355	0,460	0,398
	final	43,17	18,79	0,21	20,03				
7'	0	52,79	92,40	24,24	0,00	0,253	0,337	0,299	0,396
	final	66,21	16,09	0,20	19,80				
8	0	55,94	89,18	22,56	0,00	0,264	0,336	0,322	0,433
	final	67,27	10,38	0,20	21,65				
8'	0	60,38	89,60	23,51	0,00	0,267	0,341	0,320	0,445
	final	69,68	9,66	0,20	22,26				
9	0	51,26	71,12	19,89	0,00	0,356	0,357	0,433	0,444
	final		12,67	0,22	22,18				
9'	0	47,10	99,57	19,10	0,00	0,222	0,322	0,290	0,396
	final	68,25	13,50	0,22	19,78				
branco	0	70,28	70,19		0,00	0,279	0,265	0,191	0,272
	final	71,21	23,36		13,62				

Como foram detectados desvios nos valores lidos de absorvância, e por consequência nos resultados, as cubetas utilizadas para leitura no espectrofotômetro foram substituídas nos próximos ensaios presentes nessa dissertação com objetivo de obter resultados mais consistentes.

Foram calculados os rendimentos teóricos $Y_{P/S}$ e $Y_{P/X}$ utilizando os valores que haviam sido planejados para o preparo de cada ensaio ($S_0 = 33; 50; 70$ g/L e $X_0 = X = 50$ g/L) nas Tabelas 10, 11 e 12.

Considerando-se os rendimentos alcançados pelas diferentes combinações de polímeros, no ensaio na concentração mais baixa (33 g/L), o polímero aniônico com mel de pH 7 inicial apresentou melhor desempenho alcoólico, considerando o rendimento de etanol por substrato, enquanto em valores finais de produto observou-se que neste caso o polímero catiônico teve em média 2 g/L a menos do que os outros dois casos estudados.

Já ao analisar o ensaio realizado com $S_0 = 50$ g/L a situação se inverteu com o polímero catiônico tendo desempenho razoavelmente superior, com 40% a mais em $Y_{P/S}$ e 35% em $Y_{P/X}$ em relação ao polímero aniônico. Comparando com a combinação dos dois, o esperado era um resultado melhor, porém o uso dos dois polímeros para 50 g/L teve desempenho 15% menor para $Y_{P/S}$ e 12% menor para $Y_{P/X}$. Ainda nos ensaios realizados nesta concentração os valores de etanol alcançados pelo polímero catiônico também foram superiores (diferença de 2,89 g/L e 7,61 g/L).

Apesar do ensaio realizado a 70 g/L apresentar algumas inconsistências em relação às medidas de substrato, ainda foi útil para análise qualitativa da ação dos polímeros sobre a fermentação alcoólica. Na sequência de resultados fornecidos pela Tabela 12, a quantidade de etanol média obtida pela ação dos polímeros foi de respectivamente 19,91 g/L, 20,98 g/L e 21,96 g/L para os polímeros catiônico, aniônico e combinados.

Os rendimentos de $Y_{P/S}$ obtidos com a utilização de polímero aniônico (reatores 9 e 9') com a concentração inicial de substrato de 70 g/L foram melhores do que para os outros polímeros devido aos resultados para açúcares redutores iniciais nestes ensaios (Tabela 12) estarem mais próximos do valor planejado de 70 g/L (Tabela 9), enquanto os outros reatores (7, 7', 8 e 8') obtiveram valores maiores na leitura inicial de substrato, isto fez com que no cálculo do rendimento $Y_{P/S}$

conduziram a valores menores devido à uma diferença maior no consumo de substrato da amostra inicial para a final.

Ao se considerar que todos os reatores estavam com a mesma concentração inicial de substrato, pois foram preparados a partir da mesma solução de mel e com a mesma metodologia e utilizadas quantidades idênticas de substrato, os reatores neste caso se comportaram similarmente. Onde a maior diferença ocorreu nos experimentos realizados com $S_0 = 70$ g/L nas leituras de ART residual, onde houve detecção de mais açúcares com o polímero catiônico (reatores 7 e 7') nas amostras finais em relação aos outros reatores (8, 8', 9 e 9').

A partir dos resultados destes ensaios determinou-se que a utilização de polímeros catiônicos sem neutralização do melaço na concentração de 25 ppm para cada 70 g/L de ART foi mais vantajosa pois considerando também o objetivo de clarificação do mel, este foi o que apresentou os melhores resultados em geral, excluindo o caso de uso combinado de polímeros. Nos ensaios fermentativos a presença do polímero catiônico mostrou-se capaz de melhorar o rendimento em relação ao ensaio em branco e obteve bons resultados nas concentrações maiores de substrato, sendo apenas menos efetivo na concentração mais baixa de substrato. A escolha do polímero catiônico como agente clarificante também traz a vantagem de dispensar a necessidade de prévia neutralização do mel, o que encareceria um processo industrial com o uso de mais insumos.

5.1.9. Fermentações em regime descontínuo para estudo de velocidades específicas

Com a definição do uso de polímeros catiônicos como agente clarificante, dispensando o uso de outras soluções para a neutralização do mel, foram realizados experimentos em diferentes concentrações iniciais de substrato (50, 100, 150 e 200 g/L), destes sendo coletados amostras em 7 pontos, de maneira a possibilitar a obtenção de curvas de velocidade de consumo de substrato, de produção de células e de etanol. O microrganismo utilizado também foi a *Saccharomyces cerevisiae* comercializada como fermento seco da marca Itaiquara®, na concentração de 1 g/L em massa seca (3 g/L massa úmida) nos reatores.

Os ensaios nesta seção foram realizados em uma incubadora rotativa com controle de temperatura, mantendo-se a temperatura em 32°C, agitação em 180

rpm e sem o controle de pH. Os reatores foram erlenmeyers de 250 mL, contendo inicialmente 150 mL de meio em cada, exceto no reator de número 1, que inicialmente foi preparado com 165 mL, pois deste foram retiradas duas amostras, cada amostra sendo 15 mL coletadas com auxílio de uma pipeta automática. Todos reatores foram arrolhados com rolhas perfuradas contendo uma saída de gás através de uma mangueira com uma das extremidades submersa em água para evitar entrada de ar e possibilitando a saída de gases produzidos durante a fermentação, conforme Figuras 12 e 13.

5.1.10. Ensaio em regime batelada com $S_0 = 50$ g/L

Ao total foram coletadas sete amostras em intervalos de tempo de 1,5 horas das quais foram feitas análises de açúcares redutores totais pelo método DNS, massa celular por espectrofotometria e etanol por cromatografia a gás (Tabela 13).

Tabela 13 - Dados do ensaio em batelada com $S_0 = 50$ g/L.

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	P (g/L)
0	3,14	49,29	0,16
1,5	3,43	47,21	0,44
3	4,50	45,52	1,24
4,5	5,10	39,67	3,58
6	7,29	32,99	7,68
7,5	10,57	19,53	11,06
9	11,68	7,38	15,22

Para obter as velocidades específicas foram traçadas linhas de tendência por meio de aplicação de um polinômio de quarto grau com os dados de forma a obter-se curvas que descrevem o comportamento das variáveis de X, S e P (Figura 18), assim pode-se utilizar estes dados para o cálculo de derivadas e obter os valores de μ_X , μ_S e μ_P .

Analisando-se os dados com as curvas da Figura 18, em relação à concentração de células em massa úmida, foi possível estimar o tempo de duplicação atingido neste ensaio, que foi de 4,5 horas durante o ensaio fermentativo, onde obteve-se cerca de 6 g da quantidade inicial às 4,5 h e 12 g às 9 h do ensaio. Em relação ao substrato a quantidade inicial estava como foi definida no planejamento deste ensaio e ao final do ensaio foi detectado um residual de açúcares redutores totais de 7,38 g. A partir das equações 7, 8 e 9, as quais fornecerem a descrição do rendimento fermentativo, observou-se ao final do ensaio

valores de $Y_{X/S}$, $Y_{P/X}$ e $Y_{P/S}$ respectivamente de $0,20 \frac{g_{célula}}{g_{substrato}}$; $1,76 \frac{g_{produto}}{g_{célula}}$ e $0,36 \frac{g_{produto}}{g_{substrato}}$.

Com as curvas de velocidades específicas apresentadas na Figura 19, observa-se que a velocidade específica de produção de células (μ_x) atingiu um máximo de $0,21 \frac{g_{células\ novas}}{g_{célula \cdot h}}$; que se manteve no intervalo entre 4,3 e 5,8 horas. Neste intervalo, o ponto que teve as maiores velocidades específicas de consumo de substrato e produção de etanol ocorreu durante as 5,8h com valores de μ_x , μ_P e μ_s de respectivamente $0,21 \frac{g_{células\ novas}}{g_{célula \cdot h}}$; $0,30 \frac{g_{produto}}{g_{célula \cdot h}}$ e $0,79 \frac{g_{substrato}}{g_{célula \cdot h}}$.

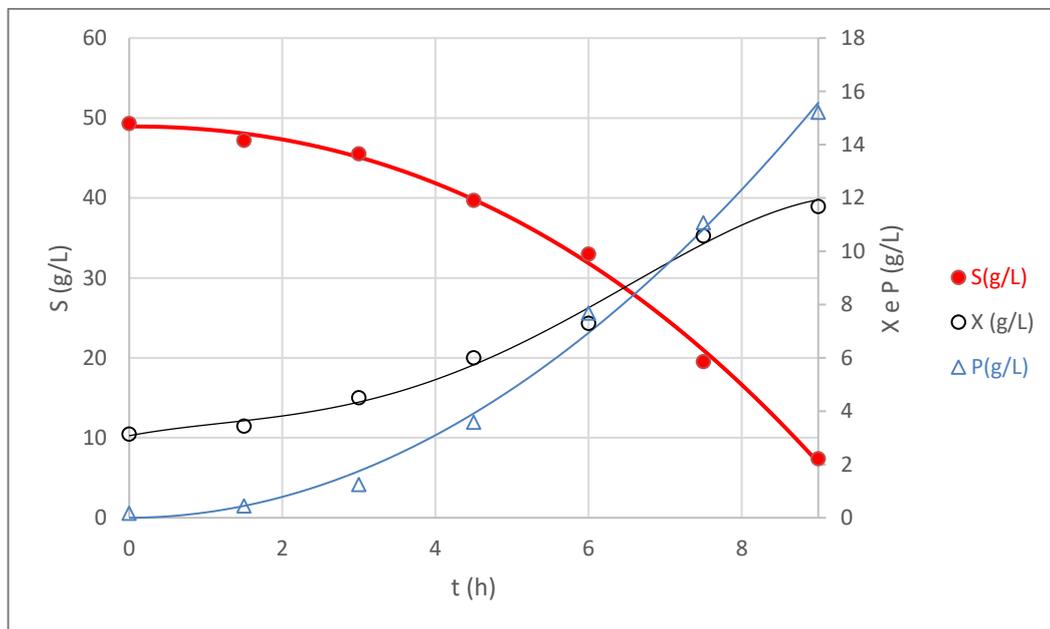


Figura 18 - Curvas ajustadas de X, S e P (g/L) em função do tempo (h) para $S_0 = 50$ g/L.

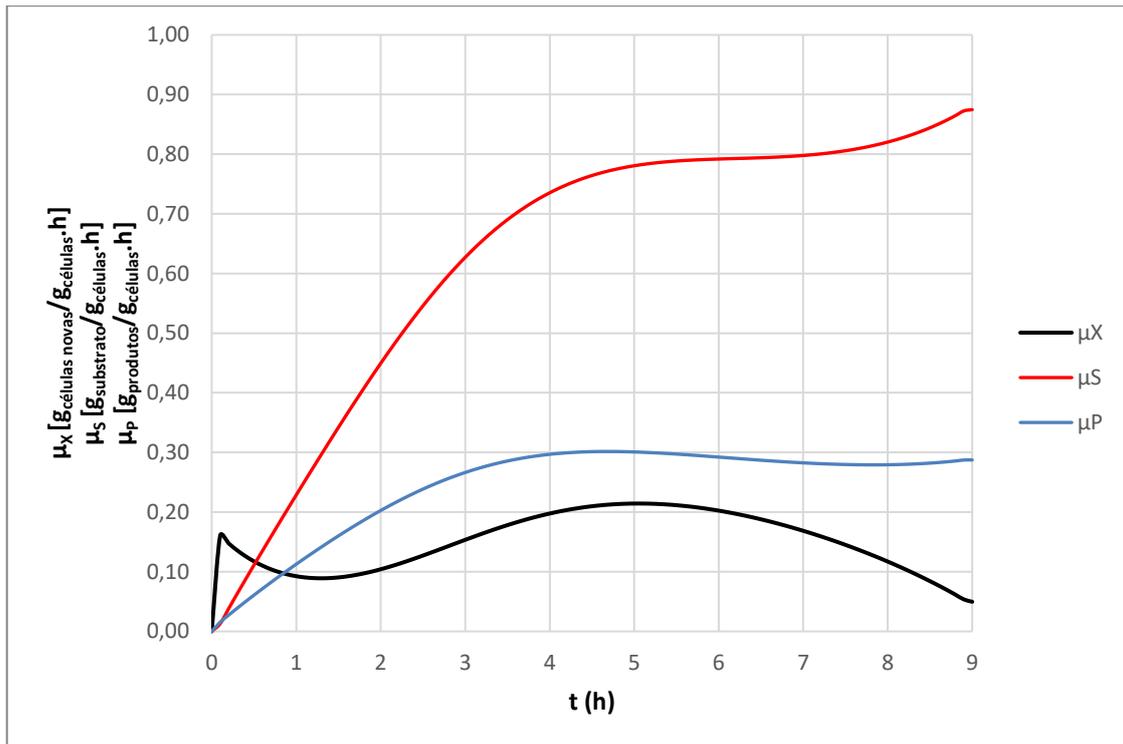


Figura 19 - Gráfico de $\mu_X [g_{células\ novas}/g_{células}\cdot h]$, $\mu_S [g_{substrato}/g_{células}\cdot h]$ e $\mu_P [g_{produtos}/g_{células}\cdot h]$ para $S_0 = 50$ g/L.

5.1.11. Ensaio em regime batelada com $S_0 = 100$ g/L

As amostras para este ensaio foram coletadas em intervalos de duas em duas horas, das quais foram feitas análises de açúcares redutores totais pelo método DNS, massa celular por espectrofotometria e etanol por cromatografia gasosa. Os dados obtidos estão destacados na Tabela 14. Este ensaio fora planejado para que o substrato inicial fosse de 100 g/L, porém por problemas na diluição, apresentou valores iniciais de 125 g/L, o que se confirmou ao repetir a análise de açúcares. Em função da falta de tempo para o cronograma dos experimentos não foi possível repetir este ensaio antes do início das fermentações contínuas.

Tabela 14 - Dados do ensaio em batelada com $S_0 = 100$ g/L

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	P (g/L)
0	2,91	125,49	0,53
2	3,71	125,89	0,94
4	4,27	110,85	2,35
6	6,26	105,25	4,74
8	9,82	84,11	11,86
10	15,72	61,87	20,68
12	18,07	36,81	28,02

Para obtenção de velocidades específicas foram traçadas linhas de tendência para substrato, concentração celular e concentração de etanol com polinômios de quarto grau (Figura 20). Deste modo pode-se trabalhar com estes dados para o cálculo de derivadas e assim obter os valores de μ_X , μ_S e μ_P .

Neste ensaio o tempo necessário para a duplicação de células foi de 5 h para atingir o dobro da concentração, e posteriormente nova duplicação ocorrendo às 11 h de duração do ensaio. Ao final do ensaio foi detectado um residual de açúcares redutores totais de 36,81 g/L após 12 h de ensaio. Os rendimentos foram calculados com as equações 7, 8 e 9, deste modo, $Y_{X/S} = 0,17 \frac{g_{célula}}{g_{substrato}}$, $Y_{P/X} = 1,82 \frac{g_{produto}}{g_{célula}}$ e $Y_{P/S} = 0,31 \frac{g_{produto}}{g_{substrato}}$.

Levando em consideração a concentração da massa celular em cada momento, tem-se as velocidades específicas para células, substrato e produtos, as quais, foram calculadas a partir das equações 3, 4 e 5, apresentadas na Figura 21. Observa-se que neste ensaio a velocidade específica de produção de células (μ_X) atingiu seu valor máximo de 0,20 as 4,4 h e mantendo-se assim até 5,8 h. Após este tempo, decresceu lentamente até o final do ensaio. Neste período no qual a velocidade específica de células foi máxima, o tempo com os maiores valores de μ_X , μ_P e μ_S foi as 5,7 h com respectivamente $0,20 \frac{g_{células\ novas}}{g_{célula \cdot h}}$; $0,31 \frac{g_{produto}}{g_{célula \cdot h}}$ e $1,10 \frac{g_{substrato}}{g_{célula \cdot h}}$.

A velocidade específica de consumo de substrato (μ_S) apresentou comportamento similar ao da curva de μ_X até o máximo valor desta. Após isto, observou-se uma queda menos acentuada de μ_S do que para μ_X , indicando que os açúcares estavam em maior intensidade para formação de produtos do que para crescimento celular.

Em relação ao produto desejado (etanol), a velocidade específica de produção continuou aumentando após o valor máximo de μ_X , atingindo valor máximo próximo das 8 h de ensaio. Após isto diminuiu lentamente até o final do ensaio. Inicialmente vê-se uma pequena variação em μ_P , isto pode ter ocorrido pois se mediu uma determinada concentração de etanol no momento zero do ensaio, a qual pode ser justificada por contaminação na seringa de injeção, o que ocasionou

algum problema no ajuste. Pois inicialmente, no meio só deveria haver água, açúcares, nutrientes e células de *Saccharomyces cerevisiae* (figura 21).

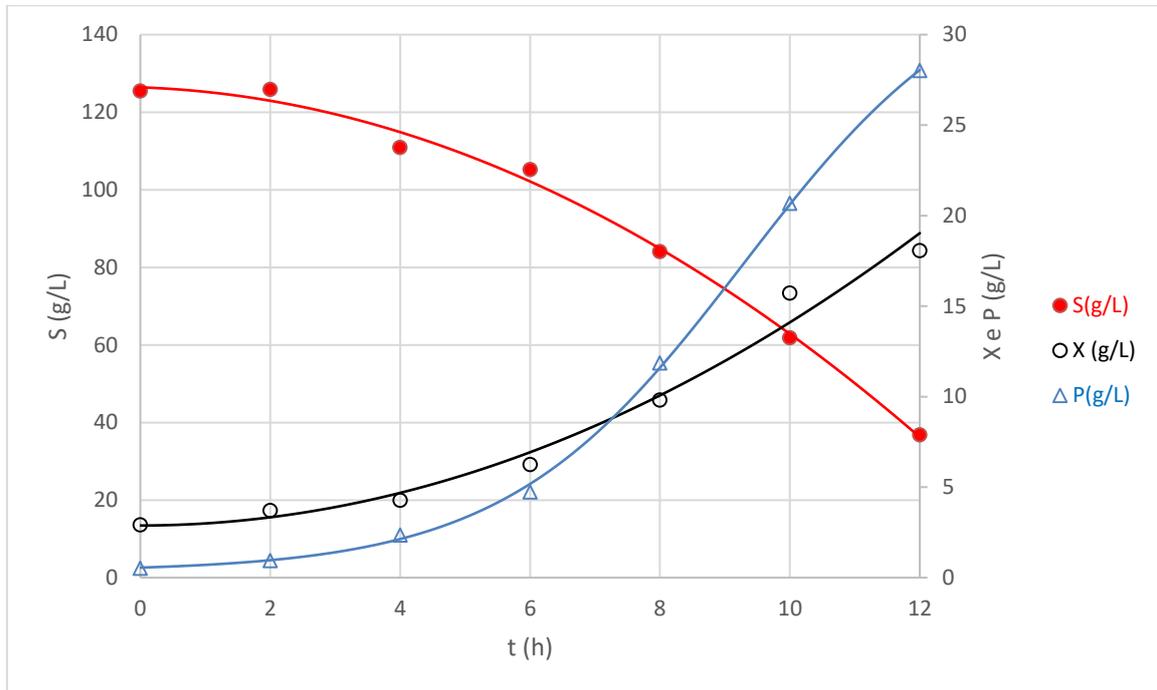


Figura 20 - Curvas ajustadas de X, S e P (g/L) em função do tempo (h) ensaio 125 g/L.

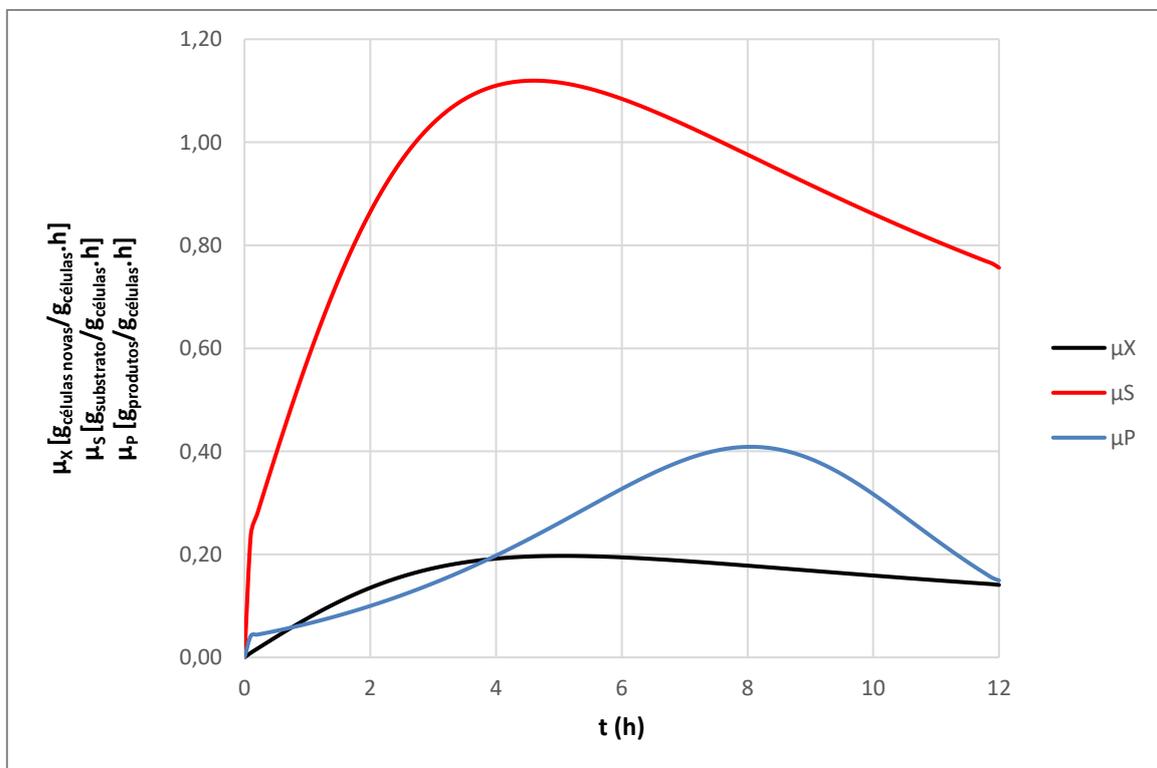


Figura 21 - Gráfico de μ_X , μ_S e μ_P para $S_0 = 125$ g/L.

5.1.12. Ensaio em regime batelada com $S_0 = 150 \text{ g/L}$

O intervalo de amostragem no ensaio foi definido para a cada 2,5 h. Com um total de 7 amostras contando com o ponto inicial, sendo feitas análises de açúcares redutores totais via DNS, massa celular por espectrofotometria e etanol por cromatografia gasosa. Os resultados obtidos para esta fermentação descontínua, são apresentados na Tabela 15.

Este ensaio foi realizado com a concentração inicial de substrato a 150 g/L de A.R.T e conseguiu-se obter uma diluição adequada para atingir as condições desejadas para o experimento. Desta maneira, para obtenção de curvas conforme descrito pela Figura 22.

Tabela 15 - Dados do ensaio em batelada com $S_0 = 150 \text{ g/L}$

tempo(h)	X (g/L)	S(g/L)	P(g/L)
0	2,99	144,01	0,55
2,5	3,46	141,43	1,32
5	4,291	140,66	4,68
7,5	7,42	93,90	11,43
10	11,14	75,81	21,81
12,5	14,53	48,18	36,34
15	18,69	19,66	47,16

O tempo necessário para duplicação da massa celular neste ensaio foi de 6,5 h para a primeira duplicação e posteriormente a segunda duplicação ocorreu ao tempo de 10,9 horas. Ao comparar com os dois ensaios anteriores observou-se uma relação na velocidade de crescimento das células de acordo com a quantidade de açúcares do meio. Pois conforme foi aumentada a concentração de açúcares iniciais (S_0), o tempo de duplicação (t_d) mostrou tendência a aumentar. Mostra-se na Tabela 16 os resultados dos rendimentos calculados com as equações 7, 8 e 9:

Tabela 16 - Rendimentos fermentativos do ensaio batelada à 150g/L de substrato inicial

$Y_{x/s}$	0,13 g _{células} /g _{substrato}
$Y_{p/x}$	2,97 g _{produto} /g _{células}
$Y_{p/s}$	0,38 g _{produto} /g _{substrato}

Na Figura 23 estão as curvas obtidas para velocidades específicas calculadas a partir das equações 3, 4 e 5. Nota-se que a velocidade específica de produção de etanol começou a aumentar apenas a primeira hora do início do

ensaio, até então. Os valores máximos para μ_X e μ_S coincidiram no mesmo tempo (4 horas) e o máximo μ_P foi apenas ocorrer as 7,5 horas. Os valores para as velocidades específicas durante o ponto de máximo μ_X , foram respectivamente, de $0,18 \frac{g_{células\ novas}}{g_{célula \cdot h}}$ para μ_X ; $0,49 \frac{g_{produto}}{g_{célula \cdot h}}$ para μ_P e $1,50 \frac{g_{substrato}}{g_{célula \cdot h}}$ em μ_S .

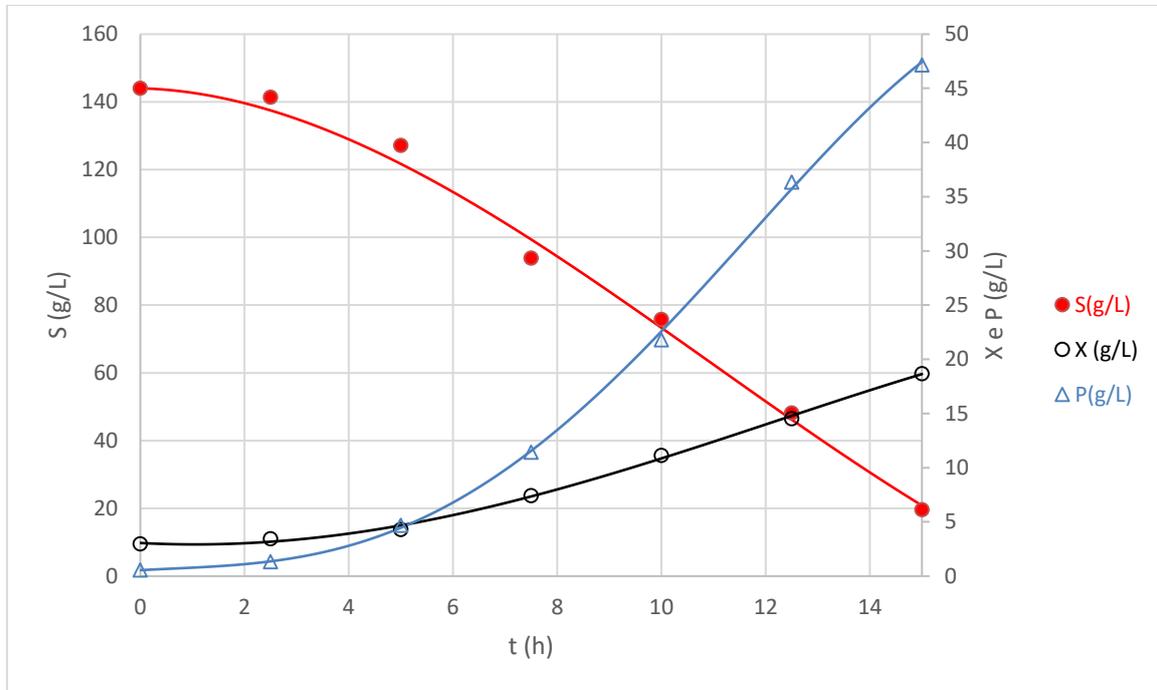


Figura 22- Curvas ajustadas de X, S e P (g/L) em função do tempo (h) para $S_0 = 150$ g/L.

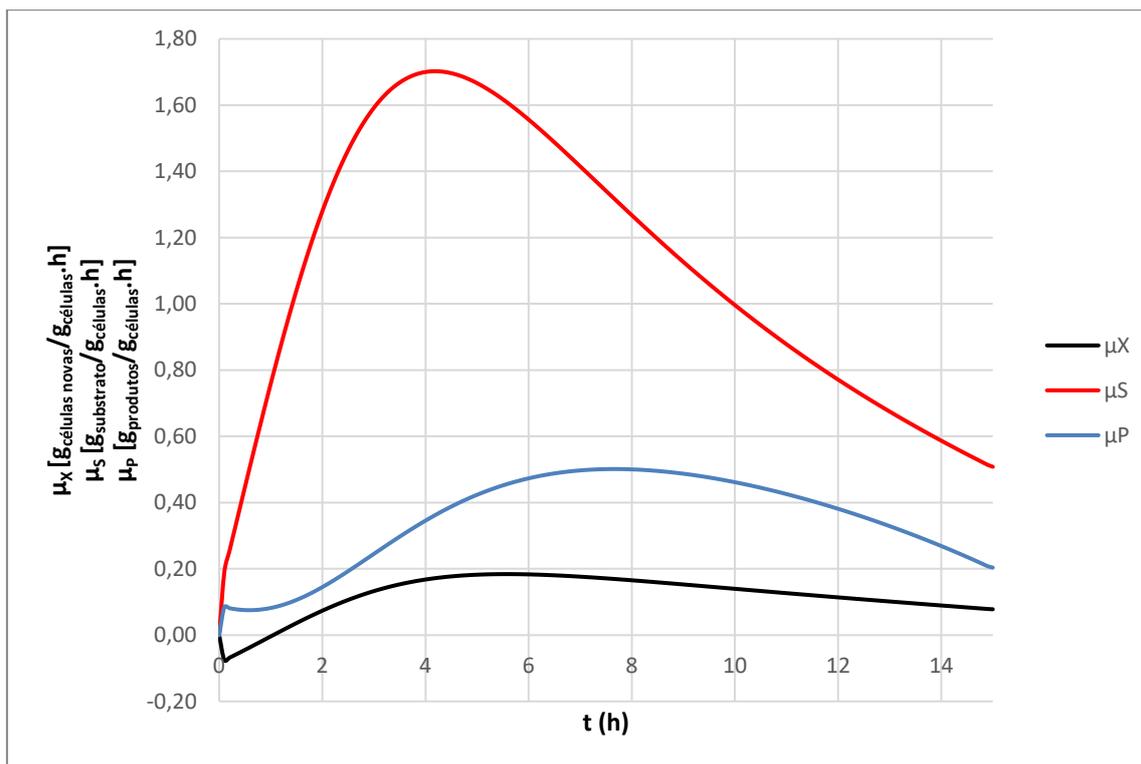


Figura 23- Gráfico de μ_x , μ_s e μ_p para $S_0 = 150$ g/L.

5.1.13. Ensaio em regime batelada com $S_0 = 200$ g/L

O ensaio com concentração de substrato mais elevada apresentou uma amostra a mais, coletada 8 horas após o penúltimo ponto de amostra, conforme disposto na Tabela 17. Este ponto de amostragem foi tirado em um tempo mais avançado considerando que no ensaio anterior já houvera residual de açúcares para uma concentração inicial menor. Os pontos de amostragem até 15 horas foram coletados com intervalos de 2,5 h. E mesmo após quase 24 h de duração do ensaio ainda permaneceu com residual de açúcares redutores de 19,1 g/L. Entre o período de 15 a 23 horas não houve muito crescimento do número de células ou consumo de substrato, porém, o etanol total presente no meio cresceu de 27,65 g/L para 58,98 g/L. A partir dos dados da Tabela 17 foram traçadas linhas de tendência feitas com um polinômio de quarto grau, representadas na Figura 24.

Tabela 17 - Dados do ensaio em batelada com $S_0 = 200$ g/L.

Tempo (h)	X (g/L)	S (g/L)	P (g/L)
0	3,34	192,52	0,48
2,5	3,38	188,79	0,85
5	2,92	178,21	3,02
7,5	5,45	170,81	6,52
10	7,49	157,20	13,35
12,5	17,88	136,19	21,07
15	23,99	60,14	27,65
23	28,50	19,10	58,98

O Tempo para duplicação da concentração de células de levedura neste ensaio foi de 8,9 horas para atingir $2 X_0$, depois o ritmo acelerou e o tempo para atingir $4 X_0$ foi as 11,3 horas e $8 X_0$ com 15,5 horas. Na Tabela 18 estão os rendimentos calculados utilizando os resultados dispostos na Tabela 17 com as equações 7, 8 e 9:

Tabela 18 - Rendimentos fermentativos do ensaio batelada à 200g/L de substrato inicial

$Y_{x/s}$	0,16 g _{células} /g _{substrato}
$Y_{p/x}$	1,32 g _{produto} /g _{células}
$Y_{p/s}$	0,21 g _{produto} /g _{substrato}

Dos valores de velocidades específicas (μ_x , μ_P e μ_S) (Figura 25), para células, produto e substrato. Tem-se que as velocidades de produto e substrato neste ensaio atingiram seus maiores valores em 6 horas do ensaio. E após isto, por volta de 10 horas do início da fermentação a velocidade específica de crescimento celular atingiu o seu valor máximo ($0,30 \frac{g_{célula}}{g_{célula} \cdot h}$) para este ensaio, neste ponto os valores de μ_P e μ_S foram respectivamente $0,28 \frac{g_{células\ novas}}{g_{célula} \cdot h}$ para e $1,37 \frac{g_{substrato}}{g_{célula} \cdot h}$.

O comportamento para μ_x diferiu dos três ensaios em regime descontínuo anteriores, onde μ_x seguiu o comportamento de μ_S . Neste ensaio quando μ_x começou a diminuir, os valores de μ_P já se encontravam em queda, porém manteve o valor de $0,14 \frac{g_{produto}}{g_{célula} \cdot h}$ até o término do ensaio.

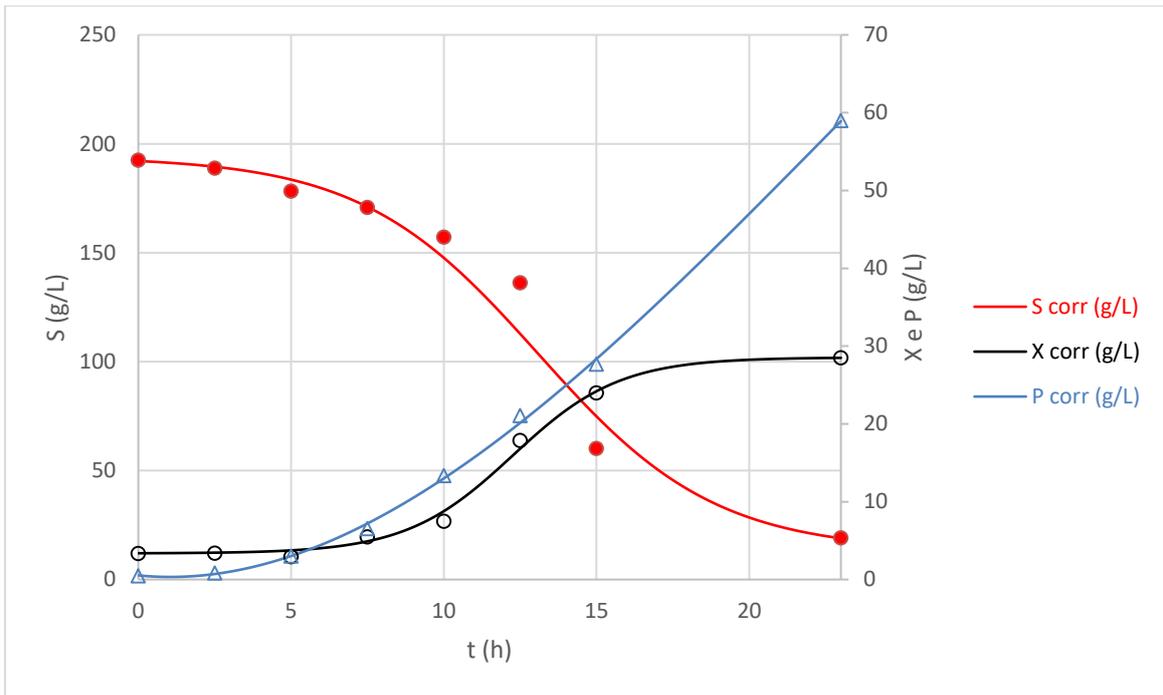


Figura 24 - Curvas ajustadas de X , S e P (g/L) em função do tempo (h) para $S_0 = 200$ g/L.

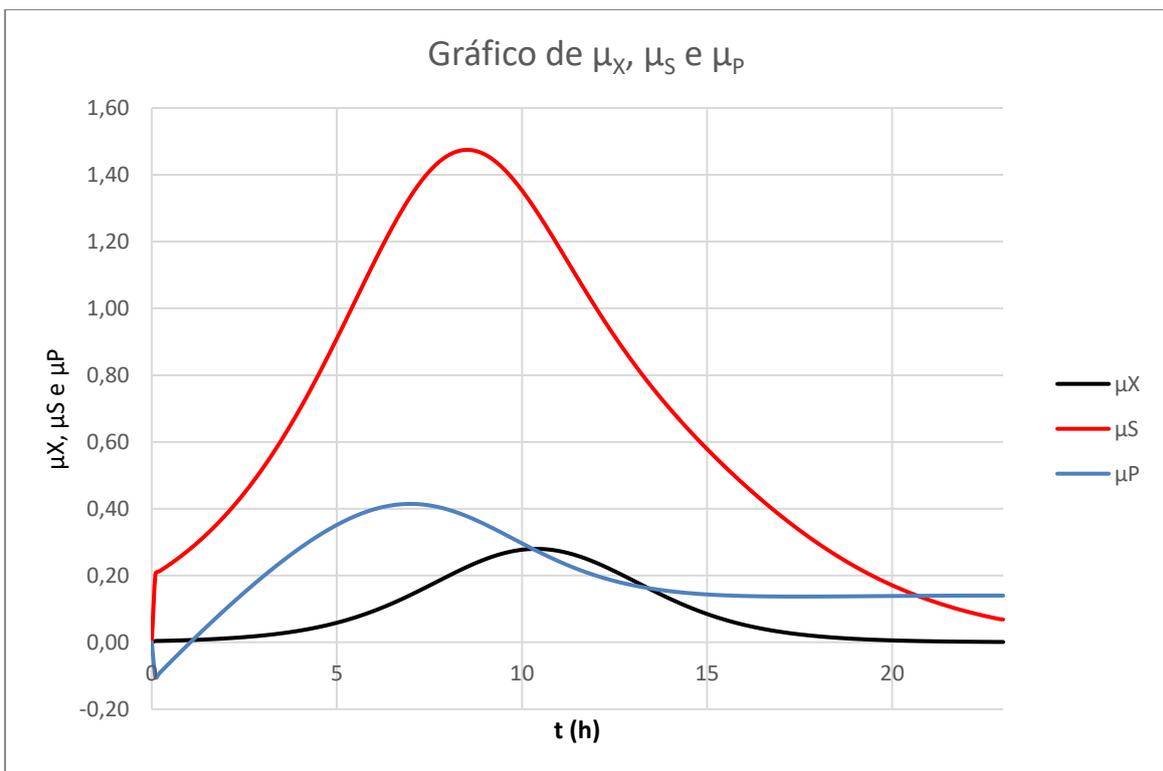


Figura 25 - Gráfico de μ_X , μ_S e μ_P para $S_0 = 200$ g/L.

Comparando os valores de $\mu_{X\text{máx}}$ dos ensaios em regime descontínuo em função do substrato inicial, observa-se que a velocidade específica máxima

diminuiu conforme aumenta-se a quantidade inicial de substrato, indicando que pode ter ocorrido inibição como Moulin *et al.* (1980) encontraram em seu trabalho. Porém no ensaio a 200 g/L, obteve-se um valor de $0,28 \frac{g_{células\ novas}}{g_{célula}\cdot h}$, o maior valor dos 4 ensaios, seguido do valor de $0,21 \frac{g_{células\ novas}}{g_{célula}\cdot h}$ para o ensaio realizado a 50 g/L. Nos pontos em que se obteve μ_{Xmax} para cada ensaio, os valores de μ_S e μ_P no instante em que μ_X atingiu seu maior valor para cada um dos ensaios estão representados na Tabela 19.

Como os maiores valores para μ_{Xmax} foram nos ensaios de 50 g/L e 200 g/L (Tabela 19), cabe uma comparação entre os dois. Ambos ensaios atingiram o valor de $0,30 \frac{g_{etanol}}{g_{células}\cdot h}$ para μ_P , porém obtiveram diferentes valores de μ_S , respectivamente $0,79 \frac{g_{substrato}}{g_{células}\cdot h}$ e $1,37 \frac{g_{substrato}}{g_{células}\cdot h}$ para os ensaios realizados a 50 g/L e 200 g/L de S_0 . No ensaio realizado à 50 g/L de substrato inicial uma parte maior dos açúcares consumidos foi transformada em etanol e célula. O ensaio realizado com 200 g/L de S_0 alcançou valores de μ_{Xmax} maiores, porém o aumento no consumo de substrato por unidade de células neste ensaio em relação ao anterior não se refletiu em aumento na velocidade específica de produção de células ou etanol.

Tabela 19 - Dados de velocidade específica de crescimento celular máxima e velocidades específicas de consumo de substrato e produção de etanol para quando a de produção de células é máximo para os ensaios descontínuos realizados.

S_0 (g/L)	$\mu_{Xmax} \left(\frac{g_{células\ novas}}{g_{célula}\cdot h} \right)$	$\mu_S \left(\frac{g_{substrato}}{g_{células}\cdot h} \right)$	$\mu_P \left(\frac{g_{etanol}}{g_{células}\cdot h} \right)$
49,29	0,21	0,79	0,30
125,49	0,20	1,10	0,31
144,01	0,18	1,50	0,49
192,52	0,28	1,37	0,30

Em relação à produtividade (Tabela 20) o ensaio realizado com S_0 de 50 g/L foi o que demonstrou a menor produtividade (1,69 g/L.h) nas condições utilizadas (X_0 de 3 g/L em massa úmida e temperatura de 32°C). O ensaio de maior produtividade foi o realizado a 150 g/L de S_0 com produtividade de 3,14 g/L.h., porém, na Tabela 19, este ensaio foi o que teve a menor velocidade específica máxima de crescimento celular ($0,18 \frac{g_{novas\ células}}{g_{células}\cdot h}$) ao mesmo tempo que atingiu o maior consumo de substrato por unidade de células por hora.

Tabela 20 - Produtividade dos ensaios descontínuos de substrato inicial de 50 g/L a 200 g/L.

S ₀ (g/L)	Duração do ensaio (h)	Etanol (g/L)	Produtividade (g/L.h)
49,29	9	15,22	1,69
125,49	12	28,02	2,34
144,01	15	47,16	3,14
192,52	23	58,98	2,56

A partir das equações (7, 8 e 9) foram calculados os rendimentos fermentativos $Y_{X/S}\left(\frac{g_{células}}{g_{substrato}}\right)$, $Y_{P/X}\left(\frac{g_{produto}}{g_{células}}\right)$ e $Y_{P/S}\left(\frac{g_{produto}}{g_{substrato}}\right)$ para os ensaios realizados com substrato inicial de 50 g/L e 200 g/L (Tabela 21). Dos quais é possível observar que os rendimentos para o ensaio realizado com substrato inicial de 50 g/L forneceram maior quantidade de células por unidade de substrato consumida e a segunda maior quantidade de etanol obtido por unidade de substrato. De modo que optou-se pela utilização da condição de 50 g/L para início da alimentação contínua nos ensaios em regime contínuo desse trabalho.

Tabela 21 - Rendimentos para os ensaios com substrato inicial de 50 g/L a 200 g/L

S ₀ (g/L)	Y _{x/s}	Y _{p/x}	Y _{p/s}
49,29	0,20	1,76	0,36
125,49	0,17	1,81	0,31
144,01	0,13	2,97	0,37
192,52	0,16	1,32	0,21

FERMENTAÇÃO EM REGIME CONTÍNUO

Os ensaios anteriores em regime descontínuo foram realizados para definir as melhores condições de taxa de diluição (D) igual a μ_x para os ensaios em regime contínuo. Na condição escolhida para início da fermentação em regime contínuo, foi obtido o valor de $\mu_{Xmáx}$ de $0,21 \frac{g_{células\ novas}}{g_{célula.h}}$, que para os ensaios em regime contínuo seria equivalente à taxa de diluição (D) [h⁻¹] máxima que se poderia utilizar. Pois, em regime contínuo, operar em valores de D próximos do valor de $\mu_{Xmáx}$ pode provocar o fenômeno de “lavagem” no reator, que é quando a taxa de crescimento não consegue mais manter a concentração de células no reator, provocando aumento da concentração de substrato na corrente de mosto fermentado na saída do reator.

Os ensaios em regime contínuo foram realizados em um biorreator New Brunswick™ Bioflo®III (Figura 26), o qual possui controles de temperatura, agitação, sensor de temperatura, pH, saída de gases com condensador acoplado e entradas e saídas que permitem medidas e controles “on line” em diversas variáveis.

Os ensaios foram realizados na temperatura de 32°C, sem controle de pH, com adição de antiespumante conforme necessário e agitação controlada. Os ensaios foram planejados para iniciarem em regime, com objetivo de fazer com que a fermentação passasse da fase “lag” e estivesse na fase de crescimento exponencial quando ao trocar de regime para o contínuo. Deste modo a velocidade específica de crescimento celular estaria ligada à taxa de diluição utilizada, pois ao fazer a mudança de regime de operação para o regime contínuo o objetivo era manter a fermentação operando em regime estacionário. Assim, no reator se manteria uma concentração estável de células suspensas no meio.



Figura 26 - Biorreator New Brunswick™ BioFlo®III.

Antes do início dos experimentos em regime contínuo, foi necessário fazer a verificação da homogeneidade do reator para garantir que toda extensão do reator

estivesse na mesma concentração e que não houvesse zonas mortas no reator, de modo a aproveitar toda a extensão do volume utilizado para a fermentação.

5.1.14. Teste de homogeneidade do Reator

O teste de homogeneidade do reator foi realizado com uma suspensão de células preparada na concentração estimada para o início da alimentação contínua nos reatores, para se ter condições similares na operação dos ensaios em regime contínuo. Esta suspensão foi preparada no volume de 1 litro (volume que foi utilizado nos ensaios realizados no biorreator) com água destilada e células de levedura na concentração de 10 g/L de massa úmida, empregando-se agitação de 210 rpm. Foi utilizada alimentação de água destilada e amostras foram coletadas na corrente de saída do reator em intervalos de trinta minutos para realizar a leitura da massa úmida de células em espectrofotômetro a 610 nm (Tabela 22), conforme método Olivo (1985).

Tabela 22 - Dados obtidos para teste de homogeneidade no reator New Brunswick™ Bioflo®-III

t(h)	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	5,5	6
Abs	0,401	0,355	0,326	0,306	0,273	0,276	0,249	0,246	0,228	0,221	0,196	0,181	0,173

Conforme a Tabela 22 foram feitos os cálculos de acordo com a Equação (27), proveniente da metodologia para testar homogeneidade de reatores de Gregory (1973), deste modo se o fermentador se comportar como um sistema perfeitamente homogêneo, a variação da absorvância de suspensão deve ter comportamento linear na equação:

$$\log A = \log A_0 - \frac{D}{2,303} t \quad (27)$$

Após isto foi confeccionado o gráfico com o resultado da equação 25 em função do tempo (Figura 27), traçando-se uma linha de tendência obtida por regressão linear, obteve-se um valor de $R^2 = 1$, deste modo, mostrou que o biorreator utilizado teve comportamento linear na condição utilizada que também foi similar ao que se conseguiu obter nos ensaios em regime contínuo, para concentração inicial de células no momento inicial da troca de regime descontínuo para o contínuo, portanto pode-se considerar que o comportamento do reator durante os ensaios também operou próximo à condição de homogeneidade.

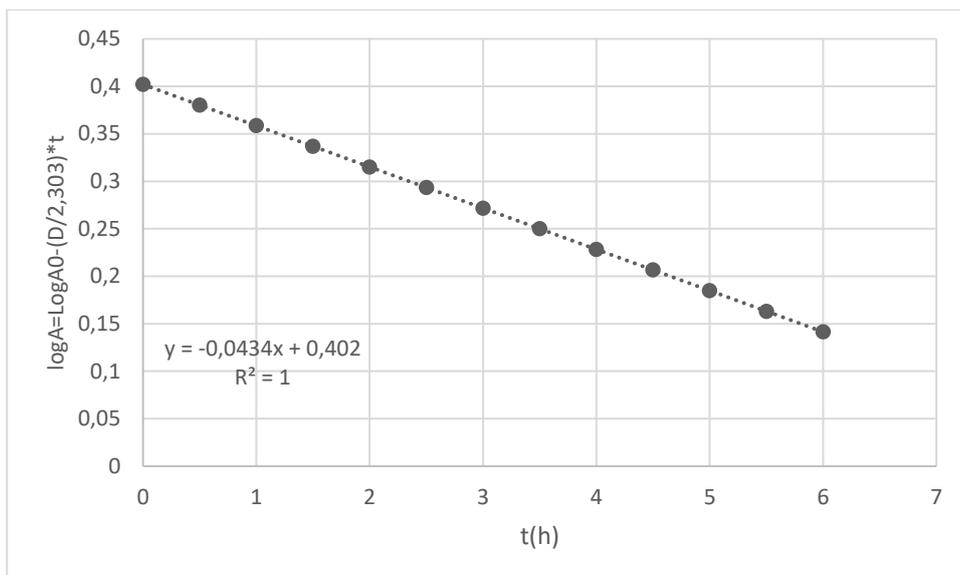


Figura 27 - Gráfico resultante do ajuste para o teste de homogeneidade realizado no reator New Brunswick™ Bioflo®-III.

5.1.15. Preparo dos ensaios contínuos

Foram realizados quatro ensaios fermentativos em regime contínuo utilizando melaço de cana-de-açúcar invertido e clarificado com objetivo de verificar a estabilidade, produtividade e as melhores condições de operação do regime contínuo. Os ensaios foram planejados para operar no volume de 1 L em taxas de diluição desde $0,084 \text{ h}^{-1}$ a $0,14 \text{ h}^{-1}$, na temperatura de 32°C , com variações em X_0 de 3 a 9 g/L (Tabela 23) para verificar se ocorreria estabilidade com valores maiores de concentração de células.

No primeiro ensaio foi feita variação da agitação em um período do ensaio para observar os efeitos provocados por esta alteração no meio reacional. Como se obteve a ocorrência de bastante espuma em agitação com maior intensidade, optou-se pela utilização de agitação em 180 rpm nos demais ensaios.

Tabela 23 - Condições utilizadas nos ensaios em regime contínuo.

Ensaio	S_0 (g/L)	X_0 massa úmida (g/L)	T ($^\circ\text{C}$)	$t_{\text{contínuo}}$ (h)	agitação (rpm)	$V_{\text{útil}}$ (L)	D (h^{-1})
1	100	3	32	9	180 a 270	1,00	0,10
2	100	3	32	9	180	1,00	0,13
3	100	9	32	9	180	1,00	0,14
4	100	6	32	4,5	180	1,00	0,084 a 0,10

Antes do preparo dos meios para os ensaios, calculou-se a quantidade necessária de meio que deve ser preparada para cada ensaio. Utilizando-se a Equação (28), que fornece o volume de meio em função do volume do reator (V_{reator}), da duração do ensaio (t) e da taxa de diluição (D) definida para o experimento:

$$V_{\text{meio}} = V_{\text{reator}} \cdot D \cdot t \quad (28)$$

O mel dos ensaios foi invertido de acordo com a metodologia de inversão (itens 4.4 e 4.5) e clarificado utilizando a condição de clarificação definida pelos resultados apresentados no item 5.2.1 e utilizada no item 5.2.2 para estimar os valores de velocidade específicas máximas de crescimento celular em diferentes concentrações iniciais. Deste modo utilizou-se o polímero catiônico AGP-1009 na proporção de 25 ppm para cada 70 g/L de concentração de substrato. A separação da fração coloidal formada se procedeu de duas formas, no primeiro ensaio em regime contínuo utilizou-se filtração com um filtro prensa de placas (item 4.10.1), como esta operação demanda muito tempo de preparo e materiais, optou-se pela utilização de centrifugação (item 4.10.2) na separação dos resíduos precipitados pela clarificação. Para viabilizar o uso da operação de centrifugação o meio foi preparado em uma concentração maior para posteriormente ser diluído.

Após a filtração/centrifugação procedia-se a retirada de uma amostra para análise da concentração de açúcares redutores totais (ART) obtida e esterilização do meio clarificado em autoclave a 120 °C por 20 minutos sob pressão de 1 Kgf/cm². Após os resultados da análise do ART, com o método DNS (item 4.12.5 dessa dissertação), na câmara de fluxo laminar foram preparadas as diluições para 100 g/L de substrato no volume de 1 litro para uso como inóculo e o restante foi diluído a 70 g/L para que fosse utilizado na alimentação da fermentação conduzida em regime contínuo, pois utilizando a Equação (16), considerando $S_1 = 0$ g/L para considerar que todo o substrato na saída do reator tivesse sido consumido, 15 g/L de células e $\mu_{\text{Xmax}} = 0,21 \frac{\text{g células novas}}{\text{g célula} \cdot \text{h}}$ resulta em 71,4 g/L na alimentação.

Os nutrientes (0,4 g/L de uréia, 1 g/L de sulfato de magnésio e 1 g/L de fosfato de potássio dibásico) nestes meios foram adicionados na etapa de diluição e depois o meio foi novamente esterilizado.

Para a operação em regime contínuo foi necessário o bombeamento do meio nutricional durante quase todo o tempo de fermentação e isso significou a utilização de bombas peristálticas para fazer tanto alimentação de meio nutricional quanto a retirada de meio de cultivo. Portanto, para cada ensaio, foi calculado a vazão de alimentação a partir da taxa de diluição específica (D), definida anteriormente como a relação da vazão de alimentação ou de retirada de mosto fermentado como o volume útil do reator (Equação 12).

Antes do início de cada ensaio um litro de meio de cultivo era esterilizado em luz ultravioleta em câmara de fluxo laminar e transferido assepticamente para um reator devidamente instalado. Em seguida o reator era configurado em modo de esterilização, mantendo a temperatura a 80°C e a uma rotação de 180 a 210 rpm, por um período de 2 horas, e posteriormente resfriado a 32 °C. Passava-se neste momento o sistema para o modo de operação, onde um software de controle instalado em computador de bancada começava a coletar os dados dos sensores “on line” previamente calibrados e conectados ao equipamento. A partir deste momento, o reator recebia de forma asséptica uma suspensão de *Saccharomyces cerevisiae* e dava-se início a fermentação propriamente dita, permanecendo esta em regime descontínuo até o momento da mudança do modo operacional para cultivo contínuo, que era de aproximadamente nove horas para os ensaios com X_0 de 3 g/L em massa úmida de células, pois neste tempo esperava-se que a concentração de substrato estivesse próxima de 50 g/L e a concentração de células acima de 10 g/L. Então, na troca de regime para o regime contínuo as bombas peristálticas previamente calibradas eram acionadas e alimentavam e retiravam respectivamente os meios nutricionais e os meios fermentados.

As retiradas de amostras foram efetuadas a cada uma hora e meia durante a etapa em regime descontínuo, depois a cada duas horas nas primeiras vinte e quatro horas do regime contínuo e posteriormente em intervalos de quatro horas até o término dos ensaios.

5.1.16. Ensaio em regime contínuo com $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$.

Este primeiro ensaio em regime contínuo foi preparado de acordo com o descrito no item 5.3.2 e foi utilizado um filtro prensa na etapa de separação da fração coloidal (item 4.10.1). No ensaio a taxa de diluição específica (D) foi de $0,1 \text{ h}^{-1}$, temperatura de 32°C, sem controles de pH, concentração de substrato inicial (S_0)

definida em 100 g/L e concentração inicial de células (X_0) de 3 g/L em massa úmida (Tabela 23).

Na leitura da amostra inicial foi verificado para o substrato o valor de 121,34 g/L de açúcares redutores totais. O valor de concentração de células inicial (X_0) foi de 4,00 g/L em massa úmida conforme mostrado na Figura 31.

Apesar da quantidade inicial de substrato estar acima da planejada, optou-se por manter o início da fase contínua da fermentação no tempo de nove horas após a inoculação do reator. Nesse intervalo de nove horas, obteve-se os valores de concentração de ART de 58,47 g/L, células de 7,68 g/L e etanol de 18,51 g/L. E ainda nesse instante as bombas peristálticas foram ligadas com uma vazão de 1,77 mL/min de meio de cultivo e de mosto fermentado.

Do início da alimentação contínua até as 39 horas os valores de X mantiveram-se entre 8 e 11 g/L. Após este período ocorreu um acidente de entupimento na corrente de entrada de meio as 42 horas, que provocou a diminuição no volume do reator e foi solucionado logo que detectado. Após a recuperação do volume útil para 1 L, observou-se que o acidente provocou diminuição da concentração celular reduziu do valor de 9 g/L para 6 g/L. Próximo a este instante, as 46 horas foi feita a primeira troca de refil de meio e observou-se que os valores de X decresceram após a troca até atingir valores de 4,80 g/L e manteve-se nesse patamar no período compreendido de 55 a 83 h. Um novo entupimento na corrente de alimentação de meio ocorreu as 66 horas, imediatamente solucionado, de modo que este não provocou alterações na concentração de X. Posteriormente, após a última troca de refil de meio (96,5 h) a concentração de células diminuiu lentamente até o final do ensaio, onde chegou a atingir 3,38 g/L.

A concentração de açúcares redutores totais (ART) e glicose logo após o início da alimentação em regime contínuo apresentou valores baixos até as 43 horas, neste período inicial atingiu-se os valores de concentrações de 5,51 g/L de ART e 0,19 g/L de glicose. Após o instante em que ocorreu o primeiro entupimento (42 h) e a troca do primeiro refil (43 h), o reator começou a apresentar acúmulo progressivo de ART na corrente de mosto fermentado, enquanto os valores de glicose aumentaram apenas para valores próximos de 2,4 g/L e mantiveram-se até o momento em que foi realizada a terceira troca de refil (96,5 h), partir desta, os valores de glicose atingiram 15 g/L e os valores de ART chegaram a valores próximos na corrente de retirada de meio do que era alimentado ao reator. Notou-

se então que cada substituição de refil de meio promoveu o aumento nos valores de concentração dos substratos na corrente de mosto fermentado.

As concentrações de etanol mantiveram-se entre 24 e 27 g/L até as 45 horas de cultivo de etanol (Figura 31). Terminada a alimentação do primeiro volume de meio de cultivo em 46 horas, procedeu-se a troca do refil (frasco contendo mel diluído, clarificado e esterilizado na concentração de 70 g/L de ART) e observou-se que a partir desta ocorreu redução nos valores de concentração de etanol para valores próximos de 19 g/L, que se mantiveram próxima a substituição do volume de meio de cultivo, esta ocorrida as 84 h, e a partir deste momento os valores de P diminuíram e permaneceram próximos de 15 g/L.

Neste ensaio, observou-se que o aumento da concentração de ART e a diminuição da concentração de etanol na corrente de saída acompanharam a redução da concentração celular. Onde, a concentração de etanol atingiu valores da ordem de 18,00 g/L às 83 h cultivo e de 13,30 g/L ao final do ensaio, na corrente de retirada de mosto fermentado do reator atinge-se concentrações próximas do que era alimentado.

Neste ensaio houve três trocas de refis, a primeira troca as 46 horas, a segunda as 84 horas e a última as 96 horas. Observou-se que após a primeira troca de refil (46 h) começaram a acumular açúcares no meio. Após a segunda substituição de refil (84 h), verificou-se apenas a manutenção deste comportamento com os valores de X reduzindo a valores próximos de 4,15 g/L. Posteriormente à última troca de refil, que ocorreu às noventa e seis horas e ao término do ensaio já se verificava na corrente de saída do reator praticamente a mesma concentração do substrato que entra no sistema e valores de X na ordem de 3,38 g/L.

Ao observar os valores de pH obtidos, nota-se que houve maior diminuição em durante a fase em que o consumo de açúcares era mais vigoroso (período compreendido entre 23 a 47 h), depois manteve-se praticamente constante até o final do ensaio. O comportamento esperado do pH era de que se assemelhasse aos ensaios descontínuos, onde ao término da concentração de açúcares, tendesse a subir, devido a menor fração de gás carbônico proveniente da fermentação, conseqüentemente menos ácido carbônico em solução e menor acidez. Porém, neste ensaio, não se verificou este fenômeno, quando começaram a se acumular açúcares no meio após as quarenta e três horas.

A vazão (F), conforme mostra a Figura 28 foi mantida praticamente constante (dados no apêndice D.1.) fazendo-se correções de tempos em tempos baseadas nos níveis do volume do reator. Deste modo manteve-se uma vazão média de 1,77 mL/min o que era a uma taxa de diluição média de 0,106 h⁻¹ para o ensaio.

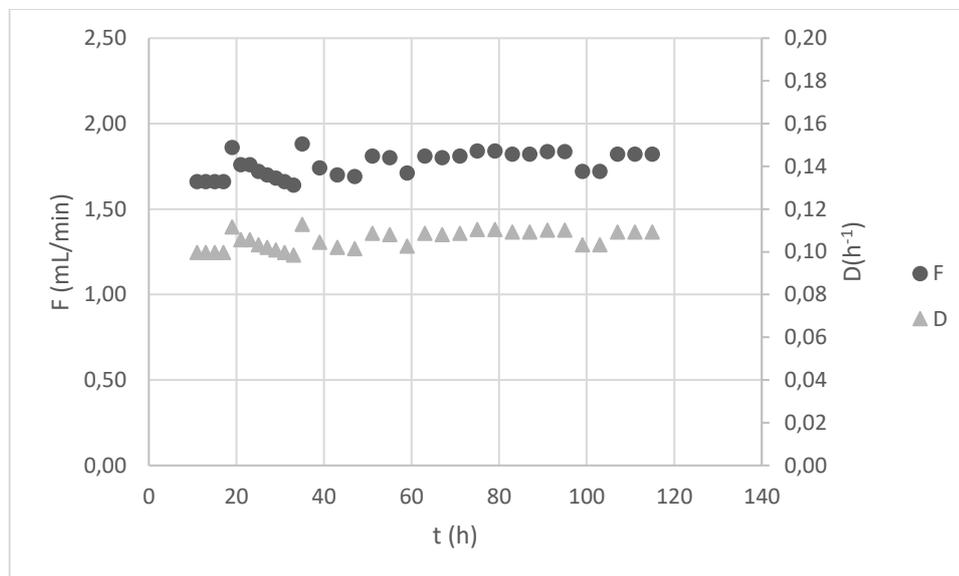


Figura 28 – Vazão (F) e taxa de diluição (D) em função do tempo (t) para o ensaio em regime contínuo com $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$.

Neste ensaio, variou-se a agitação, mantendo-a em valores de 180 rpm até o instante de 21 h, posteriormente em 240 rpm no intervalo compreendido entre 25 e 31 h, depois, no valor de 270 rpm entre 35 e 59 horas e finalmente, manteve-se o valor de 240 rpm até o término do ensaio. Verificou-se que utilizando valores maiores no controle da agitação se obteve maior quantidade de espuma, necessitando da adição ocasional de antiespumante no reator para controlá-la. Não foi possível verificar efeito nas concentrações de X, S e P com as variações da intensidade de agitação no reator.

Na Figura 29, estão representados os dados de produtividade $[(P) \times (D)]$ e de concentração celular (X) em função do tempo (h). O comportamento da curva de produtividade mostra que no início da fase contínua do ensaio foram obtidos valores mais elevados de produtividade, próximo de 3,00 g/L.h até 21 horas. Entre 23 e 39 horas, ocorreu a manutenção do valor em aproximadamente 2,70 g/L.h até o momento em que ocorreu a primeira troca do refil de meio às 42 horas, quando diminuiu para um valor de 2,00 g/L.h que foi mantido até 83 horas, momento em que ocorreu uma troca de refil (83 h), a partir deste, os valores de produtividade não excederam a 1,5 g/L.h até o final do ensaio. Comparando ainda na Figura 34

a produtividade [(P)x(D)] com a concentração de X, observa-se que os valores das duas variáveis tiveram comportamento similar.

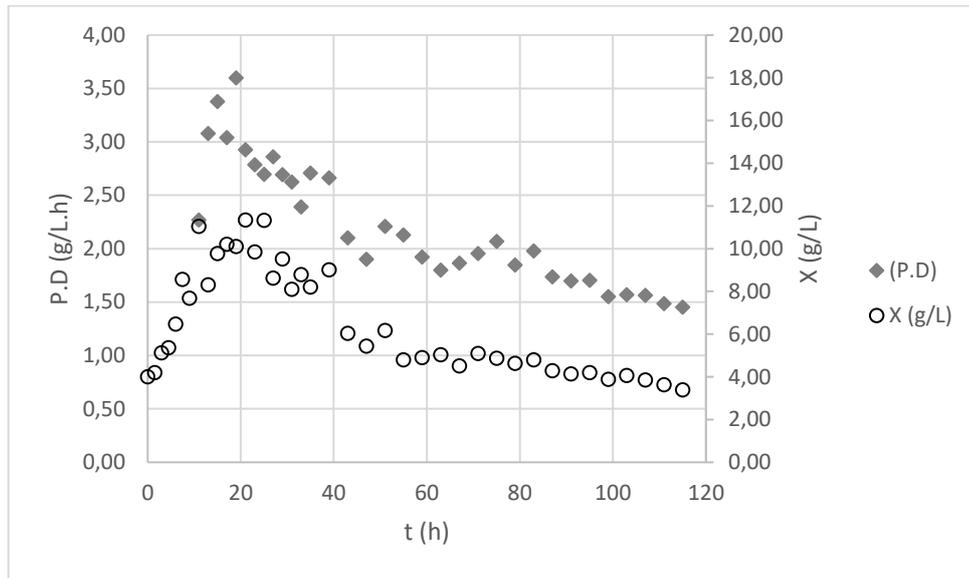


Figura 29 - Produtividade (P.D) e concentração celular (X) em função do tempo (t) para ensaio em regime contínuo com $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$.

Da Figura 30, onde estão representados os dados de [(P)x(D)] em função da taxa de diluição (D), observa-se que a taxa de diluição (h^{-1}) ocorrida durante a realização do ensaio variou entre 0,10 e 0,11 h^{-1} obtendo-se valores de produtividade em etanol na ordem de 1,45 a 3,60 g/L.h. Teve-se, no começo do ensaio, maiores valores de produtividade para uma mesma taxa de diluição e conforme o progresso da fermentação em regime contínuo observou-se redução nos valores de [(P)x(D)] sem que ocorresse alteração da taxa de diluição.

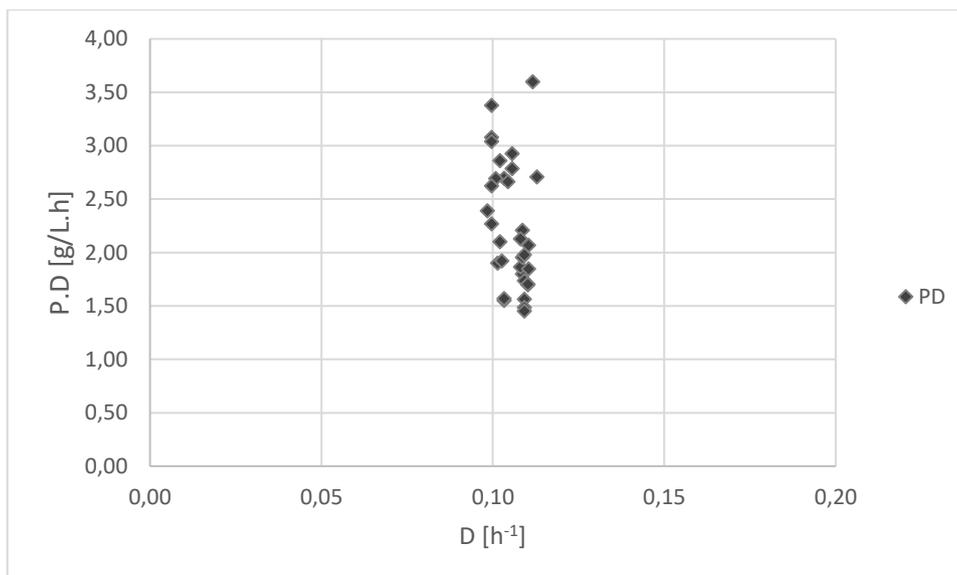


Figura 30 – Produtividade (P.D) em função da taxa de diluição (D) para o ensaio em regime contínuo com $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$.

Por meio dos dados obtidos neste ensaio realizado em um reator do tipo tanque agitado na taxa de diluição média de $0,106 \text{ h}^{-1}$ verificou-se que o ensaio teve um comportamento transiente, variando X, S e P ao longo da duração dessa fermentação obtendo um valor médio de produtividade (P.D) de $2,25 \text{ g/L.h}$ ao levar em consideração todas as amostras coletadas do ensaio no regime contínuo. Verificou-se que após as trocas de refil de meio para esta taxa de diluição neste ensaio, há a intensificação do acúmulo de açúcares e redução na quantidade de células em suspensão e etanol. As ocorrências dos entupimentos na linha de alimentação de meio ao reator foram provocadas por acúmulo de material próximo da entrada do reator. A utilização de bombas peristálticas separadas fez com que as vazões necessitassem de monitoramento constante para manutenção da sincronia entre elas.

Como no início foi possível manter no período entre 17 e 39 h valores de concentração de células acima de 8 g/L , etanol maiores do que 25 g/L e ao mesmo tempo ART próximo de 5 g/L enquanto a glicose se manteve próxima de zero. No ensaio seguinte foi utilizado uma maior taxa de diluição de modo que mais nutriente entraria no reator por unidade de tempo. Desta maneira seriam verificadas as hipóteses de que com mais substrato disponível a concentração de células de levedura e etanol atingiriam valores maiores ou a manutenção prolongada das variáveis do sistema logo após o início dos ensaios em regime contínuo.

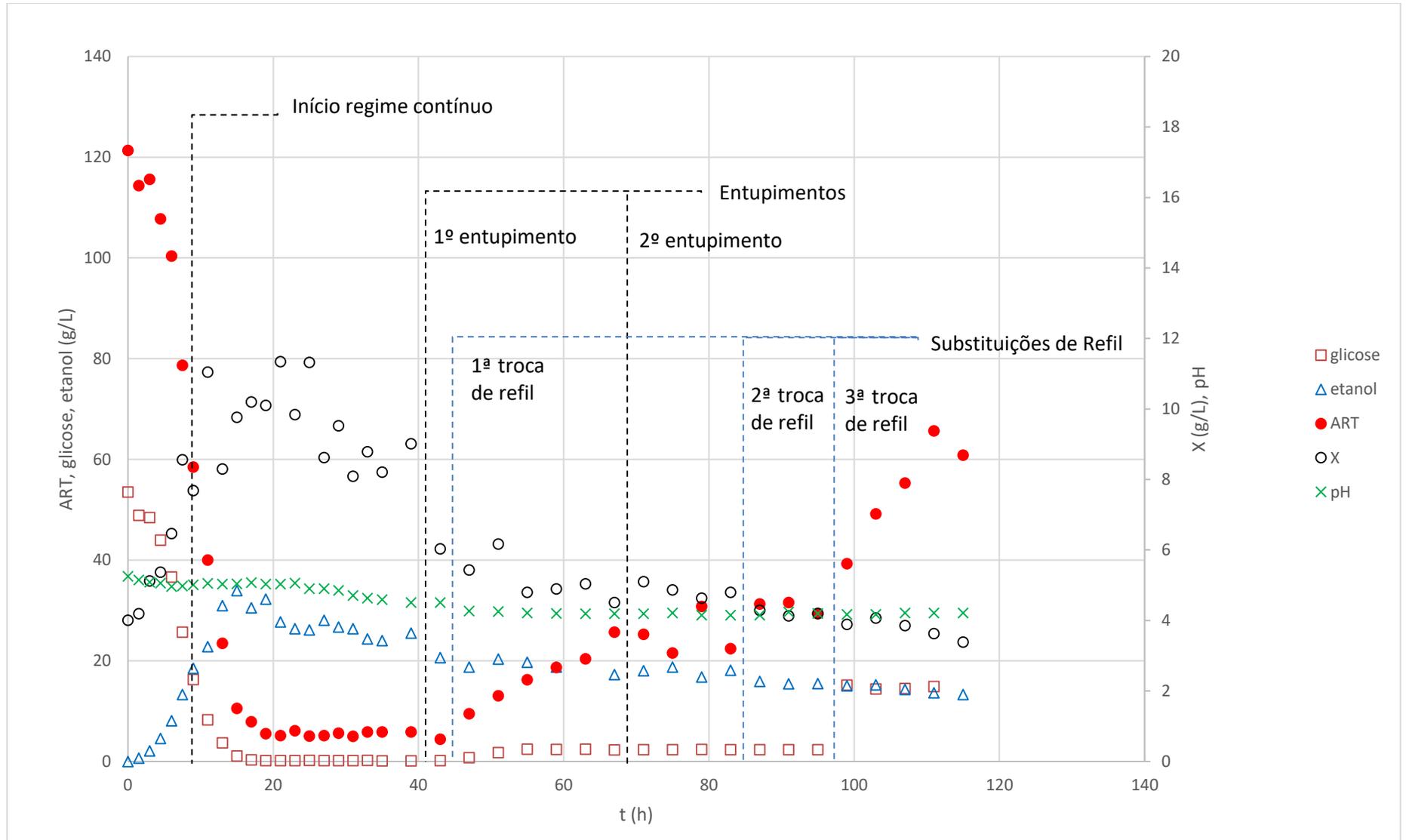


Figura 31 - Dados obtidos durante ensaio em regime contínuo com $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$.

5.1.17. Ensaio em regime contínuo com $D = 0,13 \text{ h}^{-1}$.

O segundo ensaio em regime contínuo foi também de acordo com o exposto no item 5.3.2. porém, a partir deste ensaio optou-se pela centrifugação do meio a ser clarificado em vez da filtração em filtro prensa visto que este além de ter uma operação mais demorada levava a perdas significativas de material filtrado.

Para este ensaio foram preparadas diluições a 100 g/L de substrato para o preparo do inóculo e o restante na concentração de 70 g/L para uso como meio de alimentação. Também preparou-se 1,5 litros de meio contendo apenas glicose na concentração de 35 g/L para verificar se a frutose continuava sendo consumida após começar a se acumular no reator. A taxa de diluição específica para este ensaio foi de $0,13 \text{ h}^{-1}$, que equivale à vazão de 2,17 mL/min e optou-se pela agitação a 180 rpm pois no ensaio anterior constatou-se que com agitação elevada ocorre a formação de espuma com maior intensidade no reator.

Os resultados obtidos deste ensaio estão apresentados na Figura 35, onde se verificou que os valores iniciais de substrato limitante S_0 foram de 110,14 g/L de ART, com 46,81 g/L de glicose, esta representando 42,5% dos açúcares totais e a concentração inicial de células, X_0 , foi de 3,39 g/L em massa úmida. Às nove horas de ensaio em regime descontínuo, observou-se valores das variáveis concentração de substrato (S) de 57,4 g/L, Glicose (G), 15,12 g/L, concentração celular (X) de 10,33 g/L (massa úmida) e de concentração de etanol (P) de 20,21 g/L. Estes resultados estavam próximos do que o que havia sido planejado (50 g/L para substrato e 10 g/L de células) e calculados os rendimentos, considerando como um ensaio descontínuo até esta amostra, nos forneceu valores de $Y_{X/S}$ de $0,13 \text{ g}_{\text{células}}/\text{g}_{\text{substrato}}$, $Y_{P/X}$ de $2,87 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{células}}$ e $Y_{P/S}$ de $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{substrato}}$. Ainda neste instante de nove horas se mudou o regime de operação para contínuo, com uma vazão de alimentação e coleta de meio fermentado de aproximadamente 2,17 mL/min que se procurou manter constante durante todo o ensaio, embora tenham ocorrido algumas variações, mas em média a taxa de diluição específica ficou em torno de $0,13 \text{ h}^{-1}$.

Logo após o início da etapa em regime contínuo, a partir da Figura 35, verificou-se que os valores de concentração celular (X) se mantiveram entre 10 e 11,5 g/L no período compreendido entre nove e trinta e uma horas de cultivo. A partir deste período o valor de X apresentou comportamento de redução fermentação que se manteve até o momento de sessenta e nove horas, quando atingiu 4,23 g/L e assim

permaneceu até o instante de 93 horas, em que apresentou nova redução em seus valores para o entorno de 2,86 g/L. A troca de refil de meio contendo mel invertido a 70 g/L por outro contendo apenas 35 g/L de glicose como substrato fez com que a concentração de células apresentasse nova redução em seu valor, chegando a até 1,86 g/L ao término do ensaio.

No início do regime contínuo, de acordo com a Figura 40, se observou que no período compreendido entre 9 e 41 horas, ocorreu elevado consumo de substrato, pois as concentrações de ART e glicose na corrente de saída do reator mantiveram-se com valores baixos de respectivamente, 11,50 g/L para o ART e 1,40 g/L para glicose. Neste ensaio, a primeira substituição de refil de meio clarificado ocorreu as 38 h e assim como no ensaio anterior, verificou-se que após a substituição, começou a ocorrer aumento na concentração de ART no mosto, com a diferença de que neste ensaio também ocorreu aumento na concentração de glicose a partir de 45 h. Foi detectado um entupimento as 63 h do ensaio, que foi solucionado rapidamente e não teve efeitos visíveis na concentração de substrato, ocorrendo apenas a manutenção do comportamento.

Após a segunda troca de refil em 76 horas do início do ensaio verificou-se ainda o comportamento de crescimento na concentração de ART e glicose, até o momento em que foi utilizado o refil com glicose pura na concentração de 35 g/L as 117h. Neste instante a concentração de substrato já alcançava valores de 48,34 g/L e para glicose 15,75 g/L. O uso do refil contendo apenas glicose serviu para verificar se ainda ocorria o consumo de frutose no meio, que se verificou verdadeiro, pois a concentração de ART começou a cair até que chegasse à mesma concentração da glicose, e posteriormente os dois valores caíram juntos.

Os valores de etanol detectados na corrente de saída do reator (Figura 35), inicialmente aumentaram até o instante de quinze horas, quando se atingiu o valor de 30,70 g/L que foi o maior valor obtido neste ensaio. A partir deste instante (15 h) a concentração de etanol manteve-se próxima de 25 g/L até o momento da primeira troca de refil (38 h), que a partir deste verificou-se redução no valor de etanol. Após a ocorrência do primeiro entupimento, obteve-se uma redução mais acentuada no valor de etanol, chegando a atingir 7,07 g/L às 73 h. Após a segunda troca de refil, ocorrida as 76 horas, a concentração de etanol se recuperou e manteve-se valores próximos de 10 g/L até o momento em que foi utilizado o refil contendo meio com apenas glicose

como substrato (35 g/L), em que a partir deste não se obteve mais valores superiores a 7,50 g/L de P.

Os valores de pH durante o ensaio sofreram pouca variação, no início do ensaio o valor de pH foi de 5,33 e ao início da operação em regime contínuo havia reduzido para 5,15 que se manteve até 31 horas do ensaio. Posteriormente os valores de pH reduziram, atingindo 4,34 e assim se mantendo em valores acima de 4,15 até o término do ensaio.

Na Figura 32 estão os dados de vazão (F) no reator em regime contínuo, observa-se que a vazão sofreu algumas oscilações, mas em geral manteve-se no valor desejado para a realização do ensaio. Foram feitas correções de tempos em tempos na vazão de acordo com o nível de volume do reator. Deste modo, conseguiu-se manter um valor médio de 2,17 mL/min, que corresponde à uma taxa de diluição de $0,13 \text{ h}^{-1}$.

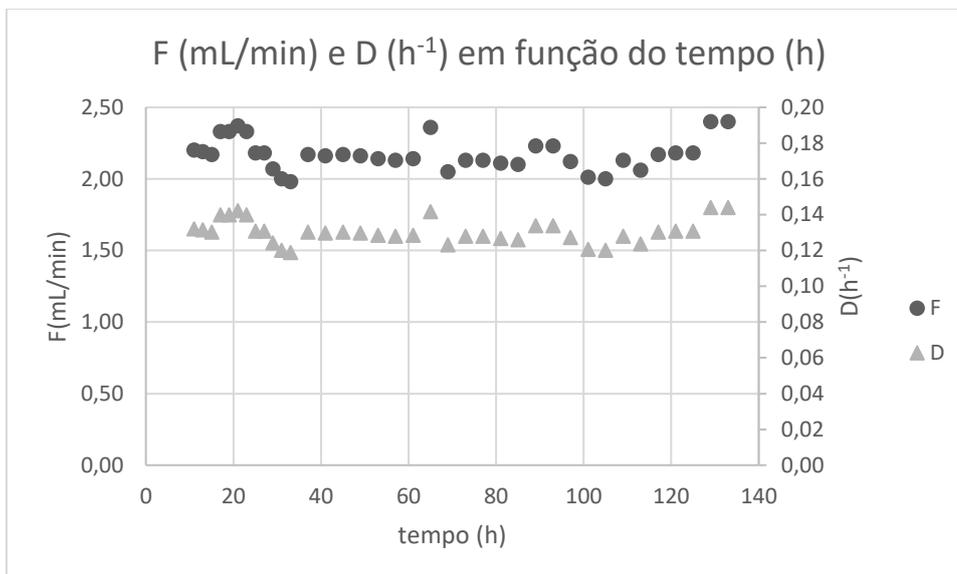


Figura 32 - Vazão (F) e taxa de diluição (D) em função do tempo (t) para o ensaio em regime contínuo com $D = 0,13 \text{ h}^{-1}$.

A partir dos dados de produtividade (P.D) e de concentração celular (X) em função do tempo (h), obteve-se a Figura 33 com o objetivo de ilustrar a variação da produtividade em etanol ($g_{\text{etanol}}/\text{L.h}$) no reator. Deste gráfico, nota-se que o comportamento da produtividade (P.D) em etanol acompanhou o perfil da concentração celular que é decrescente durante quase todo o período de fermentação contínua. Os valores de produtividade ficaram próximos de $4 g_{\text{etanol}}/\text{L.h}$ até o instante de 23 horas, posteriormente, ocorreu redução dos valores de (P.D) até 97 horas do

início do ensaio, quando manteve-se em valores não maiores do que 1 g_{etanol}/L.h até o término do ensaio.

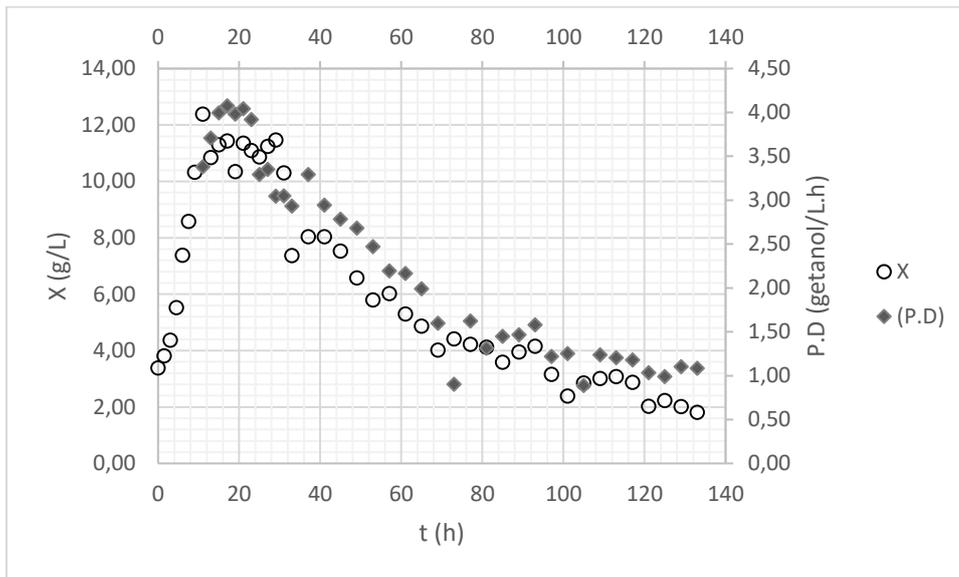


Figura 33- Produtividade (P.D) e concentração celular (X) em função do tempo(h) para ensaio em regime contínuo com $D = 0,13 \text{ h}^{-1}$.

Dos dados de (P.D) em função da taxa de diluição (D) (Figura 34) observou-se variação na taxa de diluição específica (D) em valores entre 0,12 e 0,14 h^{-1} , com valores de produtividade de 0,90 a 4,05 g_{etanol}/L.h. Assim como no ensaio contínuo 1, no começo do ensaio obteve-se maiores valores de produtividade para um mesmo D e enquanto se processa a fermentação, se observava redução nos valores de [(P)x(D)] sem que ocorresse alterações muito grandes em D. Fazendo-se uma média dos valores de produtividade, chegou-se ao valor de 2,28 g_{etanol}/L.h.

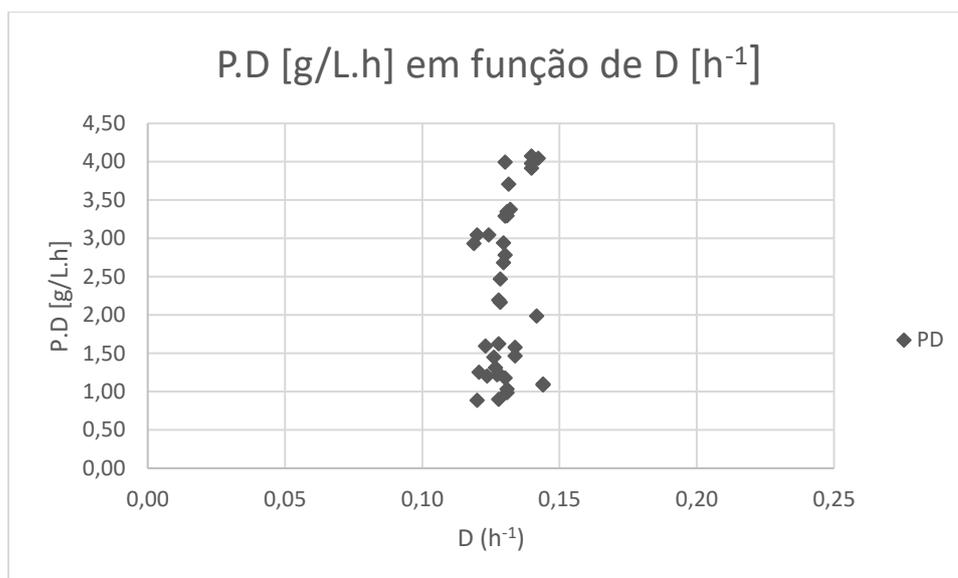


Figura 34 - Produtividade ($P.D$) em função da taxa de diluição (D) para o ensaio em regime contínuo com $D = 0,13 \text{ h}^{-1}$.

Neste ensaio conseguiu-se operar o reator na taxa de diluição específica de $0,13 \text{ h}^{-1}$ ao considerar a média das vazões detectadas em toda sua duração. Neste ensaio, se obteve inicialmente estabilidade para as variáveis X , S e P até o tempo de 31 horas. E a partir deste instante, após a primeira troca de refil, ocorrida as 38 horas, os valores de ART e glicose aumentam conforme segue o ensaio e os valores de X e P diminuem, sendo a redução nos valores de X de maior intensidade do que para P . O entupimento ocorrido na linha de alimentação de meio do reator as 63 h não teve impacto nas variáveis de concentração do ensaio, pois este foi solucionado rapidamente. Após a segunda troca de refil (76 h) somente se observou a manutenção no comportamento de X , S e P .

O uso do refil contendo apenas glicose ao término do ensaio tinha o objetivo de verificar se ainda ocorria consumo da frutose no ensaio, pois no ensaio anterior, ocorreu aumento na concentração de ART enquanto a concentração de glicose se mantinha em baixos valores, o que indicava que a glicose estava sendo praticamente toda consumida e que o ART era praticamente frutose se acumulando. Após o início do uso de alimentação de glicose neste segundo ensaio em regime contínuo, verificou-se que o nível de açúcares totais começou a reduzir (Figura 35), enquanto a glicose se mantinha com concentração estável até que o ART alcançou valores de concentração próximos da concentração de glicose, o que indica que quase toda a frutose havia sido consumida e restava apenas glicose como substrato. Nisto observa-

se que a glicose é mais facilmente metabolizada pelas leveduras, sendo consumida mais rapidamente e que também o consumo da glicose pela levedura não cessa o consumo de frutose, apesar de esta ser consumida em ritmo aparentemente mais lento.

Da produtividade (P.D) no período inicial de estabilidade em regime contínuo (9 a 31 h) verificou-se uma média de 3,62 g/L.h. E considerando toda a duração do ensaio, a média de (P.D) foi de 2,28 g/L.h.

O uso de agitação constante em 180 rpm, fez com que o nível de espuma do reator se mantivesse sob controle por todo o ensaio, desta vez não se fez necessário adições de antiespumante.

Ao trabalhar em uma taxa de diluição de $0,13 \text{ h}^{-1}$, no final deste ensaio (117 h) verificou-se que havia menor concentração de substrato na corrente de saída neste ensaio (48,33 g/L) do que no ensaio anterior (65,64 g/L), indicando que os açúcares foram consumidos com maior intensidade neste ensaio do que no anterior, porém também se obteve menores concentrações de células e etanol.

A duração da fase inicial de estabilidade, quando ocorreu a maior produtividade para ambos ensaios, foi menor neste ensaio, se considerar também os valores de X. Pois estes começaram a diminuir por volta das 33 horas neste segundo ensaio, enquanto no primeiro ensaio somente a partir de 39 horas que se observou o término da estabilidade para X, S e P.

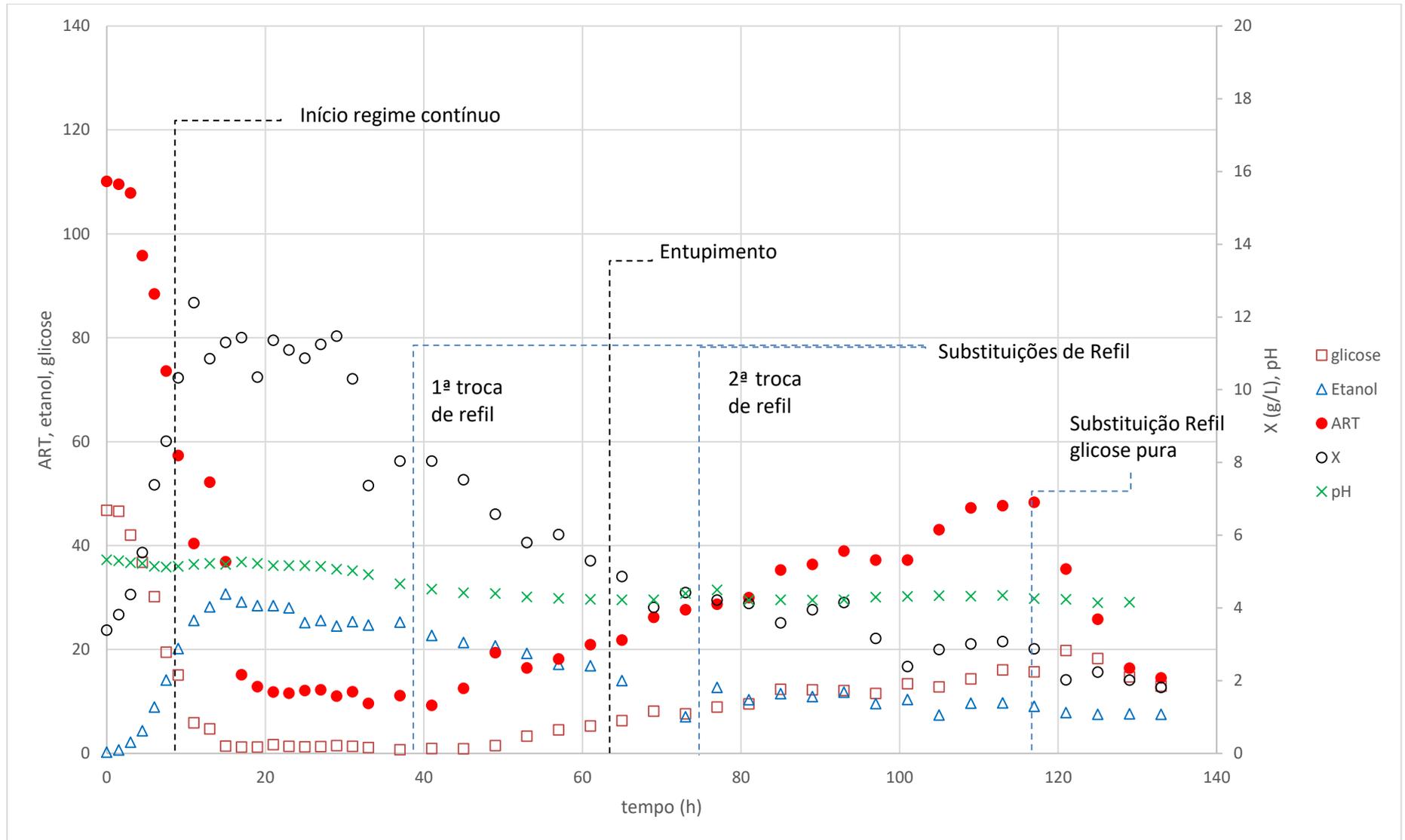


Figura 35 - Dados obtidos durante ensaio em regime contínuo com $D = 0,13 \text{ h}^{-1}$.

5.1.18. Ensaio em regime contínuo com $D = 0,14 \text{ h}^{-1}$.

Neste terceiro ensaio em regime contínuo, foi utilizada a taxa de diluição específica de $0,14 \text{ h}^{-1}$, que equivale à uma vazão de meio clarificado alimentado ao reator de $2,33 \text{ mL/min}$. Aumentou-se a quantidade inicial de células (X_0) para 9 g/L em massa úmida com objetivo de analisar se atingiria no reator um maior valor de X no início da etapa contínua e o aumento na vazão/taxa de diluição foi para verificar se o comportamento visto no ensaio anterior seria mantido e também a possibilidade de evitar a ocorrência de entupimento na corrente de alimentação do reator, pois com uma vazão um pouco maior poderia se evitar o acúmulo de material próximo da tampa.

O preparo do meio neste ensaio procedeu de acordo com o item 5.3.2. e assim como no ensaio anterior se utilizou no processo de clarificação a operação de centrifugação para a separação da fração coloidal formada pela ação dos polímeros no mel invertido. Preparou-se 1 litro de meio clarificado a 100 g/L de substrato para utilizar no preparo do inóculo e aproximadamente, 17 litros na concentração de 70 g/L de substrato para utilização na circulação de meio da etapa contínua.

Na Figura 39 estão dispostos os dados obtidos das amostras deste ensaio, com duração total de 125 horas. Os valores na amostra inicial de concentração de ART, glicose e células foram de respectivamente $66,04 \text{ g/L}$, $26,19 \text{ g/L}$ (39,65% dos açúcares) e $9,26 \text{ g/L}$. Com a análise da amostra inicial, verificou-se que ocorreu um desvio da condição inicial de substrato, o que poderia acabar limitando as condições de crescimento.

Ao instante das nove horas, momento em que foram ligadas as bombas para recirculação de meio se obteve as concentrações de $16,94 \text{ g/L}$ de células, $5,85 \text{ g/L}$ de ART, 0 g/L de glicose e $21,29 \text{ g/L}$ de etanol. No instante inicial da alimentação contínua a concentração de células atingiu o maior valor dentre os ensaios para a condição do início do regime contínuo, e quanto aos substratos, a glicose já se encontrava praticamente exaurida e para o ART obteve-se um valor inicial bastante reduzido em relação ao valor planejado de 50 g/L para o instante inicial do regime contínuo.

A quantidade maior de células utilizada no inóculo fez com que se obtivesse um aumento na concentração de células para $16,62 \text{ g/L}$. O comportamento da concentração de células (X), de acordo com os dados da Figura 39 a partir do instante inicial da fase contínua do experimento (9 h), apresentou o comportamento do fenômeno de lavagem, pois observou-se uma grande redução nos valores de X até o

instante de 33 horas, quando se chega ao valor de 3,20 g/L de células em suspensão. Após a primeira substituição de refil, em 38 horas de ensaio, de meio clarificado a 70 g/L de substrato, observou-se redução na concentração de células que se manteve estável próximo do valor de 2,20 g/L até o término do ensaio. As outras substituições de refil que ocorreram as 76 horas e 111 horas apenas mantiveram o comportamento observado para a concentração celular (X).

A concentração de substrato a partir do início do regime contínuo para este ensaio se encontrava em valores de 5,85 g/L, se mantendo em valores baixos até o instante de treze horas. A partir de treze horas do início do ensaio se verificou aumento progressivo na concentração de ART, enquanto os valores de glicose permaneceram abaixo de 1,5 g/L até o momento da primeira troca de refil, ocorrida as 38 horas. Após a primeira substituição de refil, verificou-se a manutenção do comportamento de ART e glicose começa a acumular no sistema. Próximo ao momento da segunda substituição de refil (76 h) observou-se que os valores de ART tenderam a diminuir, porém logo retornou à tendência anterior de aumento no valor da concentração. Similarmente para a glicose, a concentração aumentou após a segunda troca de refil e chegou a atingir valores entre 12 a 15 g/L, que se mantiveram até o término do ensaio. Após o início da circulação do último refil de meio as concentrações de ART se estabilizaram em valores próximos a 35 g/L. Presume-se que ainda havia consumo de açúcares, pois era alimentado meio a 70 g/L de substrato e aproximadamente 28 g/L de glicose de acordo com a porcentagem inicialmente verificada pela análise dos açúcares da amostra inicial do ensaio.

A concentração de etanol após o início da alimentação contínua de meio clarificado manteve valores entre 24 e 27 g/L até o instante de 33 horas. Após a primeira troca de refil (38 h) se observou diminuição no valor de P, que se manteve também após a segunda substituição de refil de meio as 76 horas, próximo desta substituição de refil os valores de P já se encontravam ao redor de 13 g/L. Posteriormente, o comportamento de redução no valor da concentração de etanol se mantém até 105 horas, quando atinge o valor de 7,57 g/L e se mantém próximo deste valor até o término do ensaio.

O pH inicial foi de 5,29 e no momento das nove horas, quando iniciou-se o regime contínuo já se lia 5,05. Após a transição para o regime contínuo os valores de pH

mantiveram-se com leve redução em seus valores até o final do ensaio, atingindo o valor de 3,84 em 125 horas de ensaio.

A vazão de alimentação (F) medida durante todo o ensaio está representada na Figura 36 com a taxa de diluição (D) correspondente. Observa-se que a vazão de alimentação sofreu algumas oscilações no decorrer do ensaio e seus valores mantiveram-se sempre entre 2,20 e 2,46 mL/min. As variações são decorrentes de correções que foram feitas de acordo com o nível de volume do reator, a fim de manter sempre 1 litro. Em média, levando-se em conta os pontos coletados durante todo o ensaio obteve-se um F médio de 2,31 mL/min, que corresponde a um D de $0,138 \text{ h}^{-1}$.

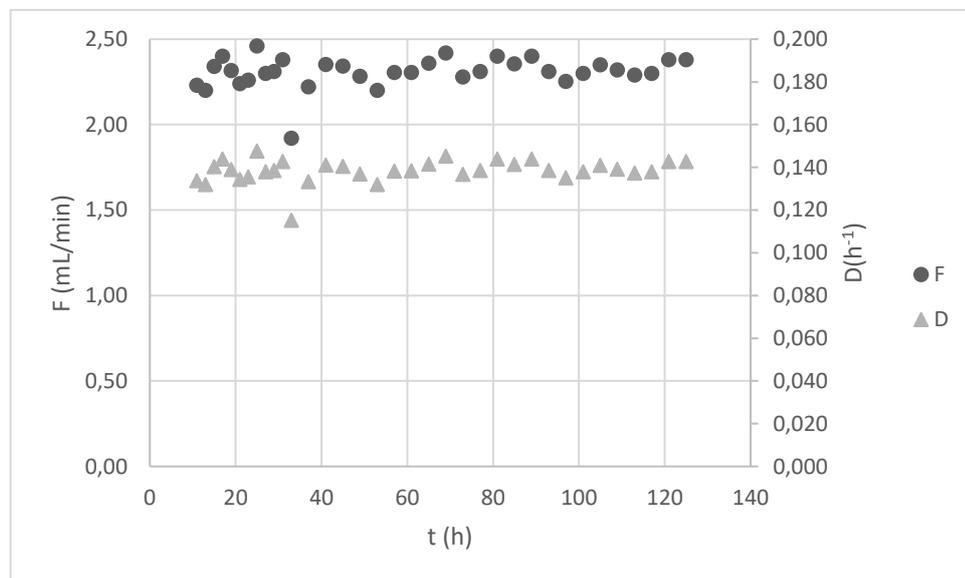


Figura 36 - Vazão (F) e taxa de diluição (D) em função do tempo (t) para o ensaio em regime contínuo com $D = 0,14 \text{ h}^{-1}$.

Na Figura 37 são apresentados os valores de P.D (Produtividade do etanol) em função do tempo (h). Neste ensaio, observou-se que do início do regime contínuo, das nove horas até trinta e uma horas os valores de produtividade em etanol mantiveram-se entre $3,21$ e $3,76 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{L.h}$. Em seguida, verificam-se diminuições de produtividade de etanol, alcançando valores mínimos entre 101 h e 125 h, da ordem de $1,00 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{L.h}$. Neste ensaio não se observou uma relação direta da produtividade em relação à quantidade de células em suspensão como foi observado no ensaio anterior, pois os valores da concentração celular diminuíram mais rapidamente do que a produtividade em etanol, indicando que outros fatores poderiam estar afetando a produtividade em etanol neste ensaio além da quantidade de células presentes no meio.

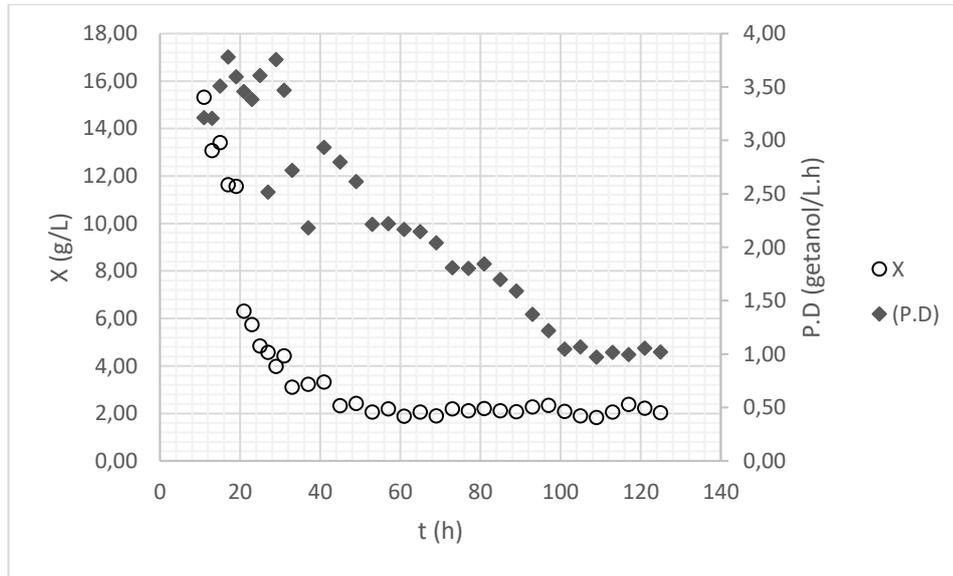


Figura 37- Produtividade (P.D) e concentração de células (X) em função do tempo (t) para ensaio em regime contínuo com $D = 0,14 \text{ h}^{-1}$.

Na Figura 38 são apresentados os dados de produtividade (P.D) em função da taxa de diluição (D). Nesse caso, os valores de produtividade variaram entre 0,97 e 3,78 g_{etanol}/L.h, enquanto se obteve valores para taxa de diluição entre 0,132 e 0,148 h⁻¹. Em média, os valores de produtividade levando-se em conta todas as amostras do ensaio, apresenta um valor de 2,29 g_{etanol}/L.h.

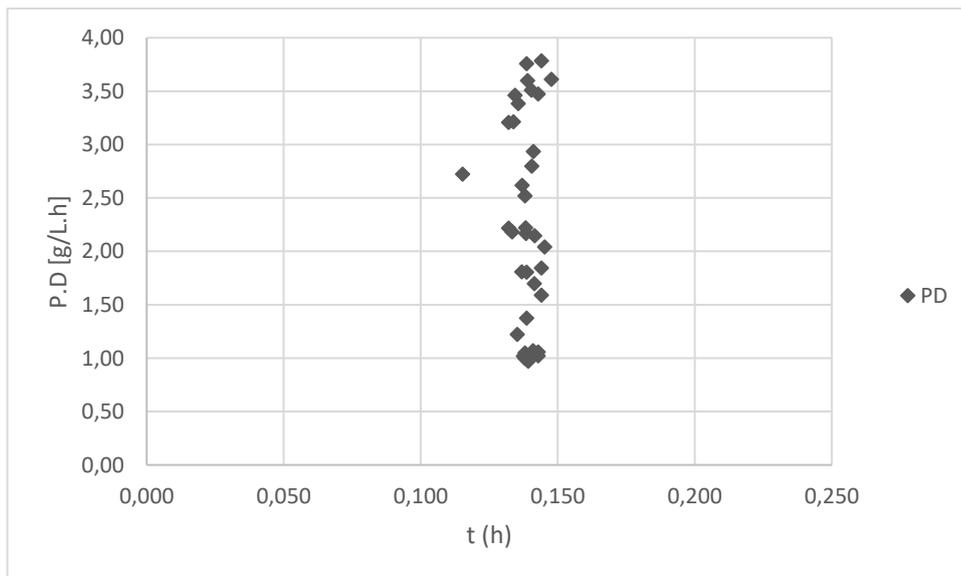


Figura 38 - Produtividade (P.D) em função da taxa de diluição (D) para o ensaio em regime contínuo com $D = 0,14 \text{ h}^{-1}$.

Neste ensaio a concentração inicial de células (X_0) foi de 9 g/L em massa úmida, que levou a um valor de 16,62 g/L no início do regime contínuo. A concentração inicial de substrato (S_0) ficou um pouco abaixo do inicialmente planejado, que era de 100 g/L. Foi elevada a taxa de diluição (D) de 0,13 para 0,14h⁻¹ para verificar se não ocorreriam mais entupimentos na linha de alimentação de substratos. Observou-se um aumento na concentração de substrato a partir de treze horas de ensaio, pois o consumo não acompanhou a quantidade alimentada de nutrientes no meio. Com a taxa de diluição de 0,14 h⁻¹, com a vazão correspondente de 2,33 mL/min observou-se também que não ocorreu o fenômeno denominado de “lavagem”, também a concentração de células não diminuiu bruscamente em nenhum momento durante o ensaio.

Pelo desenvolvimento do ensaio pode-se observar que um aumento da concentração de inóculo implica na modificação do período de início da fase contínua, pois com mais células no inóculo ocorreu uma diminuição do tempo de cultivo, e atingiu-se valores da ordem de 5 g/L de substrato as sete horas e meia, que pode ter impactado a viabilidade celular.

A concentração de etanol na linha de saída do reator se manteve estável com valores próximos de 23 g/L do início do regime contínuo as 9 horas até o instante 33 horas. Posteriormente teve seus valores diminuindo no restante do ensaio, enquanto se observou que as concentrações dos substratos aumentaram e a de células se manteve estável com valores próximos de 2,20 g/L após 45 horas do início do ensaio até seu término. A redução da produtividade em etanol, mesmo com a concentração estável, pode ter ocorrido devido ao impacto causado pelas células ficarem com baixa concentração de açúcares no período de 6 a 9 horas durante o cultivo. Descartando-se a possibilidade de falta de nutrientes no meio, pois todo o meio alimentado ao reator durante o ensaio foi preparado nas mesmas condições de preparo e concentrações de substrato e nutrientes.

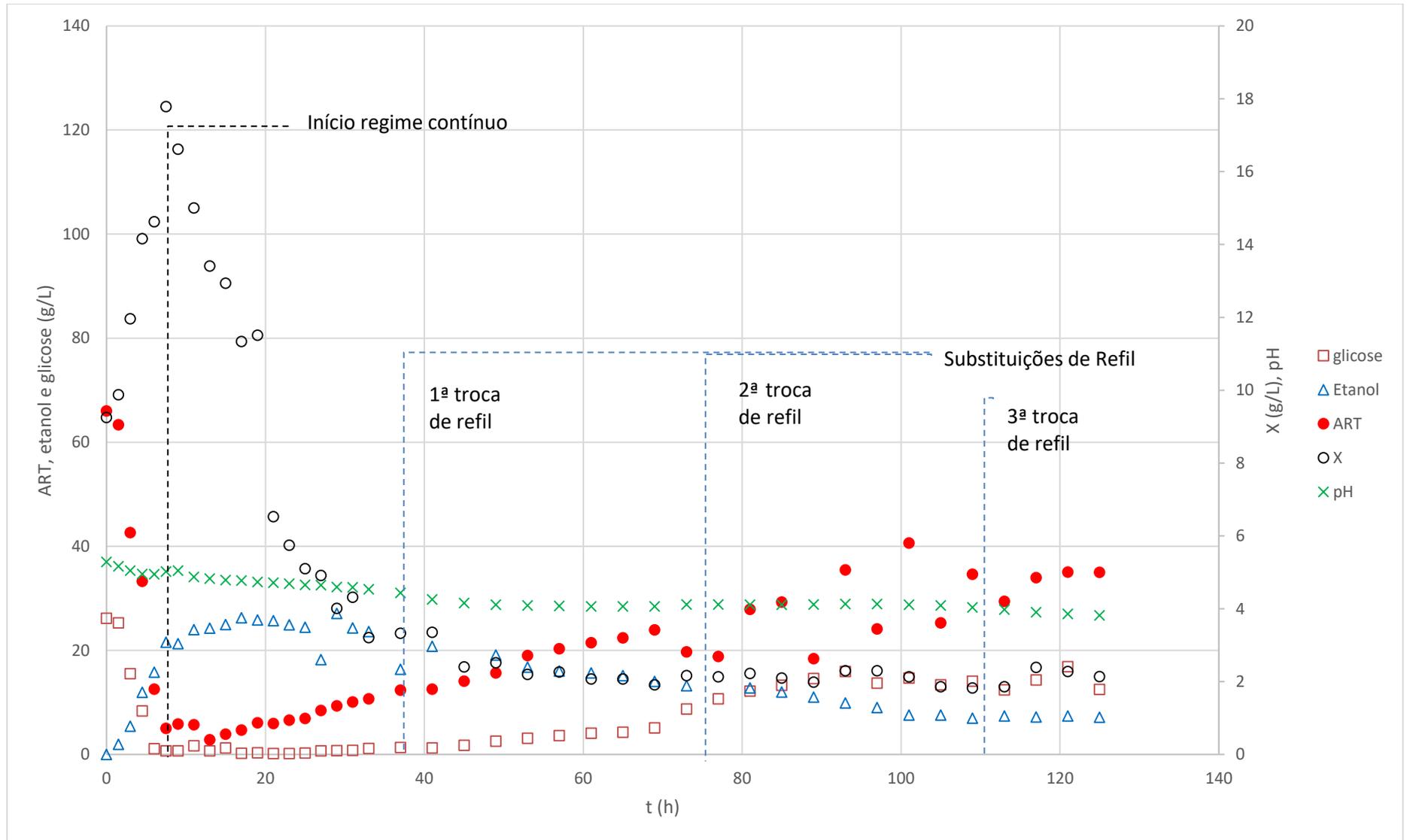


Figura 39 - Dados obtidos durante ensaio em regime contínuo com $D = 0,14 \text{ h}^{-1}$.

5.1.19. Ensaio em regime contínuo com $D = 0,080 \text{ h}^{-1}$ a $0,10 \text{ h}^{-1}$.

Considerando que no ensaio anterior a concentração de ART diminuiu muito rapidamente durante o período de fermentação optou-se por trabalhar com vazões menores, inicialmente de 1,45 mL/min ($D=0,87 \text{ h}^{-1}$), depois no decorrer do ensaio essa vazão foi alterada para 1,30 mL/min ($D=0,80 \text{ h}^{-1}$) e na parte final do ensaio trabalhou-se utilizando valores de vazão da ordem de 1,60 mL/min ($D=0,096 \text{ h}^{-1}$). Também alterou-se a concentração de células inicial (X_0) para 6 g/L em massa úmida no preparo do inóculo e o tempo de troca do regime descontínuo para o regime contínuo para 4,5 horas com objetivo de evitar a diminuição da concentração dos valores de ART como ocorrido no ensaio anterior durante a fase de cultivo.

Preparou-se o meio para este ensaio de acordo com o realizado para os ensaios anteriores, como descrito no item 5.3.2 e também optando pela utilização de centrifugação para separação dos flocos formados pela ação do polímero na etapa de clarificação do mel. Para este ensaio foram preparados 1 litro de meio clarificado a 100 g/L de substrato para o inóculo, 16,5 litros de meio a 70 g/L de S, 1,5 litros de meio à 150 g/L de S e 1,5 litros de meio contendo apenas frutose na concentração de 35 g/L.

A vazão inicial para o regime contínuo, foi mantida no período compreendido entre 4,5 e 80,5 horas, quando operou-se com a vazões na ordem de 1,41 mL/min. A vazão de alimentação (F), foi alterada as 80,5 horas para 1,3 mL/min e assim permaneceu até o instante de 104,5 horas, a partir do qual a vazão foi alterada para 1,60 mL/min, ocorrendo algumas flutuações nesta etapa.

Foram realizadas 4 substituições de refil neste ensaio, a primeira (51,5 h) e a segunda (93,5 h) com mel clarificado a 70 g/L. A terceira troca de refil (130 h) foi para o teste com mel clarificado mais concentrado, com concentração no valor de 150 g/L, com objetivo de verificar se um aumento da concentração de substrato na corrente de entrada poderia estabilizar valores superiores da concentração celular e de etanol e o último refil utilizado começou a ser utilizado as 163h, com 35 g/L de frutose.

Da amostra inicial (Figura 44), obteve-se os valores de 91,66 g/L para o ART e 39,07 g/L de glicose, que equivale a 42,62% dos açúcares. Observou-se que os valores de concentração de substrato na amostra inicial ficaram próximos do planejado de 100 g/L. No instante de 4,5 horas as concentrações de X, S e P eram de

respectivamente 11,31 g/L para células (massa úmida), 57,09 g/L de ART, 15,64 g/L de glicose e 13,69 g/L de etanol em solução. Neste mesmo instante de 4,5 horas iniciou-se o bombeamento de meio ao reator, dando início ao regime contínuo.

A concentração celular (X) após o início do regime contínuo, aumentou até as 20,5 horas, alcançando valores da ordem de 12,80 g/L, em massa úmida, diminuindo em seguida, até próximo à substituição de um novo refil de meio, onde os valores da concentração celular ficaram em torno de 4 g/L.

Após a mudança na vazão de alimentação de meio para 1,30 mL/min os valores da concentração celular num primeiro momento apresentaram comportamento de crescimento, mas que não se mantiveram, pois após a troca de refil em 93,5 horas observou-se novamente uma diminuição para valores entre 2,4 a 2,9 g/L.

Em 108 horas de cultivo aumentou-se a vazão de entrada de meio para 1,60 mL/min e no tempo de 111 horas ocorreu um acidente de entupimento que provocou redução no volume do reator. O entupimento foi solucionado e o volume restabelecido cessando a retirada de mosto por alguns minutos.

Para tentar recuperar a concentração de células no ensaio, optou-se por utilizar a estratégia de reciclar as células da corrente de saída do reator. Para tanto, utilizou-se células decantadas do frasco de coleta do meio fermentado, conforme mostra a Figura 40, fornecendo um primeiro pulso de células a aproximadamente 112 horas de cultivo, que de imediato restabeleceu a concentração celular para valores próximos a 4 g/L.



Figura 40 - Funil de separação contendo o mosto fermentado retirado do reator e as células decantadas.

As 130 horas do início do ensaio foi utilizado um meio clarificado na concentração de 150 g/L de substrato na corrente de entrada do reator. Com o aumento da concentração de substrato obteve-se recuperação na concentração de células chegando a valores próximos de 4 g/L em 134 horas.

Um novo pulso de células foi realizado as 137,5 horas de cultivo de modo a se observar o comportamento do crescimento celular em uma maior concentração de substrato disponível, mas com a mudança da concentração de substrato para 150 g/L obteve-se um aumento na concentração celular que não se sustentou, retornando ao valor de 4 g/L de concentração celular.

Por volta de 163 horas de fermentação introduziu-se uma nova alimentação no reator, constituída de uma solução de frutose pura a 35 g/L e novo pulso de células. Durante um período de aproximadamente seis horas alimentação da frutose, a concentração celular manteve-se em valores próximos de 6,6 g/L, porém também depois desse período apresentou novamente redução da concentração até o final do ensaio.

Em relação as concentrações de substrato (ART), conforme apresentado pelas curvas da Figura 44, verifica-se que estas se mantiveram nas primeiras 100 horas, em valores entre 8,5 a 13 g/L com valores de AR residuais em torno de 1 g/L.

As duas primeiras trocas de refil não afetaram a concentração dos substratos, apenas quando se utilizou o refil contendo meio com 150 g/L de ART, que fez com que se atingisse os valores de aproximadamente 60 g/L na corrente de saída por volta

das 137 horas de fermentação. Após 145 horas de ensaio retornou-se a alimentar o reator com a concentração de 70 g/L, diminuindo a concentração de ART até 22,58 g/L as 157 horas, que foi a última amostra antes da alimentação com frutose (163 h). Com alimentação de frutose a 35 g/L verificou-se na saída do reator concentração nula de glicose e redução nos valores de ART, que atingiram 5 g/L até o término do ensaio.

Quanto a variação da concentração de etanol ao longo da fermentação, também de acordo com a Figura 44, foi observado que no período compreendido entre as 12 e 48 horas se manteve em valores entre 35 e 45 g/L, sofrendo, contudo, redução desses valores após a utilização do novo meio de fermentação, mantendo-se em valores próximos a 20 g/L no período entre 72 e 104 horas.

Contudo, ocorreu uma redução nos valores de etanol após a mudança de vazão para 1,6 mL/min ocorrida as 108,5 horas que foi logo recuperada, retornando ao patamar de 20 g/L, que foi mantido até mesmo durante o uso do refil mais concentrado a 150 g/L, apresentando diminuição somente ao final do ensaio algumas horas após início da alimentação com frutose.

Quanto aos valores de pH para o ensaio (Figura 44), este foi de 5,45 no início do cultivo descontínuo e diminuiu para 5,05 o quando do início do regime contínuo. Até a substituição do primeiro refil de meio, o valor de pH já se encontrava em 4,43 e foi diminuindo lentamente até o término do ensaio, onde atingiu o valor de 3,83.

A vazão de alimentação (F) medida durante todo o ensaio está representada na Figura 41 com a sua taxa de diluição (D) correspondente. Observa-se que a vazão de alimentação apresentou algumas oscilações no decorrer do ensaio e seus valores mantiveram-se sempre entre 2,20 e 2,46 mL/min. As variações são decorrentes de correções que foram feitas de acordo com o nível de volume do reator, a fim de manter sempre o volume de trabalho do reator em 1 litro. Em média, levando-se em conta os pontos coletados durante todo o ensaio obteve-se uma vazão média (F) de 2,31 mL/min, que corresponde à uma taxa de diluição (D) de 0,138 h⁻¹.

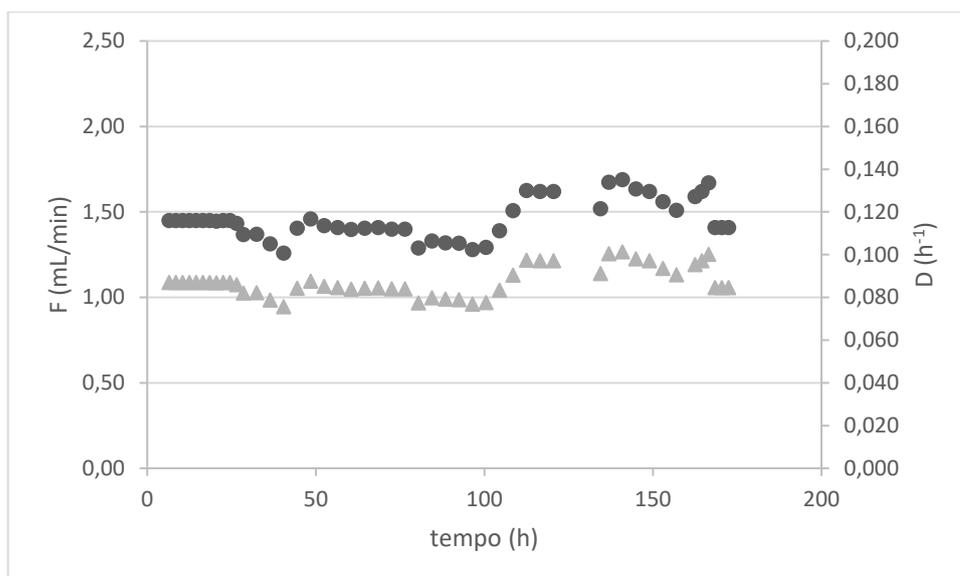


Figura 41 – Vazão (F) e taxa de diluição (D) em função do tempo (t) para o ensaio em regime contínuo com $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$ a $0,10 \text{ h}^{-1}$.

Com os dados obtidos nesse ensaio foi confeccionado o gráfico da produtividade em etanol (P.D) em função do tempo (Figura 42). A partir das curvas desse gráfico observa-se, no período compreendido entre 12,5 e 32,5 horas que os valores da produtividade em etanol se mantiveram entre 3,2 e 3,70 g/L.h. Após isto a produtividade em etanol diminui, acompanhando a redução da concentração de células até que no período de tempo compreendido entre 60,5 a 137 horas de fermentação se manteve em valores entre 1,44 a 1,90 g/L. A partir de 138 horas onde ocorreu o início da alimentação com mel na concentração de 150g/L, os valores da produtividade em etanol oscilaram entre 1,50 a 2,50 g_{etanol}/L.h até o término do ensaio.

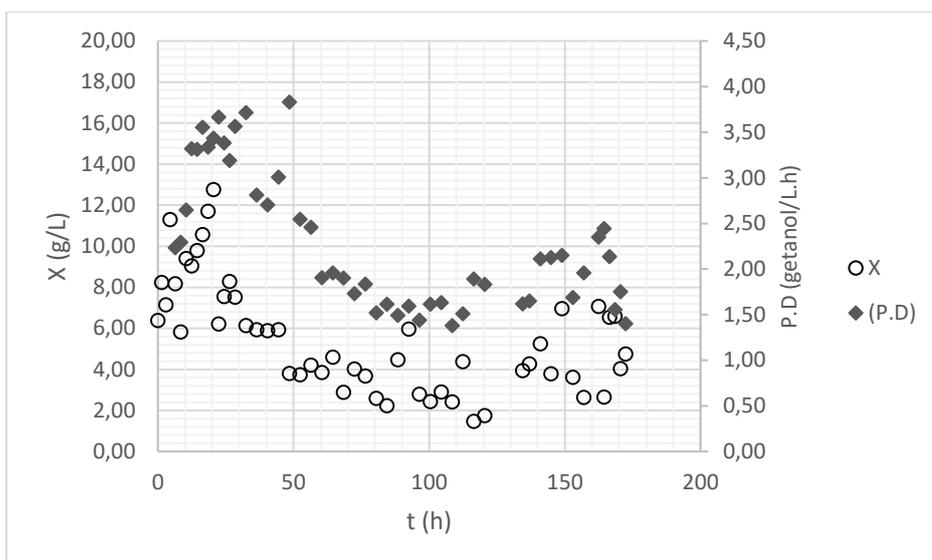


Figura 42- Produtividade (P.D) e concentração de células (X) em função do tempo (t) para ensaio em regime contínuo com $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$ a $0,10 \text{ h}^{-1}$.

Associadas à questão anterior, observa-se também, na Figura 43, que os dados de produtividade em etanol em função da taxa de diluição (D), variaram entre valores de $1,38 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{L.h}$ a $3,83 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{L.h}$, contudo durante o ensaio a taxa de diluição variou entre $0,076$ a $0,101 \text{ h}^{-1}$ pois trabalhou-se com 3 faixas de vazão ($1,3 \text{ mL}/\text{min}$; $1,4 \text{ mL}/\text{min}$; $1,6 \text{ mL}/\text{min}$). Fazendo-se a média, dos valores de produtividade e taxa de diluição para todas as amostras do ensaio, foram obtidos valores respectivamente $2,31 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{L.h}$ e $0,087 \text{ h}^{-1}$.

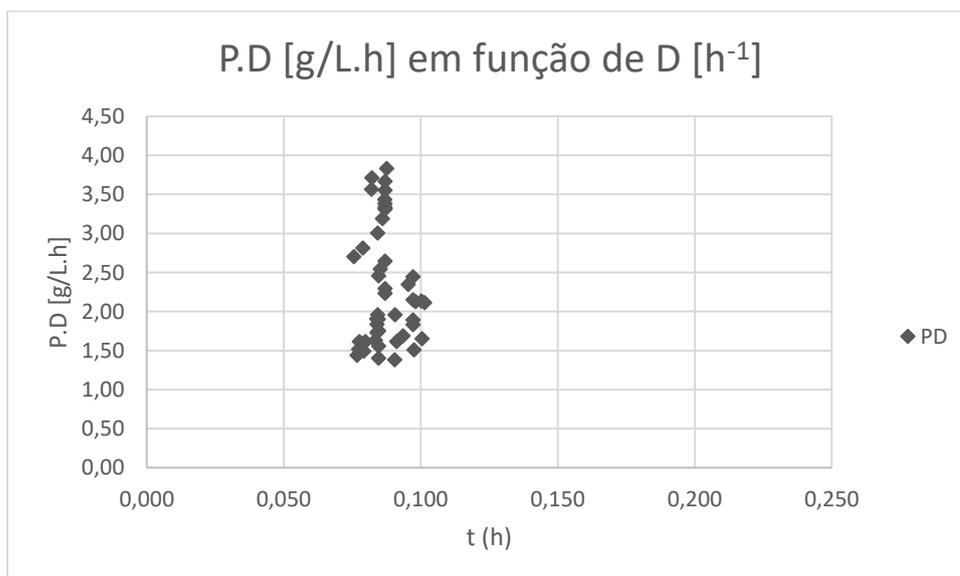


Figura 43 - Dados de produtividade em função da taxa de diluição para o ensaio em regime contínuo com $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$ a $0,10 \text{ h}^{-1}$.

Observa-se com auxílio da Figura 44 uma maior estabilidade na dinâmica do processo que nos ensaios anteriores, porém ainda se observou redução na concentração de células em suspensão. O uso de variação nas taxas de diluição provocou flutuação nos valores da concentração celular e mesmo com essas flutuações, obtiveram-se valores estáveis para concentração de etanol e substratos, com uma produtividade em etanol entre 1,50 e 2,00 $g_{\text{etanol}}/L.h$ no período compreendido entre 60 e 104 horas.

A concentração de glicose neste ensaio foi mantida praticamente nula desde o início da alimentação até o momento em que se utilizou a alimentação na concentração a 150 g/L, o que indica que praticamente toda glicose tão logo era alimentada foi consumida e somente com uma alimentação mais concentrada foi possível verificar uma maior concentração de glicose, com os valores não maiores que 20 g/L, indicando, portanto, a sobra desta fonte de carbono.

Neste ensaio observou-se que ao operar em taxas de diluição mais baixas, foi possível obter uma certa estabilidade para as variáveis X, S e P. Estas que apresentaram valores duas regiões de estabilidade conforme mostrado na Figura 44, sendo a primeira compreendida pelo período entre o início do regime contínuo (4,5 h) até o momento da primeira troca de refil (51,5h) e a segunda no período a partir desta primeira troca de refil até 120 horas de ensaio.

Ao variar a vazão de alimentação se observaram algumas flutuações na concentração de células próximas do momento em que a condição é alterada. Após a vazão (F) para 1,30 mL/min (80,5 h) ocorreram oscilações nas concentrações de células, ART e Etanol. As 100,5 horas a vazão (F) foi alterada para 1,60 mL/min que provocou aumento no valor de produtividade (Figura 47). Com o uso da alimentação concentrada, com 150 g/L de substrato, houve aumento na concentração de etanol e conseqüentemente aumento na produtividade próximo ao término do ensaio.

Com a utilização do meio contendo como fonte de carbono a frutose ao invés de glicose como os demais ensaios, verificou-se a manutenção da concentração celular em torno de 6,60 g/L com a utilização de células de leveduras recicladas. Porém, uma vez que não se conseguiu manter esta concentração estável, até o término do ensaio.

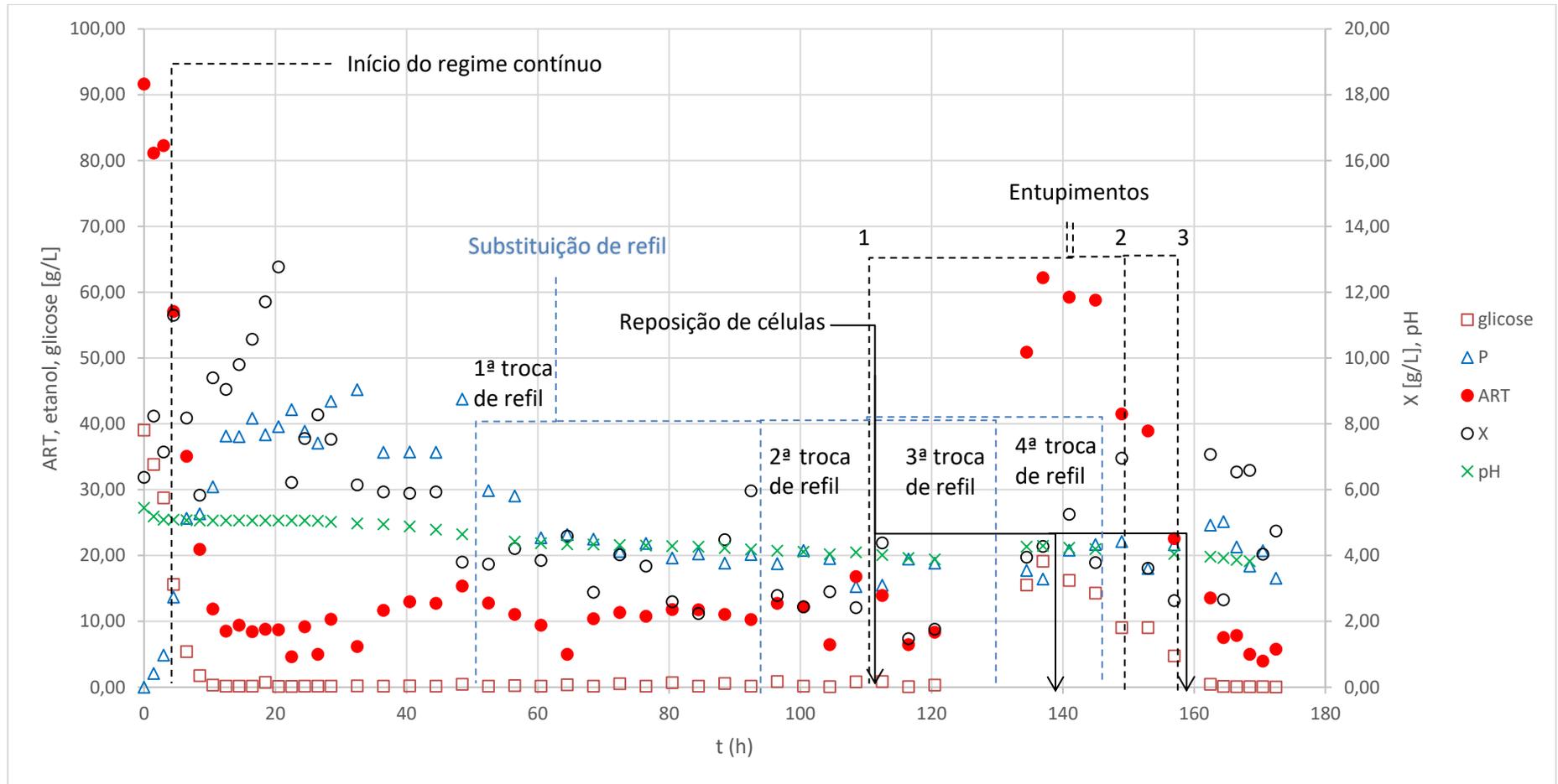


Figura 44 - Dados obtidos durante ensaio em regime contínuo com $D = 0,08 \text{ h}^{-1}$ a $0,10 \text{ h}^{-1}$.

A partir dos dados dos cultivos descontínuos para produção de células que precediam a etapa contínua de cada ensaio, teve-se que os ensaios iniciaram com concentrações diferentes de substrato inicial e massa celular úmida (Tabela 24). Todos os ensaios foram planejados para iniciar com substrato inicial de 100 g/L, porém acabaram com concentrações iniciais diferentes. Os ensaios 1 e 2 deveriam estar com aproximadamente 3 g/L de concentração inicial de células, verificando-se um desvio na concentração inicial de células do primeiro ensaio. Nos ensaios 3 e 4 foram utilizadas quantidades iniciais diferentes com objetivo de observar se ocorreria maior crescimento celular e melhora no comportamento durante a etapa contínua.

Tabela 24 - Dados de substrato e células inicial e final obtidos nas etapas descontínuas de cultivo dos ensaios fermentativos em regime contínuo 1, 2, 3 e 4.

Ensaio	1	2	3	4
S₀ [g/L]	121,34	110,14	66,04	91,66
S_f [g/L]	58,47	57,36	5,85	57,08
X₀ [g/L]	4,00	3,39	9,26	6,38
X_f [g/L]	7,68	10,33	16,62	11,3
Duração [h]	9	9	9	4,5

Calculou-se os rendimentos fermentativos de acordo com as equações 7, 8 e 9 para estes ensaios (Tabela 25) e observou-se que os ensaios 1 e 2 apresentaram rendimentos diferentes mesmo com condições iniciais próximas. O que indicou que no ensaio 1 pode ter ocorrido algum problema com a viabilidade do microrganismo. Comparando-se os ensaios 2, 3 e 4 verificou-se que foram obtidos rendimentos com valores próximos, com menos de 10% de diferença entre eles. Sendo o melhor resultado ocorrido na fermentação que precedeu o ensaio 4, com duração de 4,5 horas nesta etapa.

Tabela 25 - Dados de rendimentos fermentativos obtidos nas etapas descontínuas de cultivo dos ensaios fermentativos em regime contínuo 1, 2, 3 e 4.

Ensaio	1	2	3	4
Y_{x/s} [g_{células}/g_{substrato}]	0,059	0,131	0,122	0,142
Y_{p/x} [g_{etanol}/g_{células}]	5,033	2,871	2,892	2,781
Y_{p/s} [g_{etanol}/g_{substrato}]	0,294	0,377	0,354	0,396

As velocidades específicas da fermentação (Tabela 26) foram calculadas com as equações 3, 4 e 5. Comparando os valores de velocidade específica de produção de células com os ensaios descontínuos da seção 5.2.2. verificou-se que nos ensaios 1, 2, 3 e 4 desta seção não atingiram o valor de $\mu_{Xm\acute{a}x}$ de $0,21 \frac{g_{c\acute{e}lulas\ novas}}{g_{c\acute{e}lulas}h}$ que havia ocorrido na seção anterior, sendo o ensaio 4 o que chegou mais próximo, com $\mu_{Xm\acute{a}x}=0,187 \frac{g_{c\acute{e}lulas\ novas}}{g_{c\acute{e}lulas}h}$. Em relação aos valores de velocidade específica de produção de etanol, obtivemos nestes ensaios 1, 2, 3 e 4 valores maiores do que os atingidos nos ensaios descontínuos da seção anterior com quantidade de substrato inicial de 50 e 100 g/L, que foram da ordem de $0,30 \frac{g_{etanol}}{g_{c\acute{e}lulas}h}$ e $0,31 \frac{g_{etanol}}{g_{c\acute{e}lulas}h}$ e os ensaios 1, 2 e 4 obtiveram resultados melhores em velocidade específica de produção de etanol, sendo o 4º e o 2º ensaio os que obtiveram melhores resultados de μ_P .

Tabela 26 - Dados de velocidade específica de produção de células, substrato e etanol obtidos nas etapas descontínuas de cultivo dos ensaios fermentativos em regime contínuo 1, 2, 3 e 4.

Ensaio	1	2	3	4
$\mu_{Xm\acute{a}x}$ [g _{células novas} /g _{células} ·h]	0,136	0,135	0,116	0,187
μ_S [g _{substrato} /g _{células} ·h]	1,165	1,188	0,902	1,299
μ_P [g _{etanol} /g _{células} ·h]	0,365	0,448	0,215	0,569

Verificou-se que o uso de 6 g/L de células em 100 g/L de substrato com tempo de fermentação de 4,5 horas, fez com que se obtivesse melhores resultados em relação aos outros ensaios descontínuos desse trabalho para as velocidades específicas. Seria interessante explorar se utilizada essas mesmas condições iniciais em taxas de diluição mais elevadas, tais como as exploradas nos ensaios 2 e 3 se seria possível obter melhor estabilidade com observou-se no ensaio 4.

6. CONCLUSÕES

DA CLARIFICAÇÃO:

Em relação aos ensaios de clarificação do mel diluído se conclui primeiramente que os melhores resultados levaram a uma remoção de cor da ordem de 22% a 25%.

Conclui-se também que a clarificação efetuada no pH 7, portanto neutro, e utilizando os polímeros separadamente, aniônico ou catiônico, apresentou resultados de cerca 10% de remoção de cor e ainda que ao se utilizar a combinação dos polímeros na proporção de (15 ppm de polímero aniônico + 25 ppm de polímero catiônico) a clarificação foi de 24,53%.

Desses ensaios de clarificação se concluiu utilizar uma menor quantidade de polímeros visto que estes, ao possibilitar uma maior redução da coloração do mel diluído, poderiam levar a uma retirada substancial de nutrientes do meio fermentativo. Além disso se verificou, pelos resultados obtidos, também que há ainda a necessidade de uma maior investigação quantitativa da utilização dos polímeros tanto na clarificação do meio constituído por mel rico diluído quanto da perda de nutrientes existentes no mesmo, que poderiam influenciar negativamente a fermentação etanólica.

Conclui-se que a clarificação permitiu uma melhor leitura das células, pois obteve-se menor variância entre as absorbâncias e os valores lidos para as amostras iniciais dos ensaios foram próximos do estimado de acordo com a massa pesada no preparo dos inóculos.

DOS ENSAIOS EM REGIME DESCONTÍNUO:

Dos ensaios de fermentação em regime descontínuo realizados com substrato inicial de 33 g/L, 50 g/L e 70 g/L e concentração de células iniciais de 50 g/L em massa úmida, submetidos a combinações de polímeros catiônico a 25 ppm e polímero aniônico a 15 ppm, concluiu-se que a clarificação com polímeros em geral teve efeito positivo no processo fermentativo em relação aos ensaios em branco (sem clarificação) para cada condição de substrato inicial.

Concluiu-se também, dos estudos preliminares de clarificação, pela escolha da utilização do polímero catiônico na concentração de 25 ppm para cada 70 g/L de ART substrato no mel diluído, que os resultados foram bastante superiores em

relação às outras situações estudadas. Outro fator respalda essa conclusão foi a de que o uso desse agente clarificante dispensa a neutralização do pH do meio.

Dos ensaios em regime descontínuo se concluiu que as condições iniciais dos ensaios em regime contínuo, deveriam ser próximas às do ensaio conduzido a de 50 g/L de substrato, pois nesta condição obteve-se os valores de $\mu_x=0,21 \frac{g_{células\ novas}}{g_{células}h}$, $\mu_P=30 \frac{g_{etanol}}{g_{células}h}$ e $\mu_S=0,79 \frac{g_{substrato}}{g_{células}h}$ quando μ_x era máximo.

Quanto aos ensaios descontínuos utilizando polímero catiônico como agente clarificante, com concentração inicial de substrato (S_0), de 200g/L, verificou-se que o objetivo de se obter dados sobre o comportamento da cinética de fermentação com a condição de clarificação estabelecida foi alcançado, contudo verificou-se uma velocidade máxima de consumo de substrato praticamente o dobro daquela obtida no ensaio com concentração inicial de substrato (S_0), de 50g/L, o que levou a não utilização dessa última condição visto que dispensava maior concentração de substrato que correspondia as mesmas condições de fermentações conduzidas em menores concentrações iniciais de substrato.

DOS ENSAIOS EM REGIME CONTÍNUO:

Conclui-se dos cultivos de célula em regime descontínuo anaeróbio que antecederam os ensaios em regime contínuo, que o comportamento do microrganismo nestas fermentações não foi uniforme para todos os ensaios, visto que o cultivo do primeiro ensaio em regime contínuo forneceu rendimentos menores do que nos ensaios subsequentes.

Quanto aos quatro ensaios realizados em regime contínuo nas condições de taxa de diluição específica (D) de 0,087 h⁻¹, 0,10 h⁻¹, 0,13 h⁻¹, 0,14 h⁻¹ e se concluiu inicialmente que ocorreram acúmulo de açúcares redutores totais (ART) enquanto os valores de concentração de glicose se mantiveram baixos por um longo período de tempo, exceto no ensaio realizado a baixas taxas de diluição de 0,087 h⁻¹.

Concluiu-se também desses ensaios em regime contínuo, que era muito difícil manter a estabilidade do processo fermentativo, ora pela própria taxa de diluição imposta que arrastava meio não fermentado e células e apresentava ainda uma baixa conversão do substrato em produto (etanol), ora pelos acidentes ocorridos, como o entupimentos das mangueiras de alimentação de mosto e de retirada do mosto fermentado e ainda pela instabilidade que geralmente ocorria o quando da mudança de uma nova carga de alimentação.

Outrossim concluiu-se que após se verificar qualquer instabilidade no sistema, o intervalo de tempo, para que ocorresse nova estabilização era muito demorado, portanto não se conseguindo uma estabilidade adequada no processo fermentativo.

Conclui-se também que embora com pouca estabilidade, a fermentação em modo contínuo permitiu algumas avaliações, tais como a utilização de meios onde se administrou somente glicose ou frutose como fonte de carbono e mesmo em cultivos onde se avaliou o retorno de células de levedura pelo reciclo das mesmas na linha de alimentação.

Nos ensaios em regime contínuo verificou-se que a partir de cada troca de refil o comportamento do microrganismo sofria um impacto negativo na fermentação, com base nisto verifica-se a necessidade de estudar se ocorreram alterações no meio até o momento da troca de refil e a possibilidade de em ensaios futuros utilizar-se um reservatório maior de meio para dispensar substituições de refil de meio durante a fermentação.

Conclui-se que trabalhar com fermentações em regime de operação contínuo possibilitou o estudo do metabolismo dos microrganismos e verificar o impacto de perturbações, como aumento de concentração de substrato, alteração do substrato e alteração da vazão. Verificou-se também que ao realizar perturbações durante a fermentação em regime contínuo é recomendado testá-las por um período maior, pois nos ensaios realizados não foi possível reestabelecer a estabilidade no reator após modificações no meio e nas vazões.

7. . REFERÊNCIAS

ACORSI, R. L. **Estudo da Fermentação Alcoólica Descontínua de Mel Invertido**. Anais Eletrônicos... VIII EPCC (Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar), Unicesumar, Maringá, Brasil, 2013

ACORSI, R.L. **Estudo Cinético da Fermentação Alcoólica Descontínua de Mel Invertido**. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2012.

AIBA, S., HUMPHREY A. E., MILLIS N. F. **Biochemical Engineering**, 2d ed., University of Tokyo Press, 1973

ALBERTINI, S.; CARMO, L. F.; PRADO-FILHO, L. G. **Isotermas de adsorção de cádmio por *Saccharomyces cerevisiae***. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 21, n. 2, p. 134-138, 2001.

AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J. Infecção na fermentação: como evitá-la. **Álcool e Açúcar**, v. 2, n. 5, p. 12-18, 1982

AMORIM, H. V.; CAMPOS, H. **Molasses quality and ethanol yield in Brazilian factories**. Advances in Biotechnology, Toronto, v. 2, p. 201-206, 1980.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. McGraw-Hill Science, 2nd Edition, New York 1986.

BAZUA, C. D.; WILKE, C. R. **Ethanol effects on kinetics of a continuous fermentation with *Saccharomyces cerevisiae***. Biotechnology and Bioengineering Symposium No. 7, pp. 105-1118 (1977).

BORZANI, W., SCHMIDELL, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E. **Biotechnologia Industrial – Volume 1: Fundamentos**. São Paulo, Edgard Blucher, 2001

BORZANI, W.; FALCONE, M.; VAIRO, M. L. R. **Kinetics of the continuous alcoholic fermentation of blackstrap molasses**. Applied Microbiology, v. 8, n. 3, p. 136–140, 1960.

BOUALLAGUI, H.; TOUHAMI, Y.; HANAFI, N.; GHARIANI, A.; HAMDI, M. **Performances comparison between three technologies for continuous**

ethanol production from molasses. Biomass and Bioenergy, v. 48, p. 25–32, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.10.018>>.

BUENO, J. V. S. **Estudo cinético do crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* em mosto de mel invertido.** 2018. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2018.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação Descontínua Alimentada. In: BORZANI, W., SCHMIDELL, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial – Volume 2: Engenharia Bioquímica.** São Paulo, Edgard Blucher, 2001

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira: Cana-de-açúcar. Volume – 5 – Safra 2018/19 N°4.** 23 DE Abril de 2019. ISSN: 2318-7921

COONEY, C. L. **Continuous culture of microorganisms: an overview and perspective.** Annals of the New York Academy of Sciences, 326: 295-314. 1979.

COONEY C.L. **Continuous Culture: A Tool for Research, Development and Production.** In: Alani D.I.; Moo-Young M. (eds) Perspectives in Biotechnology and Applied Microbiology. Springer, Dordrecht. 1986.

D'AMORE, T. **Cambridge Prize Lecture Improving Yeast Fermentation Performance.** Journal of the Institute of Brewing, v. 98, n. 5, p. 375–382, 1992.

DE CARVALHO, J. C. M.; AQUARONE, E.; SATO, S.; BRAZZACH, M. L.; MORAES, D. A.; BORZANI, W. **Fed-batch alcoholic fermentation of sugar cane blackstrap molasses: influence of the feeding rate on yeast yield and productivity.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 38, n. 5, p. 596–598, 1993.

DE SOUZA, J. L. U.; MONTEIRO, R. A. **Fatores Interferentes Na Fermentação Alcoólica Para Produção De Etanol.** Revista Uberaba, v. 8, p. 100–107, 2011.

EMBRAPA. **Árvore do conhecimento: Cana-de-açúcar.** Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/cana_de_acucar.html> Acesso em: 15 dezembro 2017.

GREGORY, R. E. **Contribuição ao Estudo da Aplicação do Método Dinâmico ao Cultivo Contínuo de *Saccharomyces cerevisiae* em Mosto de Melaço**. 1974. 122 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade de São Paulo, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. São Paulo, 1974.

GUIDINI, C.Z. **Fermentação alcoólica em batelada alimentada empregando *Saccharomyces cerevisiae* de características floculantes**. 2013. 148 f. Tese (Doutorado em Engenharias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial – Volume 3: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo, Edgard Blucher, 2001

LOPES, C. H.; GABRIEL, A. V. M. D.; BORGES, M. T. M. R. – **Tecnologia Sucroalcooleira**, Coleção UAB–UFSCar. São Carlos 2011

MACHÍN, C.; ANTONIO, N.; CARRALERO, G.; AMARILYS, C.; RODRÍGUEZ, G. **Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol**. Revisión bibliográfica. Yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the production of alcohol. A Review. Revista ICIDCA. 50. 20-29. 2016.

MANDRO, J. L.; MAGRI, N. T. C.; DE SOUZA SARTORI, J. A.; DE AGUIAR, C. L. **Redução de cor ICUMSA em soluções concentradas de açúcar bruto por processo oxidativo com peróxido de hidrogênio**. Brazilian Journal of Food Technology, v. 20, 2017.

MANOCHIO C.; ANDRADE B. R.; RODRIGUEZ R. P.; MORAES. B. S. **Ethanol from biomass: A comparative overview**. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2017, vol. 80, issue C, 743-755

MENDONÇA, R. X. L. - **Estudo do tratamento do melaço na produção de etanol em fermentações descontínuas, descontínuas alimentadas**. 2018. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2018.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Portaria MAPA Nº 75 DE 05/03/2015**.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. **RENOVABIO Nota Explicativa sobre a Proposta de Criação da Política Nacional de Biocombustíveis**, 2017. Disponível em: <<http://www.mme.gov.br/documents/10584/32426543/RenovaBio+-+Nota+Explicativa/52ef58fa-ae4d-43d0-b5a4-c658e3660825?version=1.0>>

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). **Acordo de Paris**. SITE: <<http://www.mma.gov.br/clima/convencao-das-nacoes-unidas/acordo-de-paris>> Acesso em: 16 janeiro 2018.

MONOD, J. **Reserches sur la Croissance das Cultures Bacteriennes**. Hermann & Cie., Paris. 1942.

MORAES, M. L. De; BACCHI, M. R. P. **Etanol. Do início às fases atuais de produção**. Revista de Política Agrícola, v. 23, n. 4, p. 5–22, 2014.

MOULIN, G.; BOZE, H.; GALZY, P. **Inhibition of alcoholic fermentation by substrate and ethanol**. Biotechnology and Bioengineering, v. 22, n. 11, p. 2375–2381, 1980.

NAJAFPOUR, G. D. **Chapter 10 - Application of Fermentation Processes**. In: Biochemical Engineering and Biotechnology 2 ed. Waltham, MA. Elsevier, 2017. Cap.10, p. 329-344

OLIVO, J. E. **Efeito da Concentração Inicial de Microrganismos (*S. cerevisiae*) e da Recirculação de Células em Parâmetros Cinéticos de Processos Simultâneos de Sacarificação e Fermentação de Meios Preparados a Partir de Farinha de Raspa de Mandioca**. 1985. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, São Paulo, 1985.

PUBCHEM. **Ethanol, compound summary for CID 702**. site: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ethanol> (consultado 15/12/2017)

REIS, V. R.; BASSI, A. P. G.; DA SILVA, J. C. G.; CECCATO-ANTONINI, S. R. **Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts exhibiting rough colonies and pseudohyphal morphology with respect to alcoholic fermentation**. Brazilian Journal of Microbiology, v. 44, n. 4, p. 1121–1131, 2013.

RENEWABLE FUEL ASSOCIATION (RFA). **Annual World Fuel Ethanol Production (Mil. Gal.)** Disponível em <<https://ethanolrfa.org/statistics/annual-ethanol-production/>> Acesso em: 11/02/2019.

SCHMIDELL, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial – Volume 2: Engenharia Bioquímica**. São Paulo, Edgard Blucher, 2001

UDOP. **Resolução Nº19 (ANP) – Especificações do etanol**. Disponível em <https://www.udop.com.br/download/legislacao/comercializacao/institucional_site_juridico/res_19_2015_republicacao_especificacoes_etanol.pdf> Acesso em: 11/02/2019.

SAHA, K.; MAHARANA, A.; SIKDER, J.; CHAKRABORTY, S.; CURCIO, S.; DRIOLI, E. **Continuous production of bioethanol from sugarcane bagasse and downstream purification using membrane integrated bioreactor**. *Catalysis Today*, p. 68–77, 2019. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0920586117308106>>.

SANTOS, F.; DIOLA, V. **Physiology** in: SANTOS, F.; BORÉM, A.; CALDAS, C. **Sugarcane – Agricultural Production, Bioenergy, and Ethanol**. Chapter 2. Elsevier 2015.

SILVA, F. H. **Cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* em processos descontínuo e descontínuo alimentado utilizando mel invertido para produção de etanol**. 2016. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2016.

SILVA, J. A.; DA SILVA, F. L. H.; DA NÓBREGA ALVES, R. R.; DE SANTANA, D. P. **Influência das variáveis nitrogênio, fósforo e °Brix na produção dos metabólitos secundários contaminantes totais da fermentação alcoólica**. *Quimica Nova*, v. 29, n. 4, p. 695–698, 2006.

SUCRANA. **Tabela de densidade de soluções açucaradas**. Disponível em <<http://www.sucrana.com.br/tabelas/densidade-solucoes-acucaradas.pdf>>.

SUMNER, J. B. **Dinitrosalicylic Acid: A Reagent for the Estimation of Sugar in Normal and Diabetic Urine**. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 47, p. 5- 9, 1921.

TAN, L.; SUN, Z. Y.; OKAMOTO, S.; TAKAKI, M.; TANG, Y. Q.; MORIMURA, S.; KIDA, K. **Production of ethanol from raw juice and thick juice of sugar beet by continuous ethanol fermentation with flocculating yeast strain KF-7.** Biomass and Bioenergy, v. 81, p. 265–272, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.07.019>>.

TAYLOR, F.; KURANTZ, M. J.; GOLDBERG, N.; CRAIG, J. C. **Kinetics of continuous fermentation and stripping of ethanol.** Biotechnology Letters, v. 20, n. 1, p. 67–72, 1998.

UNIÃO DOS PRODUTORES DE BIOENERGIA (UDOP). **ESPECIFICAÇÕES DO ETANOL DE ACORDO COM A ANP.** SITE:<http://www.udop.com.br/download/legislacao/comercializacao/institucional_site_juridico/res_19_2015_republicacao_especificacoes_etanol.pdf> Acesso em: 16 dezembro 2017.

VASCONCELOS, J. N.; LOPES, C. E.; DE FRANÇA, F. P. **Continuous ethanol production using yeast immobilized on sugar-cane stalks.** Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 21, n. 3, p. 357–365, 2004.

VIEGAS, M. C.; ANDRIETTA, S. R.; ANDRIETTA, M. G. S. **Use of tower reactors for continuous ethanol production.** Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 19, n. 2, p. 167–173, 2002.

YAMAKAWA, C. K.; ATALA, D. I. P.; AMBROSIO, W. B.; NOLASCO JUNIOR, J.; ROSSELL, C. E. V. **Assessment of VHG (Very High Gravity) ethanol fermentation in continuous multistage with cell recovery , reactivation and recycling using a blend of juice and molasses from sugarcane as raw material.** Sugar Industry, v. 4, n. 0, p. 212–213, 2017.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. **Tecnologia de Imobilização de Células e Enzimas Aplicada à Produção de Álcool de Biomassas.** Relatório nº 2, junho/87, pp, 315-321, 1987.

Apêndice A – Preparo de soluções

A.1. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE UREIA

Pesar 8,08 g de ureia (pureza mínima 99%) e transferir com auxílio de água destilada para um balão volumétrico de 200 mL, completando-se o balão em seguida com água destilada, homogeneizando-se bem a solução. Transferir a solução para um erlenmeyer de meio litro;

A.2. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE FOSFATO

Colocar 10 gramas de fosfato (adubo) em um erlenmeyer de 500 mL e inserir em seguida 100 mL de água destilada. O fosfato está em excesso na solução, logo ficando precipitado em parte no fundo do erlenmeyer, e sua solubilidade máxima é próxima de 100 g/L;

A.3. PREPARO DAS SOLUÇÕES DE NUTRIENTES

É recomendado preparar soluções concentradas dos nutrientes, pois assim evita-se a necessidade de preparar uma nova solução de nutriente a cada ensaio, assim pode-se utilizar um mesmo preparo para vários ensaios. Para realizar o preparo dos nutrientes, de acordo com Silva (2016), prepara-se uma solução concentrada a 117 g/L de Fosfato de Potássio Monobásico e uma de 50 g/L de ureia.

Posteriormente, ao realizar um ensaio, faz-se então a diluição em 1:100 destas soluções previamente preparadas para utilizar cerca de 40 mL de cada solução durante a fermentação.

Primeiramente, em um béquer pequeno, pesar com auxílio de uma balança analítica 10 g de uréia e dissolver com água destilada para em seguida depositar em um balão volumétrico de 200 mL com auxílio de um funil de vidro, depois agitar até a ureia se dissolver completamente e completar o volume do balão.

Para a solução de fosfato de potássio monobásico, pesa-se, com auxílio de uma balança analítica, 23,4 g de fosfato de potássio monobásico e dissolve-se o composto utilizando-se um agitador magnético com aquecimento, pois é altamente insolúvel. Após dissolver parcialmente, transferir a um balão de 200 mL com auxílio de um funil de vidro e completar com água destilada.

Apêndice B – Metodologias

B.1. OPERAÇÃO DE MICRODESTILADOR TECNAL TE-012



Figura 45 - Representação do microdestilador Tecnal-TE-012. Fonte: <http://tecnal.com.br/>

Antes de utilizar: Verificar o nível de água na caldeira do equipamento, se necessário completar com água (pode ser da torneira), através da boca de alimentação próxima a V3 e ligar a torneira (sempre deve estar ligada para utilização do equipamento). OBS: Atentar ao nível para não ultrapassar o nível máximo de operação do aparelho e lembrar de fechar V3 antes de ligar o aparelho. Ligar o aparelho (colocar na tomada, ligar a chave e checar o led) e colocar no nível 10 de temperatura.

Após início da ebulição no balão, zerar o nível da temperatura.

Limpeza:

Colocar água no amostrador (recipiente próximo a V1).

Ligar o equipamento no nível 6-7 de aquecimento e aguardar a ebulição.

Após a água do balão iniciar a ebulição abrir a válvula (V1) do amostrador até esgotar o líquido no recipiente e fechá-lo logo em seguida.

Esperar sair até aproximadamente 10 mL de água do condensador já é suficiente para limpeza do aparelho.

Zerar o nível da temperatura e abrir a válvula V2 para esgotar o recipiente intermediário.

Agora o equipamento está pronto para ser utilizado com a amostra do experimento.

Destilação de amostra:

Colocar com auxílio de uma pipeta um volume definido da amostra no amostrador (recipiente próximo a V1)

Ligar o aparelho no nível 6-7 e aguardar a água da caldeira entrar em ebulição.

Abrir V1 até esgotar a amostra e fechá-la em seguida.

Aguardar até sair no condensador do equipamento, um valor próximo (um pouco abaixo) da quantidade adicionada no amostrador, coletando-se a saída com uma proveta (10mL).

Zerar o nível da temperatura e abrir V2 para esgotar a amostra no fervedor. Lembrar de fechar logo em seguida V2 e proceder novamente para as etapas de limpeza após cada amostra.

B.2. OPERAÇÃO DO MICRODESTILADOR DE VIDRO

Para uso do microdestilador, primeiramente deve-se completar a caldeira com água destilada e ligar a torneira onde está acoplada a mangueira que alimenta o condensador do equipamento. Posicionar um béquer para coletar o condensado na saída do condensador.

Inicialmente deve-se ligar o equipamento à energia e ajustar sua temperatura para 220 °C no medidor até a água presente na caldeira entrar em ebulição. No momento que a água da caldeira entrar em ebulição, reduzir a temperatura para 0 no medidor, desligando assim a resistência do destilador.

Antes de começar a injetar amostras, deve-se pré-lavar o equipamento, então, adiciona-se água destilada no amostrador e ajustar a temperatura até 140 °C. Quando for visível que o vapor está empurrando água para o percurso da destilação até o condensador, abrir a válvula do amostrador até que toda água caia no reservatório interno do destilador, em seguida fechar a válvula do amostrador

para evitar perder vapor por esta via. Em seguida aumenta-se a temperatura até 180 °C e aguardar coletar ao menos 20 mL de água.

A injeção de amostras no microdestilador é feita utilizando-se uma pipeta automática para transferir uma quantidade conhecida da amostra ao equipamento. Após colocar uma certa quantidade da amostra no amostrador do destilador, liga-se a resistência na temperatura 140 °C e aguarda-se a ebulição para então, em seguida abrir a válvula do amostrador e adicionar um pouco de água para garantir-se que não se perda etanol das amostras. Após verificar que não resta amostra no amostrador do equipamento, aumentar a temperatura para 180 °C e deixar uma proveta para coletar a quantidade de amostra injetada na saída do destilador.

Após a coleta da quantidade injetada de material, zerar o ajuste da temperatura para que a água na caldeira pare de ferver e abrir a torneira ligada ao vácuo do equipamento e abrir a válvula de saída para o vácuo no corpo do destilador. Após a amostra ser retirada, segue-se então para novas etapas de lavagem e destilação até que o nível da água fique próximo da resistência. Neste caso é recomendado esperar o equipamento esfriar para reencher a água da caldeira.

Após o uso do equipamento para desligar, deve-se lavá-lo primeiramente, depois zerar o ajuste de temperatura, fechar todas as torneiras e retirar o equipamento da tomada.

B.3. OPERAÇÃO DO CROMATÓGRAFO

Preparo do cromatógrafo:

Abrir a válvula do tanque de Hélio (tanque vermelho do meio, Figura 46) até a pressão no manômetro esquerdo atingir 40 psi (marcado com risco preto, Figura 47).



Figura 46 - Cilindros de gases do cromatógrafo.



Figura 47 - Manômetros da saída de gás dos cilindros para o cromatógrafo.

1. Ligar o estabilizador (atrás). Na frente, o botão deve ficar em “estabiliza” e deve acender o led verde.
2. Ligar o cromatógrafo (atrás). Ao piscar o led com mensagem de erro no display, pressionar reset.

3. Pressionar Status e Column. Aparece no display COL 35°C (p. ex.) SET 35°C. Se o SET estiver maior que 35, passar para 35: pressionar Build/modify e Column, então digitar 35 e Enter.
4. Pressionar GC configure e então Enter 4 vezes até aparecer "Turn hardware on-off NO". Pressionar Yes e Enter.
5. No display aparece "Detector A ON? NO". Se estiver YES, pressionar NO e Enter. Se já estiver NO, pressionar só Enter.
6. No display aparece "Detector B ON? NO". Se estiver YES, pressionar NO e Enter.
7. Pressionar Status para sair do GC configure.
8. Ajustar temperatura do injetor e detector (se necessário):
Pressionar Build/modify e Injector: Se o SET estiver 120, OK. Se não, digitar 120 e Enter (ou outra temperatura que seja requerida).
Pressionar Build/modify e Detector: se o SET estiver 150, OK. Se não, digitar 150 e Enter (ou outra temperatura que seja requerida).
9. Pressionar Status.
10. Quando injetor e detector atingirem as temperaturas, abrir os gases.
11. Programar a temperatura da coluna: Pressionar Build/modify e Column, então digitar 100 (para etanol) e Enter. Entrar o tempo que vai ficar nesta temperatura.
12. Ligar o filamento do detector: Repetir passos 4 e 5, mas digitando YES e Enter. Fazer isso apenas para o detector A (TCD). Não colocar YES no detector B(FID). Pressionar Status para sair do GC configure.
13. Verificar Status Detector: com a seta à direita pode-se verificar os parâmetros. O sinal da baseline deve estar entre -2 e +2.
14. Ligar o computador e abrir o software Star toolbar (software do cromatógrafo).
15. Na barra superior do software, clicar no ícone do canto superior esquerdo (system control). Esperar até a tela 0800.80 – Ready, com os eixos para o cromatograma (mVolts x minutes).
16. Para injeção da amostra: Menu Inject, escolher Inject single sample (ou ícone com o vial).
Digitar o nome da amostra e clicar em Inject. Quando aparecer waiting pode-se injetar a amostra. Ao pressionar o injetor com a seringa, o cromatógrafo entra em run, e o software inicia automaticamente. Se o cromatógrafo não entrar em run, pressionar start imediatamente.

17. Salvar a análise: Ao terminar a análise, clicar na barra superior onde tem o .run e escolher Print standard report. Salvar o primeiro pdf (que vai ser o cromatogram) e depois o segundo (que dará as porcentagens e os cálculos das áreas) com outro nome.
18. Para desligar o sistema: Fechar o programa e desligar o computador.
Desligar o detector repetindo os passos 4 e 5.
Baixar a temperatura da coluna para 35°C: Pressionar Build/modify e Column, então digitar 35 e Enter.
Pressionar Status para acompanhar a temperatura. Quando estiver abaixo de 40°C, desligar o cromatógrafo e o estabilizador.
Fechar os gases: O registro vermelho, o regulador e a válvula do cilindro.

Apêndice C – Curvas padrão para as análises

C.1. CURVA PADRÃO DE CONCENTRAÇÃO CELULAR EM MASSA ÚMIDA

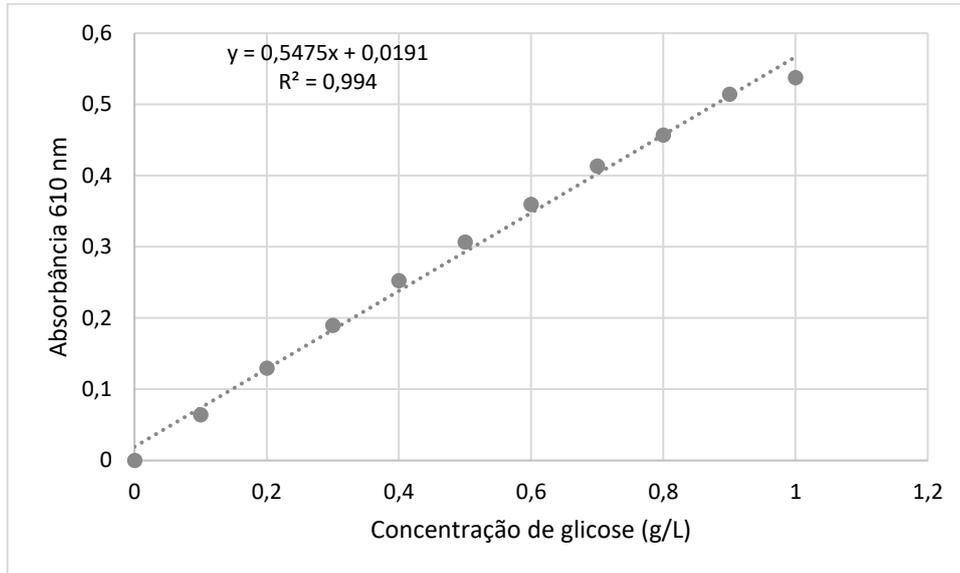


Figura 48 - Curva Padrão da análise de concentração de massa celular úmida.

C.2. CURVA PADRÃO PARA ANÁLISE DNS

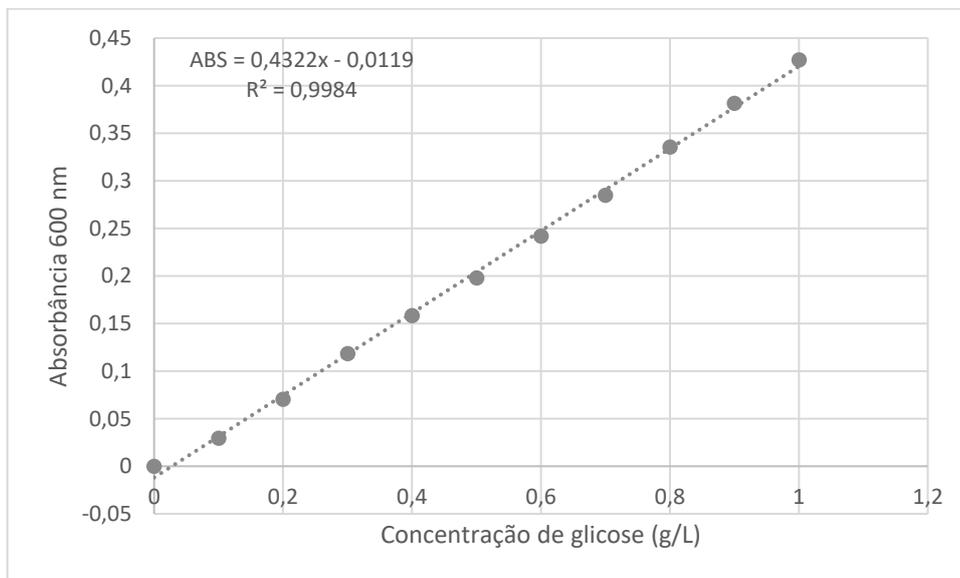


Figura 49 - Curva Padrão da análise DNS.

C.3. CURVA PADRÃO PARA ANÁLISE GOP-PAP

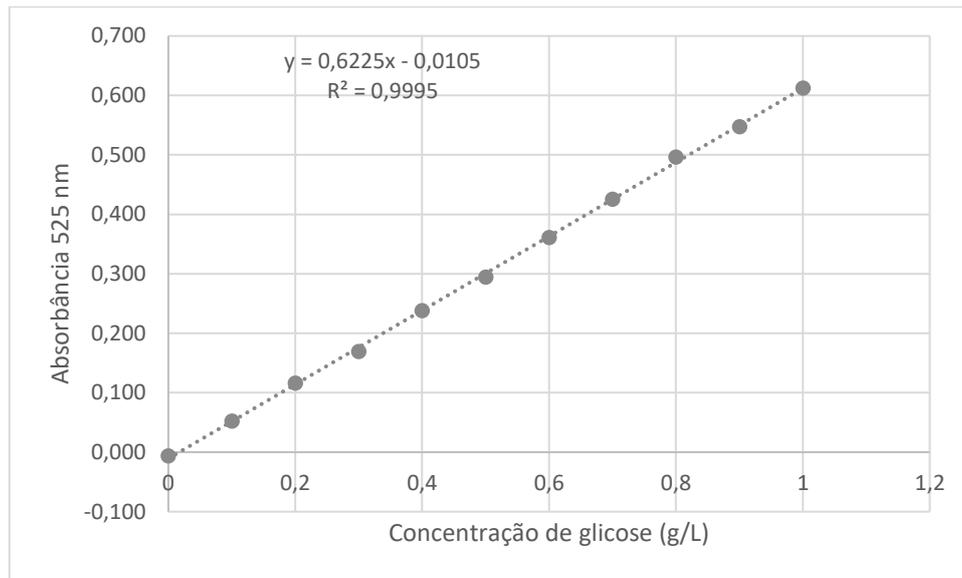


Figura 50 - Curva Padrão da análise GOD-PAP.

Apêndice D – Dados obtidos nos ensaios fermentativos

D.1. DADOS DO ENSAIO EM REGIME CONTÍNUO COM $D = 0,1 \text{ H}^{-1}$

Tabela 27 - Valores de pH, agitação do eixo do reator, vazão de retirada de meio do reator e concentrações celular em base úmida (X), de açúcares redutores totais (ART), glicose e etanol expressas em g/L para o ensaio realizado a 32°C e planejado com taxa de diluição $D = 0,10 \text{ h}^{-1}$.

Amostra	t (h)	X (g/L)	ART (g/L)	Glicose (g/L)	P (g/L)	pH	Agitação	Vazão saída (mL/min)
0	0	4,00	121,34	53,49	0,00	5,25	180	
1	1,5	4,19	114,34	48,88	0,65	5,15	180	
2	3	5,12	115,60	48,45	2,10	5,09	180	
3	4,5	5,37	107,76	43,95	4,56	5,06	210	
4	6	6,46	100,34	36,63	8,10	4,96	210	
5	7,5	8,56	78,64	25,65	13,29	4,98	180	
6	9	7,68	58,47	16,27	18,51	5,01	180	
7	11	11,04	40,01	8,29	22,77	5,05	180	1,66
8	13	8,30	23,47	3,69	30,91	5,03	180	1,66
9	15	9,76	10,52	1,10	33,90	5,04	180	1,66
10	17	10,20	7,90	0,29	30,50	5,07	180	1,66
11	19	10,10	5,51	0,19	32,23	5,03	210	1,86
12	21	11,34	5,14	0,17	27,70	5,03	180	1,76
13	23	9,84	6,12	0,18	26,37	5,06	210	1,76
14	25	11,32	5,04	0,22	26,12	4,90	240	1,72
15	27	8,62	5,14	0,17	28,03	4,90	240	1,70
16	29	9,52	5,61	0,18	26,71	4,85	240	1,68
17	31	8,09	5,00	0,18	26,33	4,71	240	1,66
18	33	8,79	5,84	0,24	24,30	4,63	180	1,64
19	35	8,21	5,84	0,13	24,01	4,59	270	1,88
20	39	9,01	5,87	0,14	25,51	4,51	240	1,74
21	43	6,03	4,39	0,16	20,60	4,51	270	1,70
22	47	5,43	9,47	0,77	18,74	4,27	270	1,69
23	51	6,17	13,07	1,76	20,34	4,25	270	1,81
24	55	4,80	16,25	2,43	19,69	4,21	270	1,80
25	59	4,90	18,68	2,39	18,74	4,20	270	1,71
26	63	5,04	20,35	2,45	16,56	4,19	240	1,81
27	67	4,51	25,70	2,31	17,26	4,19	240	1,80
28	71	5,10	25,22	2,32	17,99	4,19	240	1,81
29	75	4,87	21,52	2,36	18,73	4,21	240	1,84
30	79	4,63	30,77	2,37	16,73	4,15	240	1,84
31	83	4,80	22,38	2,34	18,12	4,15	240	1,82
32	87	4,29	31,25	2,32	15,91	4,15	240	1,82
33	91	4,13	31,58	2,34	15,41	4,24	240	1,84
34	95	4,20	29,35	2,34	15,45	4,20	180	1,84

Tabela 27 – continuação – Valores de pH, agitação do eixo do reator, vazão de retirada de meio do reator e concentrações celular em base úmida (X), de açúcares redutores totais (ART), glicose e etanol expressos em g/L para o ensaio realizado a 32°C e planejado com taxa de diluição $D = 0,10 \text{ h}^{-1}$.

Amostra	t (h)	X (g/L)	ART (g/L)	Glicose (g/L)	P (g/L)	pH	Agitação	Vazão saída (mL/min)
35	99	3,89	39,27	15,17	15,03	4,17	240	1,72
36	103	4,07	49,18	14,41	15,20	4,17	240	1,72
37	107	3,86	55,30	14,51	14,32	4,21	240	1,82
38	111	3,63	65,64	14,90	13,60	4,21	240	1,82
39	115	3,38	60,85		13,30	4,21	240	1,82

D.2. DADOS DO ENSAIO EM REGIME CONTÍNUO COM $D = 0,13 \text{ h}^{-1}$

Tabela 28 - Valores de pH, agitação do eixo do reator, vazão de retirada de meio do reator e concentrações celular em base úmida (X), de açúcares redutores totais (ART), glicose e etanol expressos em g/L para o ensaio realizado a 32°C e planejado com taxa de diluição $D = 0,13 \text{ h}^{-1}$.

Amostra	t (h)	X (g/L)	ART (g/L)	Glicose (g/L)	P (g/L)	pH	Agitação (rpm)	Vazão saída (mL/min)
0	0	3,39	110,14	46,81	0,29	5,33	180	
1	1,5	3,82	109,58	46,65	0,68	5,30	180	
2	3	4,37	107,90	42,04	2,20	5,25	180	
3	4,5	5,53	95,86	36,84	4,37	5,23	180	
4	6	7,39	88,44	30,22	8,95	5,15	180	
5	7,5	8,59	73,60	19,50	14,11	5,13	180	
6	9	10,33	57,36	15,12	20,21	5,15	180	
7	11	12,39	40,43	5,90	25,62	5,20	180	2,20
8	13	10,85	52,21	4,73	28,22	5,23	180	2,19
9	15	11,30	36,94	1,42	30,70	5,20	180	2,17
10	17	11,44	15,18	1,23	29,16	5,27	180	2,33
11	19	10,35	12,90	1,23	28,48	5,23	180	2,33
12	21	11,36	11,83	1,70	28,45	5,17	180	2,37
13	23	11,10	11,63	1,40	28,03	5,17	180	2,33
14	25	10,87	12,14	1,28	25,19	5,17	180	2,18
15	27	11,25	12,26	1,33	25,63	5,15	180	2,18
16	29	11,47	11,05	1,54	24,53	5,07	180	2,07
17	31	10,30	11,88	1,41	25,41	5,03	180	2,00
18	33	7,37	9,66	1,14	24,71	4,92	180	1,98
19	37	8,04	11,17	0,76	25,30	4,67	180	2,17
20	41	8,04	9,30	0,98	22,72	4,52	180	2,16
21	45	7,53	12,53	0,94	21,39	4,42	180	2,17
22	49	6,58	19,41	1,55	20,71	4,40	180	2,16
23	53	5,80	16,49	3,34	19,26	4,31	180	2,14
24	57	6,02	18,21	4,55	17,19	4,27	180	2,13

Tabela 28 - continuação - Valores de pH, agitação do eixo do reator, vazão de retirada de meio do reator e concentrações celular em base úmida (X), de açúcares redutores totais (ART), glicose e etanol expressos em g/L para o ensaio realizado a 32°C e planejado com taxa de diluição $D = 0,13 \text{ h}^{-1}$.

Amostra	t (h)	X (g/L)	ART (g/L)	Glicose (g/L)	P (g/L)	pH	Agitação (rpm)	Vazão saída (mL/min)
25	61	5,30	20,97	5,31	16,88	4,24	180	2,14
26	65	4,87	21,83	6,33	14,06	4,23	180	2,36
27	69	4,02	26,24	8,14	12,98	4,23	180	2,05
28	73	4,42	27,68	7,63	7,07	4,40	180	2,13
29	77	4,22	28,75	8,96	12,72	4,50	180	2,13
30	81	4,13	30,01	9,58	10,38	4,22	180	2,11
31	85	3,60	35,32	12,37	11,51	4,23	180	2,10
32	89	3,95	36,42	12,28	10,98	4,22	180	2,23
33	93	4,15	38,98	12,11	11,81	4,23	180	2,23
34	97	3,16	37,22	11,57	9,60	4,30	180	2,12
35	101	2,39	37,22	13,44	10,40	4,32	180	2,01
36	105	2,86	43,06	12,81	7,42	4,34	180	2,00
37	109	3,01	47,28	14,35	9,69	4,33	180	2,13
38	113	3,08	47,72	16,12	9,76	4,35	180	2,06
39	117	2,88	48,34	15,74	9,08	4,26	180	2,17
40	121	2,03	35,50	19,82	7,90	4,24	180	2,18
41	125	2,24	25,83	18,30	7,57	4,15	180	2,18
42	129	2,02	16,42	14,74	7,66	4,16	180	2,40
43	133	1,82	14,58	12,97	7,55		180	2,40

D.3. DADOS DO ENSAIO EM REGIME CONTÍNUO COM $D = 0,14 \text{ h}^{-1}$

Tabela 29 - Valores de pH, agitação do eixo do reator, vazão de retirada de meio do reator e concentrações celular em base úmida (X), de açúcares redutores totais (ART), glicose e etanol expressos em g/L para o ensaio realizado a 32°C e planejado com taxa de diluição $D = 0,14 \text{ h}^{-1}$.

Amostra	t (h)	X (g/L)	ART (g/L)	Glicose (g/L)	P (g/L)	pH	Agitação (rpm)	Vazão saída (mL/min)
0	0	9,26	66,04	26,19	0,00	5,29	180	
1	1,5	9,88	63,38	25,29	1,98	5,17	180	
2	3	11,96	42,67	15,53	5,46	5,05	180	
3	4,5	14,16	33,29	8,38	11,96	4,96	180	
4	6	14,63	12,57	1,11	15,83	4,95	180	
5	7,5	17,79	5,01	0,69	21,59	5,02	180	
6	9	16,62	5,85	0,69	21,29	5,05	180	
7	11	15,01	5,71	1,67	24,01	4,88	180	2,23
8	13	13,41	2,84	0,72	24,29	4,83	180	2,20
9	15	12,94	3,93	1,27	24,99	4,79	180	2,34
10	17	11,34	4,71	0,23	26,26	4,78	180	2,40

Tabela 29 – continuação - Valores de pH, agitação do eixo do reator, vazão de retirada de meio do reator e concentrações celular em base úmida (X), de açúcares redutores totais (ART), glicose e etanol expressos em g/L para o ensaio realizado a 32°C e planejado com taxa de diluição $D = 0,14 \text{ h}^{-1}$.

Amostra	t (h)	X (g/L)	ART (g/L)	Glicose (g/L)	P (g/L)	pH	Agitação (rpm)	Vazão saída (mL/min)
11	19	11,51	6,09	0,33	25,88	4,74	180	2,32
12	21	6,53	5,98	0,19	25,74	4,72	180	2,24
13	23	5,74	6,61	0,20	24,94	4,69	180	2,26
14	25	5,11	6,92	0,28	24,45	4,66	180	2,46
15	27	4,92	8,47	0,73	18,24	4,65	180	2,30
16	29	4,02	9,36	0,75	27,10	4,60	180	2,31
17	31	4,32	10,10	0,80	24,31	4,59	180	2,38
18	33	3,21	10,71	1,17	23,63	4,54	180	1,92
19	37	3,33	12,39	1,38	16,36	4,44	180	2,22
20	41	3,36	12,57	1,28	20,81	4,26	180	2,35
21	45	2,40	14,12	1,78	19,91	4,16	180	2,34
22	49	2,52	15,67	2,59	19,10	4,11	180	2,28
23	53	2,20	19,01	3,12	16,79	4,09	180	2,20
24	57	2,27	20,33	3,63	16,06	4,08	180	2,31
25	61	2,08	21,50	4,13	15,66	4,07	180	2,31
26	65	2,08	22,44	4,29	15,15	4,07	180	2,36
27	69	1,91	23,94	5,11	14,05	4,07	180	2,42
28	73	2,17	19,72	8,75	13,21	4,12	180	2,28
29	77	2,13	18,82	10,71	13,01	4,12	180	2,31
30	81	2,23	27,93	12,18	12,80	4,11	180	2,40
31	85	2,10	29,30	13,31	12,01	4,11	180	2,36
32	89	1,98	18,44	14,60	11,04	4,12	180	2,40
33	93	2,30	35,47	15,94	9,91	4,13	180	2,31
34	97	2,30	24,13	13,71	9,04	4,13	180	2,25
35	101	2,13	40,64	14,73	7,60	4,11	180	2,30
36	105	1,86	25,32	13,41	7,58	4,09	180	2,35
37	109	1,83	34,66	14,10	6,98	4,04	180	2,32
38	113	1,86	29,45	12,41	7,40	3,98	180	2,29
39	117	2,39	34,00	14,34	7,21	3,91	180	2,30
40	121	2,28	35,09	16,87	7,40	3,86	180	2,38
41	125	2,14	35,04	12,52	7,15	3,82	180	2,38

D.4. DADOS DO ENSAIO EM REGIME CONTÍNUO COM $D = 0,08$ A $0,10 \text{ h}^{-1}$

Tabela 30 - Valores de pH, agitação do eixo do reator, vazão de retirada de meio do reator e concentrações celular em base úmida (X), de açúcares redutores totais (ART), glicose e etanol expressos em g/L para o ensaio realizado a 32°C e planejado com taxa de diluição $D = 0,08$ a $0,10 \text{ h}^{-1}$.

Amostra	t (h)	X (g/L)	ART (g/L)	Glicose (g/L)	P (g/L)	pH	Agitação (rpm)	Vazão saída (mL/min)
0	0	6,38	91,66	39,07	0,00	5,45	180	
1	1,5	8,24	81,16	33,87	2,09	5,19	180	
2	3	7,15	82,28	28,79	4,88	5,09	180	
3	4,5	11,30	57,08	15,64	13,69	5,09	180	
4	6,5	8,19	35,11	5,41	25,68	5,08	180	1,45
5	8,5	5,84	20,96	1,77	26,37	5,07	180	1,45
6	10,5	9,41	11,90	0,33	30,45	5,07	180	1,45
7	12,5	9,05	8,52	0,17	38,15	5,07	180	1,45
8	14,5	9,80	9,44	0,18	38,10	5,07	180	1,45
9	16,5	10,57	8,47	0,18	40,86	5,07	180	1,45
10	18,5	11,72	8,84	0,76	38,38	5,07	180	1,45
11	20,5	12,77	8,73	0,15	39,59	5,07	180	1,45
12	22,5	6,22	4,66	0,15	42,17	5,07	180	1,45
13	24,5	7,56	9,19	0,19	38,90	5,07	180	1,45
14	26,5	8,28	5,02	0,16	37,09	5,06	180	1,43
15	28,5	7,53	10,33	0,19	43,45	5,03	180	1,37
16	32,5	6,15	6,22	0,21	45,20	4,98	180	1,37
17	36,5	5,93	11,70	0,19	35,70	4,95	180	1,31
18	40,5	5,90	13,00	0,22	35,76	4,89	180	1,26
19	44,5	5,93	12,75	0,19	35,69	4,79	180	1,41
20	48,5	3,81	15,37	0,47	43,77	4,65	180	1,46
21	52,5	3,74	12,80	0,19	29,88		180	1,42
22	56,5	4,21	11,09	0,25	29,08	4,43	180	1,41
23	60,5	3,85	9,44	0,19	22,72	4,38	180	1,40
24	64,5	4,60	5,02	0,37	23,23	4,35	180	1,41
25	68,5	2,89	10,42	0,19	22,51	4,34	180	1,41
26	72,5	4,03	11,37	0,54	20,61	4,32	180	1,40
27	76,5	3,68	10,79	0,19	21,87	4,31	180	1,40
28	80,5	2,60	11,83	0,73	19,64	4,29	180	1,29
29	84,5	2,24	11,79	0,19	20,26	4,27	180	1,33
30	88,5	4,48	11,09	0,57	18,87	4,23	180	1,32
31	92,5	5,97	10,29	0,19	20,20	4,19	180	1,32
32	96,5	2,79	12,77	0,88	18,77	4,15	180	1,28
33	100,5	2,44	12,24	0,19	20,80	4,12	180	1,29
34	104,5	2,90	6,51	0,11	19,58	4,04	180	1,39
35	108,5	2,42	16,80	0,85	15,29	4,10	180	1,51
36	112,5	4,39	13,94	0,87	15,50	4,02	180	1,63

Tabela 30 – continuação – Valores de pH, agitação do eixo do reator, vazão de retirada de meio do reator e concentrações celular em base úmida (X), de açúcares redutores totais (ART), glicose e etanol expressos em g/L para o ensaio realizado a 32°C e planejado com taxa de diluição $D = 0,08$ a $0,10 h^{-1}$.

Amostra	t (h)	X (g/L)	ART (g/L)	Glicose (g/L)	P (g/L)	pH	Agitação (rpm)	Vazão saída (mL/min)
37	116,5	1,48	6,50	0,11	19,48	3,93	180	1,62
38	120,5	1,76	8,40	0,35	18,86	3,89	180	1,62
39	134,5	3,95	50,91	15,54	17,75	4,27	180	1,52
40	137	4,28	62,23	19,17	16,44	4,30	180	1,68
41	141	5,26	59,27	16,23	20,85	4,24	180	1,69
42	145	3,79	58,83	14,32	21,69	4,20	180	1,64
43	149	6,96	41,53	9,07	22,14		180	1,62
44	153	3,62	38,96	9,09	18,07		180	1,56
45	157	2,63	22,58	4,75	21,64	4,05	180	1,51
46	162,5	7,07	13,58	0,46	24,63	3,97	180	1,59
47	164,5	2,65	7,57	0,13	25,16	3,93	180	1,62
48	166,5	6,54	7,89	0,09	21,33	3,87	180	1,67
49	168,5	6,60	5,02	0,08	18,41	3,83	180	1,41
50	170,5	4,04	4,00	0,08	20,74		180	1,41
51	172,5	4,75	5,78	0,07	16,58		180	1,41