



Ana Francisca de Miranda Dias

Licenciada em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

Produção e otimização de vinagre de álcool para produção à escala industrial

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Engenheiro João Miguel Mendes Ferreira,
Responsável de Processo Biológico, Desenvolvimento e
Inovação, Mendes Gonçalves, S.A.

Co-orientador: Professor Mário Fernando José Eusébio,
professor auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Doutor Pedro Calado Simões
Arguente: Doutora Cristiana Andreia Vieira Torres
Vogal: Engenheiro João Miguel Mendes Ferreira

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à Mendes Gonçalves por me proporcionar a oportunidade de trabalhar neste projeto num departamento com pessoas tão criativas, trabalhadoras e bem-dispostas como o de Inovação e Desenvolvimento. Quero agradecer especialmente aos meus orientadores, João Ferreira e Rita Costa, por toda a paciência e disponibilidade para responder a todas as minhas questões e ajudar-me nos meus momentos de pânico com boa disposição e amizade. Agradeço a todas as pessoas que fazem parte deste departamento, por me fizeram sentir como parte da família desde do primeiro dia, João Godinho, Marta Nunes, Nuno Rasteiro, Janina Mendes, Joana Barbosa e em especial à Joana Ferreira que sempre me apoiou ao longo destes meses. Um sincero obrigada, não percam esse espírito de união tão positivo e raro de encontrar. Espero voltar a trabalhar com vocês um dia, foi um prazer.

Ao Professor Mário Eusébio por toda a disponibilidade durante todo o meu percurso académico na faculdade e pelos seus conselhos que me levaram sempre a fazer mais e melhor.

À minha família, que sempre acreditaram em mim, e me ajudaram ao longo destes anos a ultrapassar todas as dificuldades com amor, paciência e incentivo. Em especial à minha mãe, que esteve sempre presente e que observou de perto o meu crescimento dentro da faculdade e que me proporcionou um lar cheio de amor e compreensão; ao meu pai, com todas as suas qualidades e defeitos, me proporcionou força para acreditar que tudo é possível.

Por fim, a todos os meus companheiros de sempre e para sempre, Margarida Freixo e Flávio Jacinto, Nuno Dias, João Ferreira e Inês Santos, que da sua maneira tão díspar de ver a vida me aconselharam e apoiaram nas minhas escolhas, apesar de saberem, por vezes, não serem as mais corretas. Obrigada por todas as gargalhadas, discussões e partilha ao longo destes anos todos, e que venham mais uns quantos assim.

Um particular agradecimento ao Gabriel Anacleto que, apesar de ser uma nova aquisição, se tornou tão especial.

Resumo

O vinagre de álcool é uma das matérias-primas mais consumidas na produção industrial de molhos. A Mendes Gonçalves compra 100% do vinagre de álcool que consome na produção dos seus molhos representando um gasto anual de milhares de euros. Como a empresa possui o equipamento para a produção deste vinagre, foi considerada a sua produção interna. Uma vez que a matéria-prima (álcool destilado) é totalmente despromovida de nutrientes necessários ao funcionamento metabólico das bactérias acéticas é necessária a adição dos mesmos à carga do fermentador.

Com o objetivo de avaliar se a produção interna de vinagre de álcool seria vantajosa para a Mendes Gonçalves, foram feitos ensaios à escala piloto para seleção de bactérias provenientes do vinagre de arroz, tendo sido encontrada a concentração ótima de nutrientes comerciais para o arranque de um reator à escala industrial. Para garantir um processo económico, foram também realizados ensaios industriais com o objetivo de otimizar o volume de carga ao fermentador e assegurar condições ótimas à produção de ácido acético.

O presente trabalho demonstrou que 1/3 do volume de fermentação é o volume de carga indicado para a produção de vinagre de arroz com 0,5% (v/v) de álcool residual.

Ao avaliar economicamente seis possíveis cenários de poupança para a empresa, sugere-se que a compra de um acetificador de 40 000L juntamente com um inoculo de bactérias selecionadas será mais vantajoso para a empresa, apresentando uma poupança anual de 30%.

Palavras-Chave: Vinagre de álcool, Fermentação acética, otimização

Abstract

Alcohol vinegar is one of the most consumed feedstocks in the production of sauces. Mendes Gonçalves buys 100% of the alcohol vinegar consumed in the production of its sauces which represents an annual spending of millions of euros. As the company owns the necessary equipment to produce this vinegar, it is considered its intern production. As the feedstock (distillated ethanol) is totally deprived of nutrients needed for the metabolic functioning of the acetic bacteria, it needs their addition to the charge the of fermenter.

With the purpose of evaluating if the intern production of alcohol vinegar would be advantageous for Mendes Gonçalves, tests at pilot scale were performed for the selection of acetic bacteria from rice vinegar, finding the optimal concentration of commercial nutrients for industrial star-up. To ensure the economic viability, industrial tests with the purpose of optimizing the charge volume to the fermenter assuring the optimal conditions to the production of acetic acid were also performed.

The present work shows that one third of the fermentation volume is the accurate charge volume to produce rice vinegar with 0,5%(v/v) of residual alcohol.

Evaluating six possible saving scenarios for the company it is suggested that the purchase of an 40 000-liter acetator and an inoculum of selected acid bacteria would be the most beneficial for the company, presenting an annual saving percentage of 30%.

Key-words: Alcohol vinegar, Acetic fermentation, Optimization

Conteúdo

1- Enquadramento e Motivação	1
2- Introdução	4
2.1 - BREVE HISTÓRIA DO VINAGRE	4
2.2- MERCADO E APLICAÇÕES	6
2.3- LEGISLAÇÃO	7
2.3.1- Higiene e segurança.....	7
2.3.2- Parâmetros de classificação	7
2.3.3- Compostos adicionados	9
2.3.4- Legislação Portuguesa	9
2.5- FERMENTAÇÃO ACÉTICA.....	10
2.5.1- Matéria prima	10
2.5.2- Bactérias de ácido acético.....	11
2.5.3 - Composição do meio de fermentação	13
2.5.4 - Inibições.....	14
2.5.5 – Acetificador	14
2.5.6 – Condensador de gases e air-scrubber	17
2.6 - PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE VINAGRE DE ÁLCOOL	17
3- Metodologia, Materiais e Métodos	21
3.1 – PRODUÇÃO DE UM INOCULO DE VINAGRE DE ÁLCOOL À ESCALA PILOTO	21
3.1.1 – Arranque do acetificador.....	21
3.2- OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE VINAGRE DE ARROZ À ESCALA INDUSTRIAL	22
3.2.1- Volume de carga e descarga	24
3.2.2- Percentagem de álcool residual.....	25
3.3- AVALIAÇÃO ECONÓMICA	25
4- Apresentação e discussão de resultados	26
4.1- PRODUÇÃO DO INÓCULO DE VINAGRE DE ÁLCOOL À ESCALA PILOTO.....	26
4.2 – PROTOCOLO DE ARRANQUE OTIMIZADO	27
4.3 – OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE VINAGRE	30
4.3.1- Otimização do volume de carga/descarga à escala industrial na produção de vinagre de arroz em modo Semi-Batch	31
4.3.2- Análise à carga.....	37
4.3.3- Percentagem de álcool residual.....	38
4.4- AVALIAÇÃO ECONÓMICA	40
5- Conclusões e proposta de trabalhos futuros	51
Referências bibliográficas	53
Anexos	56

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

EUA – Estados Unidos da América

UE – União Europeia

ρ - Massa específica (g/cm³)

MM – Massa Molecular (g/mol)

PI – Piruvato

%(m/v) – Razão massa/volume (g/100ml)

%(v/v) – Razão volume/volume (ml/100ml)

rpm – Rotações por minuto

V – Volume

SS – Soma dos quadrados

Ms – Quadrado médio

G.L. – Graus de Liberdade

Fo – Estatística de Fisher

Lista de tabelas

Tabela 3.1- Parâmetros aplicados para arranque do acetificador industrial.....	23
Tabela 3.2 - Características do fermentado de arroz para carga do fermentador	24
Tabela 3.3 - Concentração das soluções de calibração do Acetoscan.....	25
Tabela 4.4 - Dados relativos à produção do inóculo para um reator de 10 000 L	29
Tabela 4.5 – Previsão otimista, realista e pessimista da produção do inóculo para arranque à escala industrial	29
Tabela 4.6 - Custo de produção do inóculo para fermentador de 10 000L.....	29
Tabela 4.7 - Volumes definidos para cada rácio de volume de carga/fermentação	31
Tabela 4.8 - Valores teóricos da concentração de etanol, ácido acético e total no início de ciclo com diferentes rácios de carga/descarga considerando um cenário ideal com base nos balanços do anexo B.	32
Tabela 4-9- Dados de 4 ciclos, depois de um período de adaptação das bactérias às novas condições do meio para o volume de carga de 1/3 do volume de fermentação	33
Tabela 4.10 – Dados correspondentes a um ciclo com rácio de volume de 1/3 .	33
Tabela 4.11- Resumo dos dados obtidos durante 4 ciclos nas diferentes condições.	33
Tabela 4.12- Produtividade dos diferentes rácios de volumes.....	35
Tabela 4.13 - Massa de ácido acético esperada e real para os diferentes volumes de carga	37
Tabela 4.14 – Concentração em % (m/v) de ácido acético no vinagre para as diferentes condições	37

Tabela 4.15 - Média os dados relativos aos 4 ciclos realizados, com volume de carga de 1/8 do volume de fermentação com 1% (v/v) de álcool residual na descarga.....	39
Tabela 4.16 - Comparação entre os valores de produtividade para os restantes volumes com álcool residual de 0,5%(v/v) e o volume de carga 1/8 com 1%(v/v) de álcool residual.	40
Tabela 4.17 – Custos de produção interna de vinagre de álcool a 12% (m/v)....	41
Tabela 4.18 - Análise de sensibilidade às variações na procura de outros tipos de vinagre.....	42
Tabela 4.19 - Custo anual no ano de arranque da produção de vinagre de álcool com 12%(m/v) de acidez num fermentador de 10 000L com bactérias da empresa.	43
Tabela 4.20- Comparação entre as despesas do cenário A e atual e a sua respetiva poupança num período de 10 anos.....	44
Tabela 4.21 - Custos anuais no ano de arranque da produção de vinagre de álcool com 12%(m/v) de acidez num fermentador de 10 000L com compra de inóculo de bactérias selecionadas.	45
Tabela 4.22- Comparação entre as despesas do cenário B e atual e a sua respetiva poupança num período de 10 anos.....	45
Tabela 4.23- Comparação entre as despesas do cenário C e atual e a sua respetiva poupança num período de 10 anos.....	46
Tabela 4.24 - Comparação entre as despesas do cenário D e atual e a sua respetiva poupança num período de 10 anos.....	47
Tabela 4.25- Dados relativos ao pagamento do empréstimo de 60% do capital investido.....	48
Tabela 4.26- Dados relativos ao pagamento do empréstimo de 60% do capital investido.....	49
Tabela 4.27 – Resumo dos indicadores dos 6 cenários considerados.....	50
Tabela 28 - Resumo dos cenários de poupança considerados para a Mendes Gonçalves na produção interna de vinagre de álcool com 12% de acidez.....	52

Lista de Figuras

Figura 1.1 - Esquema do processo de produção de vinagre de álcool em semi-batch.....	2
Figura 1.2 - Consumo de vinagre de álcool a 21%(v/v), pela Mendes Gonçalves, nos últimos 4 anos	3
Figura 2.3 -Influência da temperatura na taxa de acidificação num processo de acetificação em semi-contínuo num reator de 6 L.	12
Figura 2.5 - Vista dentro do acetificador Fings com volume reduzido, depois de ligar o aerador	15
Figura 2.4 -Aerador	15
Figura 2.6 -Esquema de separação de espuma sem centrífuga	17
Figura 2.7 -Representação de um Air Scrubber que aumenta a recuperação de etanol e ácido acético perdido por evaporação	17
Figura 2.8 -Variação da concentração de álcool, ácido acético e concentração total ao longo da fermentação acética na produção de vinagre em semi-batch.....	18
Figura 2.9 -Variação da concentração de álcool, ácido acético e concentração total ao longo da fermentação acética na produção de vinagre em fed-batch	19
Figura 3.10 - Representação do fermentador de 6L utilizado nos ensaios.....	21
Figura 3.11 -Esquema do processo industrial para produção de vinagre em semi-contínuo	23
Figura 4.12 -Evolução do álcool e do ácido acético ao longo dos ciclos para um volume de 1/3	32
Figura 4.13 -Representação dos ciclos com 1/3, 1/4 e 1/8 de volume de carga	34
Figura 4.14 -Evolução da concentração de ácido acético e álcool durante a carga para o volume de 1/3 comparativamente com as suas concentrações teóricas ..	38

Figura 4.15 -Evolução da concentração de álcool em 4 ciclos, com um volume de carga de 1/8 do volume de fermentação com uma descarga com 1% (v/v) de álcool residual.....	39
Figura 4.16 -Estimativa realista, otimista e pessimista do consumo interno de vinagre de álcool a 21 %(m/v).....	41
Figura R.1 – Diagrama representativo do balanço de massa numa situação ideal para um rácio de 13.....	57

1

Enquadramento e Motivação

Vinagre é o produto obtido exclusivamente pelo processo biológicos de dupla fermentação - alcoólica e acética – de compostos de origem agrícola, catalisadas por leveduras e bactérias de ácido acético, respetivamente [1]. O processo mais importante para a produção de vinagre é a conversão bio catalítica de etanol em ácido acético numa solução aquosa devido à sensibilidade das bactérias associadas. Esta conversão é extremamente dependente da disponibilidade de oxigénio e deve ser efetuada a temperaturas moderadas [2].

Esta substância, conhecida por não ter grande valor nutricional entre os fermentados, é feita através da transformação de componentes mais ricos e nutritivos [3]. As margens desta indústria são particularmente baixas e, por esta razão, a produção de vinagre deve ser a mais económica possível.

O vinagre de álcool é o mais vendido mundialmente, apresentando uma enorme versatilidade devido à sua elevada acidez (>10%); conserva-se melhor e mantém-se límpido mais facilmente, contudo é desprovido de sabor [4].

Na produção deste vinagre, a matéria-prima para fermentação acética é etanol de origem agrícola diluído em água, sendo assim destituído de qualquer valor nutricional que permita o crescimento destas bactérias e a consequente produção de ácido acético.

O processo mais aplicado na produção de vinagre de álcool com acidez inferior a 15%(m/v) é o modo semi-batch. A carga ao fermentador é constituída por álcool diluído (10 a 15% (v/v)) e nutrientes. Estes nutrientes são geralmente, receitas comerciais de vários compostos orgânicos e inorgânicos, normalmente encontradas nas matérias-primas da fermentação alcoólica.

Este processo é caracterizado por ciclos de produção com três fases distintas, a carga do reator, o período de fermentação e a fase de descarga. A produção é iniciada com um inóculo de vinagre de fermentações anteriores, constituído por um grupo de bactérias de ácido acético do género *Acetobacter* e *Gluconacetobacter*. A fase de carga é constituída pela alimentação ao bio reator de uma mistura de etanol e nutrientes. Esta etapa é concluída quando se atinge o volume de fermentação pré-definido nos controladores do equipamento. Finalizada a carga do bio reator segue-se o período de fermentação durante o qual as bactérias acéticas convertem a maior parte do etanol introduzido no reator em ácido

acético. Este período é interrompido antes do esgotamento do etanol, ainda com a maioria da população de bactérias acéticas ativa e sem por em causa o bom funcionamento do ciclo seguinte. A concentração final de etanol desta fase é também previamente definida nos controladores do equipamento. Desta forma, quando a concentração de etanol pré-definida é atingida no interior do reator, o equipamento inicia a fase de descarga em que se retira o mesmo volume de vinagre que se introduziu da mistura de álcool na fase de carga. Concluído o processo de descarga segue-se um novo ciclo de produção iniciando-se uma nova fase de carga ao bio reator.

Este processo pode ser realizado sem interrupções e diminuição de rendimento, durante vários anos, se as condições necessárias forem fornecidas. Devido ao elevado pH das substâncias envolvidas, o processo é praticamente livre de contaminações. O esquema deste processo é ilustrado na figura 1.1.

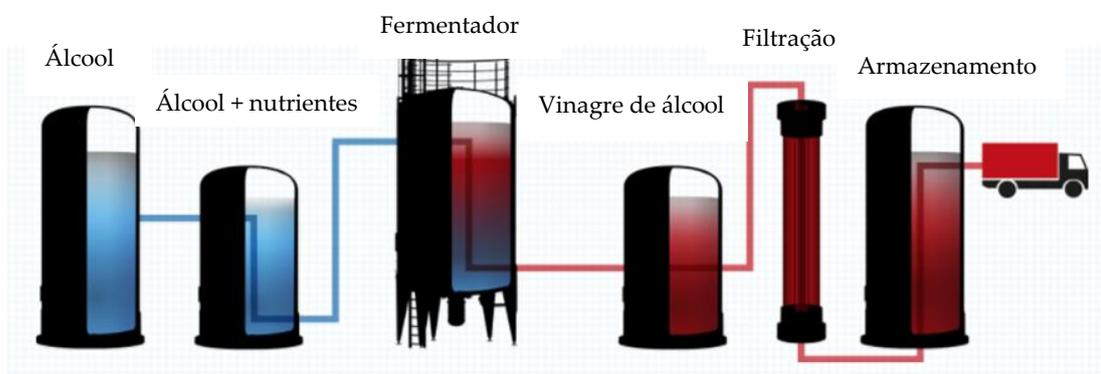


Figura 1.1 - Esquema do processo de produção de vinagre de álcool em semi-batch [5]

A presente dissertação foi realizada em colaboração com a Mendes Gonçalves fundada em 1982. Empresa portuguesa localizada na Golegã, Santarém, é responsável pela produção de molhos, condimentos e vinagres. Marcas reconhecidas nacional e internacionalmente, como a Paladin, Peninsular e Creative fazem parte da criação da mesma [6].

Como o vinagre de álcool é um dos ingredientes na produção de molhos, e o seu consumo está em crescimento, encontra-se em consideração a sua produção interna, sendo atualmente obtido externamente.

O gráfico representado na figura 1.2 mostra o aumento do consumo de vinagre de álcool na empresa nos últimos 4 anos, observando-se uma taxa média de crescimento anual de 16%. Os consumos dos respetivos anos são apresentados no anexo A.

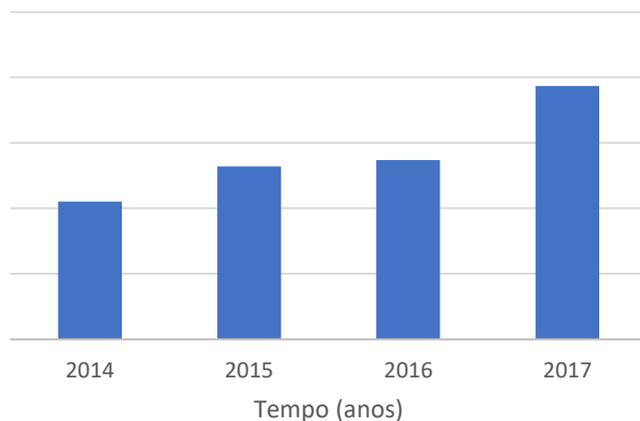


Figura 1.2- Consumo de vinagre de álcool a 21%(v/v), pela Mendes Gonçalves, nos últimos 4 anos

Esta dissertação tem como objetivo a produção de um inóculo, para um futuro arranque à escala industrial, constituído por bactérias selecionadas adaptadas as condições de produção de vinagre de álcool, encontrando a concentração de nutrientes comerciais necessários ao arranque.

Para que a produção interna deste vinagre seja a mais lucrativa para a empresa, foi realizada a otimização de alguns parâmetros do processo como volume de carga ao fermentador e a concentração de álcool na descarga, para aumentar a produtividade do processo.

Esta também inclui uma avaliação económica, onde são apresentadas seis propostas para produção interna deste vinagre na Mendes Gonçalves, comparando-o com a sua situação atual.

2

Introdução

2.1 - Breve história do vinagre

A palavra “vinagre” vem do francês *vinaigre*, palavra que significa vinho azedo proveniente do latim *vinum acre* [7]. Da mesma forma que as palavras estão associadas, o “nascimento” do vinagre e do vinho não consegue ser distinguido. O conceito de vinho originou-se no período Neolítico, principalmente no Egito e no Médio Oriente. Foi neste período que houve evolução na vinicultura, na fermentação e também nos métodos de conservação. Acredita-se que o processo de fermentação foi favorecido pelas condições climáticas destes países devido ao ambiente seco e quente, aumentando assim a velocidade de fermentação [3].

Romanos e Gregos fizeram um uso extensivo do vinagre, não só para culinária, mas também como agente desinfetante. Este líquido era ingerido maioritariamente por militares, usualmente misturado em água tornando a bebida refrescante e mais segura [8,9]. Na idade média, o vinagre era usado como agente conservante para provisões e para transporte, para além das suas outras aplicações já conhecidas [10]. Nesta altura, a fermentação do vinagre era espontânea, ou seja, contava apenas com as alterações climáticas para favorecerem o meio fermentativo [3].

Pouco se sabe sobre a origem do vinagre na Ásia, apenas o uso de um condimento durante a dinastia Zhou. No entanto, o tratado mais antigo chinês, editado durante o período Wei (386-533 d.c) prova que o cientista Ka En-Kyou sabia da necessidade de microrganismos para a fermentação do vinagre 1300 anos antes de Pasteur descobrir o microrganismo na Europa. O Vinagre de arroz é atualmente o vinagre mais distinto chinês e foi certamente produzido antes do séc I [3].

Foi apenas em 1394 que surgiu em França, Orleães, a primeira empresa focada na produção de vinagre. Esta empresa incorporava um vasto número de alquimistas e técnicos que pesquisavam novas maneiras de obter vinagre. Rapidamente a empresa *Vinaigriers* monopolizou a produção e desenvolveu o chamado “*Processo Orleães*”, também conhecido como método contínuo ou lento. Neste processo o vinagre é obtido através de uma fermentação lenta do vinho em barris de madeira. Para começar a fermentação num novo barril, é adicionada uma pequena porção da “*mãe do vinagre*”, camada gelatinosa formada à superfície

do fermentado durante a acetificação, constituída por bactérias de ácido acético. Assim que o vinagre atinge a acidez e o sabor desejado, é removido do topo, enquanto novo vinho é adicionado. Este processo segue o tipo de fermentação *back-slopping* onde a nova fermentação começa através das bactérias da produção anterior [3].

Apesar da capacidade de produzir vinagre, era desconhecida a razão pela qual era possível obtê-lo. Apenas com o desenvolvimento da ciência experimental foi possível investigar a produção de vinagre de um ponto de vista químico. Foi Antoine-Laurent de Lavoisier (1743-1794) [11] que provou que o ar era a principal causa da acidificação, isolando o oxigênio como o principal composto responsável. Esta ideia foi melhorada e aplicada por Karl Wilhelm Gottlob Kastner (1783-1857) e Johann Sebastian Schützenbach (1793-1869) que desenvolveram o chamado “*Processo Alemão*” também conhecido como processo rápido. Estes cientistas usaram um gerador para oxigenar o fermentado, através de perfurações no fundo dos tanques. Estes continham materiais de enchimento onde as bactérias acéticas se fixavam e convertiam o álcool em ácido acético. A nova matéria-prima era gotejada para o topo do tanque, retirada do fundo e reciclada novamente para o topo [12], permitindo assim um maior contacto com as bactérias presentes no enchimento [8]. Este método foi a base da industrialização da produção de vinagre [3]. Um dos inconvenientes deste processo é a acumulação de bactérias nos suportes, provocando entupimento e perdas, não permitindo um bom controlo de temperatura e de oxigenação [8].

Os estudos mais importantes para o desenvolvimento do conhecimento do vinagre aconteceram depois da revolução industrial. Louis Pasteur (1822-1895) demonstrou que a “*mãe do vinagre*” não era uma consequência da fermentação, mas sim a sua causa. Provou que as bactérias acéticas, inicialmente denominadas como *Micodema vini*, [13], eram responsáveis pela produção de vinagre e que o seu crescimento era espontâneo devido aos nutrientes presentes na matéria-prima [11],3]. Estas bactérias foram depois classificadas em três classes, de acordo com a sua morfologia: *Bacterium Aceti*, *Bacterium pasteurianum* e *Bacterium kutzin gianus*. Pela classificação atual, as bactérias acéticas para produção de vinagre, pertencem à família *Pseudomonadaceae*, aos gêneros *Acetobacter* e *Gluconobacter* [13].

Uma das melhorias feitas ao processo rápido foi a invenção do *agitador rotativo* apresentada pela empresa *Frings* entre 1932 e 1937. Este agitador do tipo ventoinha, presente na base do tanque de fermentação, força a oxigenação do meio permitindo uma maior eficiência do processo. Este equipamento já permite a monitorização de parâmetros, como a temperatura, através de água de arrefecimento, a quantidade de oxigênio transferida e a taxa de rotação [14].

Em 1950, a tecnologia de produção de antibióticos possibilitou a utilização do método de cultura submersa [15], onde as bactérias acéticas se encontram submersas no líquido a fermentar, multiplicando-se e libertando energia da reação de oxidação do álcool etílico a ácido acético [3]. Este processo destaca-se

pela sua produtividade, adequando-se melhor aos moldes industriais, utilizando como equipamento mais comum o *Acetator Frings* [8]. Este fermentador altamente automatizado, permite ciclos mais curtos e rendimentos mais elevados do que o *agitador rotativo*. O *Acetator* é um tanque de aço, com uma serpentina, uma entrada no fundo e um agitador e aerador de alta velocidade. Este é desenhado para alimentar ar para o fundo do fermentador, onde é disperso pelo agitador para o líquido no tanque [14]. Dispositivos automáticos controlam a taxa de arejamento e de água de arrefecimento. Após a acetificação da matéria-prima, é feita a descarga de uma parte de vinagre, sendo de seguida reposta com uma parte de matéria-prima alcoólica, sem parar o processo [12]. Atualmente este é o método mais empregado industrialmente para elaboração de vinagres em larga escala [8].

Ao longo dos tempos o Homem tem usado o vinagre para as mesmas aplicações: como condimento, agente conservante, desinfetante e como bebida refrescante. É um produto disponível em todo o mundo com diferentes formas dependendo da cultura [3].

2.2- Mercado e aplicações

O mercado global de vinagre cresceu a uma taxa anual de 2,1% de 2010 a 2017, encontrando-se em 2017 com um valor de mercado de 1,3 biliões de dólares. É estimado que o mercado de vinagre irá crescer a uma taxa anual de 6,7 % entre 2017 e 2021 [16].

A Europa representa o maior mercado de vinagre seguida pela América do Norte e pela Ásia. As principais empresas responsáveis por esta produção mundial são Acetificio Acetum S.R.L, Acetificio Marcello De Nigris, Aspall, Burg Groep B.V., Castelo Alimentos S/A e a Fleischmann's Vinegar Company [17]. Na Europa destaca-se a Espanha, França e Itália como os maiores produtores [2]. No que diz respeito ao vinagre de álcool, a Alemanha é o maior produtor mundial [13,18].

O vinagre de álcool, também conhecido como destilado, é o mais produzido mundialmente devido às suas características, nomeadamente a sua elevada acidez.

Em termos nacionais, destaca-se o vinagre de vinho branco, responsável por 80% do mercado português, embora a tendência seja a deslocação para variedades inovadoras como o vinagre balsâmico [4]. A nível europeu, o vinagre de álcool representa 65% da indústria do vinagre [19].

A elevada acidez e pH reduzido faz do vinagre um importante ingrediente na indústria alimentar, na produção de molhos e marinadas atuando como agente de sabor, e na acidificação de vegetais como preservante natural. É também aplicado como agente de limpeza e desinfetante [20] e até como pesticida biológico [21].

Na Ásia, bebidas de vinagre de arroz e de fruta são consumidas devido as suas propriedades refrescantes e saudáveis [19]. Estudos recentes indicam que o consumo de vinagre tem benefícios para a saúde humana como a redução da pressão arterial, atividade antibacteriana, redução dos efeitos provocados pelos diabetes, prevenção de doenças cardiovasculares e efeito antioxidante provocado pelos ácidos fenólicos. No entanto, mais estudos precisam de ser desenvolvidos nesta área para conclusões [22].

2.3- Legislação

2.3.1- Higiene e segurança

No geral, os princípios básicos de segurança alimentar são as boas práticas na agricultura (BPA), boas práticas na produção (BPP) e boas praticas de higiene (BPH).

Estes princípios devem estar presentes ao longo de todo o processo, mas principalmente antes do início da fermentação. Neste período, os fatores do meio permitem o crescimento de microrganismos prejudiciais, como fungos e bactérias perigosas, sobretudo por estes processos serem realizados a temperaturas moderadas [3].

Devido à elevada acidez do vinagre e ao teor de álcool da sua matéria-prima, o crescimento de microrganismos indesejáveis é evitado [19].

Os depósitos e as embalagens de vinagre devem ser resistentes à corrosão pelas razões referidas. Os materiais usados para este propósito são aço inoxidável, plástico e vidro [3].

2.3.2- Parâmetros de classificação

Considerando as diferentes leis no que diz respeito ao vinagre, os principais parâmetros de comparação são a acidez e o etanol residual.

A UE exige que o conteúdo de ácido acético e de etanol esteja restringido a intervalos de acordo com a sua matéria-prima. Vinagres de fruta ou de ervas devem conter uma acidez mínima de 5% (m/v) e um máximo de etanol residual de 0,5% (v/v). Apenas pode ser classificado como vinagre de vinho aquele que seja proveniente da acetificação do mesmo. Este deve apresentar uma acidez mínima de 6% (m/v) e um máximo de etanol residual de 1,5% (v/v).

OS EUA, ao contrário da UE, não restringe estes parâmetros por intervalos. Este país apenas exige que a acidez dos vinagres seja superior a 4%.

A China classifica os seus vinagres por 3 intervalos de acidez: 3,5 a 4,5 %; 4,5-6 % e grau superior a 6% [3].

Existe um elevado número de tipos de vinagre classificados de acordo com a sua origem. Segue-se algumas destas categorias:

- **Vinagre de Vinho** – Vinagre obtido exclusivamente do vinho pelo processo biológico de fermentação acética [23]. Pode ser tinto, branco ou rosé dependendo das características da matéria-prima [24]. Este tipo de vinagre é o mais comum nos países mediterrâneos e Europa central. [25].

- **Vinagre de Sidra** – Vinagre obtido da sidra pelo processo biológico de fermentação acética [23]. Produzido através de maçãs, é um vinagre com pouca acidez [26] de mais usado para cozinha nos EUA [24].

- **Vinagre Balsâmico** – Dado que a sua matéria-prima é a uva, pode ser considerado vinagre de vinho. No entanto, devido às suas diferenças pode ser inserido numa categoria distinta. Apresenta uma cor escura, elevada acidez e é usado sumo de uva Trebbiano concentrado como matéria-prima, seguindo-se um processo de envelhecimento em barris de várias madeiras. O seu preço depende da sua idade, alguns vinagres deste tipo apresentam idades superiores a 100 anos [25,27].

- **Vinagre de malte e vinagre de malte destilado** - Vinagre obtido, com ou sem destilação sob pressão reduzida intermédia, pelo processo biológico de dupla fermentação alcoólica e acética de cevada maltada com ou sem a adição de cereais, cujo amido foi convertido em açúcares unicamente pelo processo da diástase de cevada maltada [23]. Este vinagre apresenta uma cor castanha clara e é muito popular em Inglaterra [24].

- **Vinagre de arroz**- Este vinagre é mais produzido na China e no Japão através da fermentação do arroz. Existem três tipos de vinagre de arroz, branco e preto [25].

- **Vinagre destilado ou de álcool** – Vinagre obtido do álcool destilado de origem agrícola pelo processo biológico de fermentação acética [23]. A destilação destrói muitos dos nutrientes sendo o resultado um vinagre muito ácido, muito usado como condimento. Para além da cozinha, este produto também pode ser utilizado como agente de limpeza [27].

- **Vinagres Aromatizados** – Vinagres de qualquer tipo a que sejam adicionadas plantas ou partes de plantas aromatizantes, especiarias e extratos aromatizantes, que sejam organolepticamente perceptíveis [23].

- **Outros** – Existem muitos outros tipos de vinagre, tais como vinagre de champagne, cereja, coco, e cana de açúcar [24].

2.3.3- Compostos adicionados

Etanol

O etanol é matéria-prima da fermentação acética na produção de vinagre de álcool. Como na UE apenas é permitida a adição deste composto se for de origem agrícola, o etanol inserido no processo durante a fermentação acética do vinagre de álcool não pode ser proveniente da hidratação do etileno no representado na equação seguinte [28]:

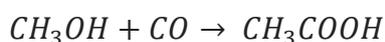


Nos EUA, como noutros países, tal restrição não existe. A legislação deste país permite o uso de etanol sintético nos processos de fermentação do vinagre [2]

Ácido acético

A adição de ácido acético glacial diluído em água, não é decisão unânime entre países.

A carbonilação do metanol é o método mais usado na indústria química para a produção deste ácido devido à quantidade reduzida na geração de subprodutos. Este é produzido de acordo com a equação [29]:



Dentro da UE, alguns estados membros, como a Portugal e Itália, consideram que o termo “vinagre” apenas pode ser aplicado àquele que apenas contém ácido acético proveniente do processo fermentativo. Outros, não fazem distinção entre a adição de ácido acético biológico e ácido acético glacial diluído em água. Por esta razão, de acordo com o Regulamento N° 1333/2008 do Parlamento Europeu, ambos os produtos podem ser rotulados como “vinagre” [23].

Os EUA consideram que apenas ácido acético biológico pode ser adicionado num produto rotulado como “vinagre”. No entanto, a adição de ácido acético sintético diluído em água é permitida desde que o produto final esteja sob o nome de “vinagre sintético” [30].

2.3.4- Legislação Portuguesa

De acordo com o artigo 2º do Decreto de Lei nº174/2007 de 8 de maio de 2007, do Ministério da Agricultura do desenvolvimento Rural e das Pescas, entende-se por “vinagre”:

“O produto obtido exclusivamente pelo processo biológico de dupla fermentação – alcoólica e acética – de produtos de origem agrícola.”

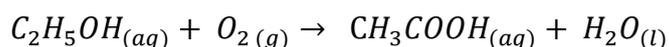
[1]

Desta maneira, como foi referido no subcapítulo 2.3.3, não é possível adicionar etanol produzido por via química. No que diz respeito ao ácido acético glacial diluído, a sua adição também não é permitida, segundo este decreto de lei [31].

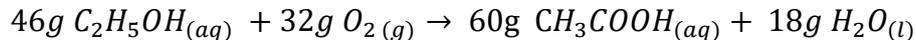
A classificação do vinagre em Portugal é feita de acordo com as suas origens, seguindo as normas europeias no que diz respeito ao teor de álcool residual e de acidez.

2.5- Fermentação acética

A fermentação acética consiste num processo de oxidação pela bactéria de ácido acético, de uma solução de etanol diluída. Esta reação é aeróbica e produz ácido acético e água, de acordo com a seguinte equação:



A estequiometria leva ao balanço de massa descrito na equação seguinte:



O etanol é oxidado por duas reações sequenciais, catalisadas por enzimas ligadas à membrana, a álcool desidrogenase (ADH) e aldeído desidrogenase (ALDH) [32].

A conversão teórica de etanol em ácido acético pode ser feita através do fator 1,0295. O termo “concentração total”, normalmente usado na produção de vinagre, é a soma da concentração de ácido acético e da concentração de etanol [19]. Este é um dos parâmetros de controlo, normalmente usado durante o processo.

A reação representada pelas equações é exotérmica, libertando 493 KJ/mol de calor [19].

2.5.1- Matéria prima

A maior parte das matérias-primas não requer a adição de nutrientes durante o processo, no entanto na maçã e algumas uvas apresentam, normalmente, uma concentração baixa em componentes nitrogenados, o que pode ser corrigido com a adição de fosfato de amônio [2]. Na produção de vinagre de álcool, a matéria-prima é etanol puro, destilado de origem biológica. Para que não haja inibição das bactérias por etanol, a concentração desta deve manter-se entre os 10 a 15 % de volume [33].

2.5.2- Bactérias de ácido acético

Embora existam 10 gêneros de bactérias de ácido acético a maioria das espécies encontradas em vinagres são do gênero *Acetobacter* e *Gluconacetobacter*. É possível que existam outras espécies e gêneros destas bactérias ligadas ao processo que ainda não tenham sido encontradas devido às suas dificuldades de cultivo [3].

As bactérias deste gênero são aeróbias obrigatórias [22], polimorfas. As células são gram-negativas, bastonetes elipsoidais, retos ou ligeiramente curvos com 0,6 a 0,8 μm de comprimento. Podem encontrar-se aos pares ou em corrente [2]. Apresentam também a capacidade para oxidar a molécula do etanol e do ácido acético em CO_2 e H_2O . Estas células formam uma película ou crosta na superfície da cultura, vulgarmente chamada de “*mãe do vinagre*” [12].

O grupo de bactérias com melhor produtividade de fermentação acética são as *Acetobacter* [34]. Este gênero é conhecido pela sua capacidade de oxidar açúcares, álcoois e esteroides [2].

Este gênero oxida preferencialmente álcool enquanto o gênero *Gluconobacter* tem preferência pela glucose [22].

Existe uma dificuldade de caracterizar as bactérias responsáveis por esta fermentação, no entanto não é comum o uso de culturas puras na indústria, mas uma microbiota mista de *Acetobacter* contendo diferentes espécies. Este conjunto de bactérias é considerado mais eficiente e não traduz um problema à produção de vinagre [12].

Temperatura

Estas bactérias apresentam um rendimento ótimo entre os 25°C e os 30°C, [22] embora na produção de vinagre seja usado um intervalo de 28°C a 30°C [19]. Estes organismos suportam temperaturas mínimas de 4°C a 5°C e máximas de 43°C. No entanto temperaturas inferiores a 15°C e superiores a 35°C reduzem a atividade bacteriana e conseqüente fermentação acética lenta [34].

Por outro lado, Rubio-Fernández et al. demonstraram um aumento da taxa de acidificação a 32°C numa gama de 85 a 105 g/L de ácido acético operando em modo semi-batch na produção de vinagre de vinho. Para concentrações de ácido acético superiores, a temperatura ótima seria 28°C [35], tornando a temperatura de fermentação aplicada dependente da concentração de ácido acético no meio, como se pode observar na figura 2.3.

No entanto, variações drásticas, tanto na temperatura como na concentração de ácido acético e álcool podem causar danos nas bactérias e conseqüente diminuição na sua produtividade [2].

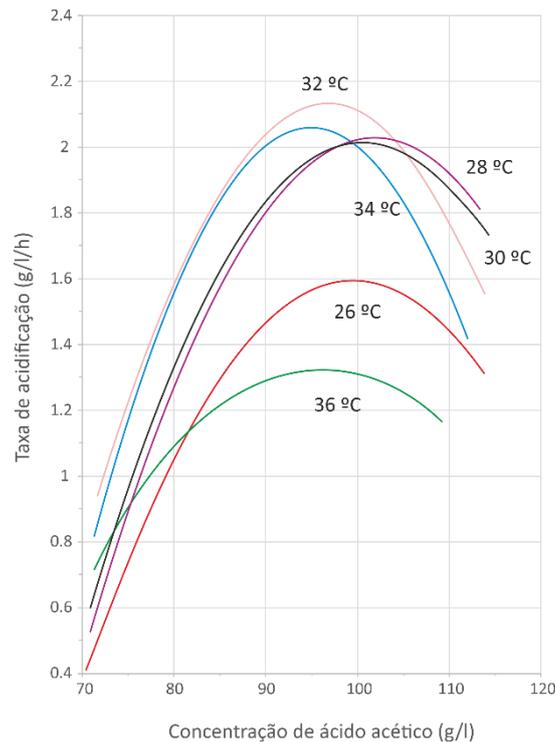


Figura 2.3-Influência da temperatura na taxa de acidificação num processo de acetificação em semi-contínuo num reator de 6 L [35].

pH

As bactérias de ácido acético são extremófilas devido à sua capacidade de sobrevivência em condições severas [19]. O seu pH ótimo é entre 5 a 6,5, no entanto já foram registados meios abaixo de pH 5 [22].

Oxigénio

O oxigénio é uma molécula necessária à atividade metabólica das bactérias de ácido acético [19].

Teoricamente, o fluxo de ar necessário para a fermentação acética de um fermentador com 50 m³, é sensivelmente 430 m³/h [36]. Na prática, devido às baixas taxas de transferência gás-líquido, este valor é muito superior [33], sendo que a transferência de oxigénio para a fase líquida é de 38 a 50% [36].

A interrupção de oxigenação do meio provoca danos nas células. Quanto maior esta interrupção e maior a concentração total do meio, mais proporções tem este dano [2].

“Overoxidation”

O objetivo da fermentação acética é a produção vinagre com a maior concentração de ácido acético possível, no entanto não se deve chegar ao

esgotamento de etanol. As bactérias acéticas, na ausência de álcool, promovem a degradação do ácido acético convertendo-o em CO₂ e H₂O [2], dado que o etanol é a fonte e energia da bactéria [19]. Esta reação provoca uma diminuição da produção de ácido acético diminuindo a acidez do vinagre.

Por esta razão, é necessário manter uma quantidade mínima de etanol residual [2], para que o processo não se torne pouco económico [33].

2.5.3 - Composição do meio de fermentação

Nutrientes

Os nutrientes normalmente presentes no meio são fosfato de amônia, glucose, leveduras autolisadas, sais e ácidos orgânicos [14].

A glucose é um co-substrato requisitado pelo meio, devido à necessidade de carbono para o crescimento celular dado que o carbono presente no etanol não pode ser utilizado para este propósito.

Os Nutrientes são a fonte de nitrogénio, fosforo, potássio e outros elementos necessários para o crescimento e metabolismo da bactéria. Aminoácidos e vitaminas podem estimular o crescimento, atividade catalítica e resistência a elevada acidez do meio [19].

Algumas bactérias acéticas conseguem usar os iões de amónia como única fonte de nitrogénio. Outras precisam de aminoácidos e outros co-factores como vitaminas [2].

As *Acetobacter* requisitam CO₂ para o seu crescimento. Esta substância é incorporada na célula sendo responsável por 0,1 % do carbono da célula. Uma pequena quantidade de ácido acético deriva do metabolismo de CO₂ [2].

Para vinagre com uma acidez elevada, nomeadamente vinagre de álcool, as bactérias de ácido acético requerem a adição de glucose, potássio, sódio, magnésio, cálcio e compostos amina (fosfato, sulfato e cloreto de amina). Também são necessários alguns minerais em quantidades residuais como: Ferro, magnésio, cobalto, vanádio e zinco. As misturas que estão comercialmente disponíveis contêm também extrato de leveduras secas de modo a recomeçar a fermentação mais rapidamente [2].

Hai Lin et al. 2001, desenvolveu um meio com condições ótimas para o crescimento destes microrganismos, para a produção de vinagre de álcool, em semi-batch. Glucose, Extrato de leveduras, MgSO₄, NaH₂PO₄ e KH₂PO₄ foram os compostos escolhidos por estes autores para formarem as condições ótimas para um processo industrial [37].

2.5.4 - Inibições

Inibição por etanol

O número de bactérias de acéticas diminui à concentração de 5%(v/v) de etanol. Para conseguir atingir uma acidez superior esta inibição constitui um problema. Este problema de inibição por substrato foi resolvido pelo processo de fed-batch onde o substrato é mantido a uma certa concentração por alimentação seletiva [38].

Inibição por ácido acético

O crescimento de bactérias de ácido acético é inibido a concentrações elevadas de ácido acético (>10%(m/v))[39]. Para resolução deste problema foi sugerido um processo de fed-batch com dois fermentadores. Quando as células atingem a sua concentração máxima de não-inibição por ácido acético, uma porção é transferida para o segundo fermentador. Ambos são alimentados com solução alcoólica com baixa concentração de álcool. Como esta fermentação irá começar com um maior número de células viáveis, concentrações superiores de ácido acético são atingidas (80 g/L). Também foi observado um aumento do nº de células viáveis quanto repetidos os ciclos de fed-batch, a concentrações elevadas de ácido acético [38].

Subprodutos da fermentação

Além do ácido acético são produzidas pequenas quantidades de outros componentes, como aldeídos, cetonas, ésteres e outros ácidos orgânicos, sendo o acetaldeído o composto secundário predominante [50,12]. As bactérias acéticas podem produzir outros ácidos orgânicos, dependendo da espécie, como ácido tartárico, láctico, málico e cítrico da oxidação de açucares e álcoois [22].

Compostos voláteis

A evaporação de etanol durante o processo industrial pode resultar numa perda de 10 a 30% do rendimento estequiométrico, comparativamente, as perdas de ácido acético são mínimas. Para evitar esta diminuição de rendimento, é aconselhado que a fermentação decorra em sistema fechado [32].

2.5.5 – Acetificador

O acetificador *Frings*, representado na figura 2.4, é responsável pela produção de 60% de todos os tipos de vinagre [19], conseguindo fermentar até 3600 L de etanol puro em 24 h [2]. Estes funcionam de acordo com o método de cultura

submersa onde oxigênio é fornecido de modo a acelerar a produção industrial [22].

Aeração

Os diferentes processos exigem uma alta eficiência do fermentador, especialmente no seu sistema de arejamento [2]. A oxigenação do meio é feita através de uma turbina que opera como um aparelho de agitação e arejamento, ilustrado na figura 2.4. Não é necessário qualquer compressor para promover o fluxo de ar para o tanque devido à sua auto aspiração [2]. Este aparelho consiste num rotor oco envolvido por um estator. Este aspira o ar bombiando-o para o líquido, criando uma mistura líquido/gás, com uma velocidade escolhida para realizar uma distribuição uniforme de ar. O rotor com formato de estrela é instalado com um motor na base do tanque arrastando o líquido axialmente e acelerando-o radial e tangencialmente como é possível observar na figura 2.5. Este tem uma frequência de rotação nominal de 1480 ou 1780 rpm. Uma grande dissipação de energia local cria bolhas primárias extremamente finas, com uma grande área superficial (a) no areador. O meio contendo ácido acético e etanol, não apresenta coalescência, ou seja, as bolhas de gás pequenas não formam bolhas maiores enquanto sobem à superfície, providenciando uma eficiente transferência de massa de oxigênio para o líquido. O coeficiente de transferência de massa é elevado (kl_a), a dado fluxo de ar, e por isso uma elevada taxa de transferência de oxigênio (OTR) pode ser atingida.



Figura 2.4 -Aerador [5]

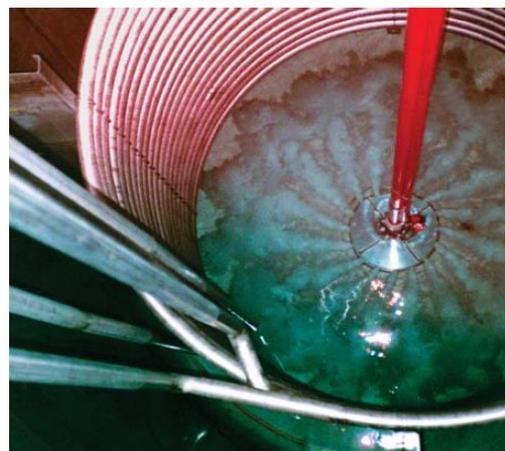


Figura 2.5- Vista dentro do acetificador Fings com volume reduzido, depois de ligar o aerador [3]

A produtividade atingível esta diretamente ligada à taxa de transferência de oxigênio (OTR) [19].

Para que não exista interrupção de oxigênio para as bactérias, uma unidade de energia deve estar disponível para casos de emergência, ligada ao motor da

turbina de aeração. Um corte de arejamento de apenas 10-45 s, diminui a produtividade da unidade de fermentação até 80% durante um longo período de tempo [19].

Existem várias mudanças no volume de fermentação a arejar durante o período de carga e a descarga entre os ciclos, principalmente em modo de operação fed-batch. Este facto faz com que seja necessário realizar um ajustamento ao fluxo de ar, não excedendo os 0,1 – 0,15 vvm.

Uma elevada utilização de oxigénio, até 70%, pode ser atingida em processos industriais. Um uso limitado de oxigénio é importante devido à volatilidade do etanol e do ácido acético. No entanto, o uso de oxigénio puro ou ar enriquecido em oxigénio pode prejudicar a bactéria [2].

Controlo de temperatura e automatização

A fermentação acética produz calor metabólico que tem de ser dissipado por um sistema de controlo de temperatura. Normalmente, em fermentação submersa, serpentinas internas são instaladas de modo a não perturbarem o sistema de aeração dentro do fermentador.

Em semi-batch, o conteúdo de etanol deve ser controlado tal como o volume adicionado na alimentação. Os acetificadores estão equipados com um controlador lógico programável (PLC) que inicia a sequência de processos e realiza alguns controlos de concentração de álcool, ácido acético, temperatura entre outros.

A descarga do vinagre fermentado é iniciada automaticamente quando um valor de álcool residual, programável, for atingido. Esta deve ser realizada o mais rápido possível, para evitar a falta de etanol no meio. O carregamento da mistura de etanol e nutrientes, é feita num período de tempo mais longo. Este procedimento deve considerar as concentrações de ácido acético e etanol que podem ser prejudiciais à bactéria e permitir que estas recuperem para um próximo ciclo. Durante este processo, parâmetros como a temperatura, volume e fluxo de massa também devem ser controlados [40].

Centrifuga para espuma

Como não se consegue evitar a formação de espuma, alguns acetificadores estão equipados com uma centrifuga anti espuma mecânica denominada *Foamex*. Esta separa a espuma através de forças centrífugas [2], para evitar a diminuição da produtividade devido à formação de subprodutos prejudiciais à bactéria. Estes compostos são recolhidos num recipiente em separado para tratamento. Neste processo não são envolvidos químicos, o uso de anti espuma tem um impacto negativo na transferência de oxigénio e conseqüentemente na sua produtividade [19]. Outros, apenas expulsam a espuma juntamente com o ar, sendo que este ascende e a espuma descende, como representado na figura 2.6.



Figura 2.4-Esquema de separação de espuma sem centrífuga [41]

Normalmente esta espuma sofre um tratamento e é reciclada para o fermentador.

2.5.6 – Condensador de gases e *air-scrubber*

O equipamento de produção de vinagre pode conter um sistema de recuperação de voláteis constituído por um condensador e um *air-scrubber*. Primeiramente, o conteúdo em gás ascende e entra no condensador onde é possível recuperar parcialmente por diferença térmica, o ácido acético e o etanol perdido por evaporação. Para uma recuperação final, e também para reduzir o cheiro destes, um *air scrubber* adicional pode ser instalado. Este consiste numa coluna de enchimento, como observado na figura 2.7, que usa água de processo, para limpar os restantes compostos voláteis [19].



Figura 2.5-Representação de um *Air Scrubber* que aumenta a recuperação de etanol e ácido acético perdido por evaporação [41]

2.6 - Produção industrial de vinagre de álcool

Existem vários modos de operação para a produção de vinagre de álcool, dependendo da acidez pretendida no produto final.

As fermentações submersas industriais começam com um inóculo de vinagre não filtrado, que consiste num resíduo microbiologicamente indefinido de fermentações anteriores, com aproximadamente 5% de álcool e 7 a 10% de ácido acético [2].

O modo mais utilizado para produção de vinagre é o semi-batch, utilizado na obtenção de vinagre de álcool com acidez até 14% [42]. Neste processo, é alimentado ao fermentador, uma porção de mistura de álcool, entre 12 a 15 %, com os nutrientes necessários à fermentação acética. Depois de atingida acidez pretendida, nunca ultrapassando a concentração de álcool residual (0,05 a 0,3%), para evitar “*overoxidation*” das bactérias, é retirado o mesmo volume que foi alimentado de vinagre [3]. As variações da concentração de álcool, ácido acético e concentração total, ao longo da fermentação, encontram-se ilustradas na figura 2.8.

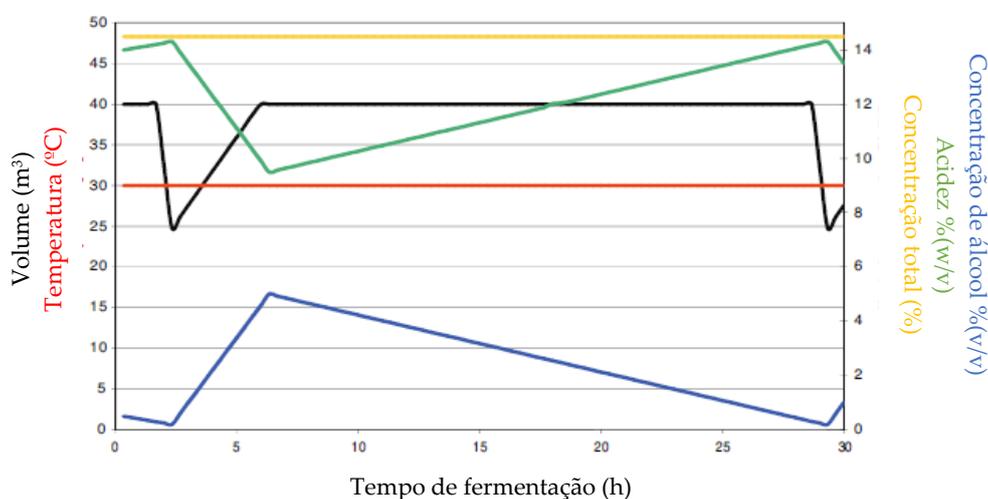


Figura 2.6-Variação da concentração de álcool, ácido acético e concentração total ao longo da fermentação acética na produção de vinagre em semi-batch [3]

É possível observar na figura 2.8, que enquanto a concentração total se mantém constante ao longo da acetificação, a concentração de álcool aumenta durante o período de carga, e diminui durante o processo de fermentação, sendo convertido a ácido acético. Neste processo, a temperatura é mantida próxima dos 30°C.

O volume de carga e de descarga nesta operação é um parâmetro discutido na área; industrialmente é comum que este volume consista entre 40-50% do volume do fermentador. [41,35] É de supor que quanto menor a carga, e conseqüente a descarga, mais rápida será a fermentação, devido à concentração de bactérias presentes no meio ser mais elevada, e à menor alteração das condições do meio (concentração de álcool e ácido acético) Desta maneira, seria de supor que o processo em modo contínuo seria possível.

No entanto a fermentação em contínuo apenas atinge uma acidez de 9 a 10%, devido à incapacidade de as bactérias de ácido acético crescerem a velocidade suficiente, em ambientes com baixa concentração de etanol e elevada concentração de ácido acético. Por outro lado, como este processo trabalha em condições críticas (0,3% de álcool) qualquer problema que surja pode levar à paragem do processo [19].

Também é possível a obtenção de vinagre de elevada acidez através do modo fed-batch. Este processo foi desenvolvido devido à elevada necessidade de vinagre de álcool com uma acidez superior a 15% [3]

A primeira carga deste processo é feita com uma parte de álcool e água em separado para diluir o líquido no fermentador. Como elevadas concentrações de álcool inibem o crescimento das bactérias, existe uma fase após a carga que dá a possibilidade às bactérias se adaptarem ao meio e produzirem biomassa para o resto do processo. Depois, etanol e nutrientes são adicionados em pequenas quantidades de maneira a aumentar a concentração de ácido acético, aumentando consequentemente a concentração total do meio como se pode observar na figura 2.9. A concentração de álcool é controlada através de um sensor de álcool.

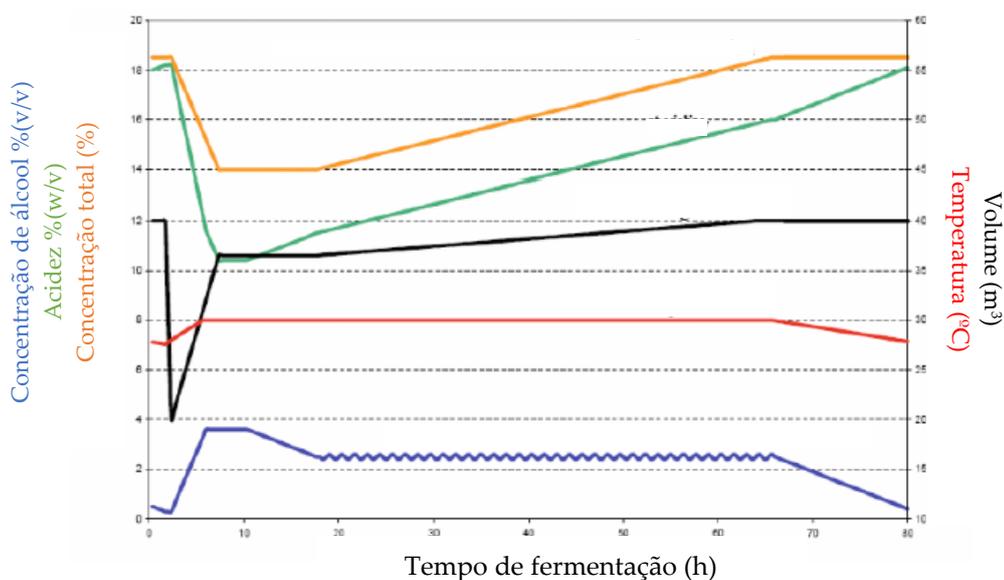


Figura 2.7-Variação da concentração de álcool, ácido acético e concentração total ao longo da fermentação acética na produção de vinagre em fed-batch [3]

Depois de introduzida a quantidade de álcool necessária, o processo de fermentação começa. Durante esta fase o resto do etanol oxida até 0,5%(v/v), valor de álcool residual que garante que as bactérias se mantenham vivas para o próximo ciclo. Parte do vinagre é descarregado e um novo ciclo começa [19]. A variação da concentração de álcool, acidez e total é ilustrada na figura 2.9.

Alguns produtores em Itália e Espanha usam um processo com dois fermentadores consecutivos de modo a aumentar a acidez do vinagre.

Fermentações acéticas conseguem ser feitas ao longo de vários anos sem interrupção ou diminuição de rendimento e eficiência, se as condições necessárias forem fornecidas [2].

Antes de ser armazenado para embalagem, o vinagre sofre uma filtração para separar as bactérias, não só para diminuir a turbidez do líquido, mas também para evitar a precipitação destas e de outros componentes, durante o tempo de armazenamento, de maneira a manter o produto estável [19].

Micro e ultrafiltração com membranas tangenciais, com diâmetro de poro reduzido (μm) são os métodos usados atualmente para este propósito [2,4].

Como o vinagre é uma substância de pouco valor comercial, os custos de filtração devem ser reduzidos. O uso exaustivo do filtro é um fator importante; mesmo que a formação de um filme nas membranas seja inevitável, reduzindo a taxa de filtração [2].

Metodologia, Materiais e Métodos

3.1 – Produção de um inóculo de vinagre de álcool à escala piloto

3.1.1 – Arranque do acetificador

Para este propósito foi usado um reator de 6 L, representado na figura 2.10, onde foi inserido um inóculo de vinagre de arroz com 1,30 % (v/v) de álcool e 10 % (m/v) de acidez disponibilizado pela empresa. Seguidamente o teor de álcool foi aumentado para 3,5 % (v/v) para providenciar as bactérias com substrato para a fermentação.



Figura 3.8- Representação do fermentador de 6L utilizado nos ensaios [5]

No depósito de carga foram colocados 20 L de álcool a 10,5 % (v/v) e os nutrientes comerciais de acordo com as suas especificações (1,1 a 1,3 g/L a 10% (m/v) de acidez).

Para que o processo se tornasse o mais económico possível, foram inseridos apenas 1,1 g/L (a 10% de acidez) de nutrientes comerciais, tanto no depósito de carga como no fermentador. A percentagem de álcool no depósito de carga foi alterada consoante a acidez pretendida.

A concentração de nutrientes foi aumentada gradualmente, com o intuito de obter uma produção constante com as características requeridas.

Como este acetificador não contém um sistema PLC que permita a descarga e carga automática, os testes de produtividade foram efetuados num acetificador industrial da empresa.

3.2- Otimização da produção de vinagre de arroz à escala industrial

Devido às dificuldades de produção de um inóculo para uso industrial e por falta de um sistema automático à escala piloto, foi necessário usar outro fermentado num acetificador industrial. A matéria-prima escolhida para estes testes foi fermentado de **arroz** sendo aquele mais desprovido de nutrientes devido à adição de álcool proveniente da destilação das borras do mesmo.

Os testes realizados para otimização foram efetuados num acetificador de 600 L da Cetotec tal como se encontra esquematizado na figura 3.11.

O ciclo começa quando é iniciada a carga de uma fração de fermentado para o reator, onde já se encontra vinagre produzido do batch anterior. Este volume de carga de fermentado e descarga de vinagre é igual, de modo a manter o volume de fermentação constante ao longo dos ciclos.

Apesar do volume do fermentador, este é normalmente operado entre os 500 e 550L devido à formação de espuma que ocorre durante a carga, e pela morte celular entre e durante ciclos. Como esta espuma influencia o sensor de nível, a carga pode sessar antes de ser atingido o volume pretendido. Para garantir que não existe variação do volume de carga entre ciclos, o volume de fermentação escolhido para os testes foi 450L.

O oxigénio fornecido para a reação é feito através da tubagem ligada a um filtro de ar. O fluxo de ar pode ser alterado através da válvula manual, representada figura 3.11. No entanto, este fluxo foi mantido constante a 4 Nm³/h em todos os testes. Este valor foi definido devido à experiência dos operadores neste fermentador, fornecedores e através de balanços mássicos que podem ser consultados no anexo B. Todas as tubagens de ar e respetivos aparelhos encontram-se representados a laranja na figura 3.11.

Como a reação catalisada pelas bactérias de ácido acético é exotérmica, existe uma necessidade de arrefecimento de modo a manter uma temperatura ótima à produção de ácido acético. O fermentador está equipado com um condensador de modo a minimizar as perdas de etanol e ácido acético ao longo do processo. A água utilizada neste condensador é proveniente de um *chiller* que também é responsável pelo arrefecimento da água que entra na serpentina do reator. Todas as tubagens e aparelhos de refrigeração encontram-se representados a azul na figura 3.11.

Este processo encontra-se automatizado por sistema PLC que aciona a descarga a um volume desejado, a um dado valor de álcool pré-definido, e carrega de seguida para o volume pretendido, considerando um valor mínimo e máximo de temperatura durante a carga.

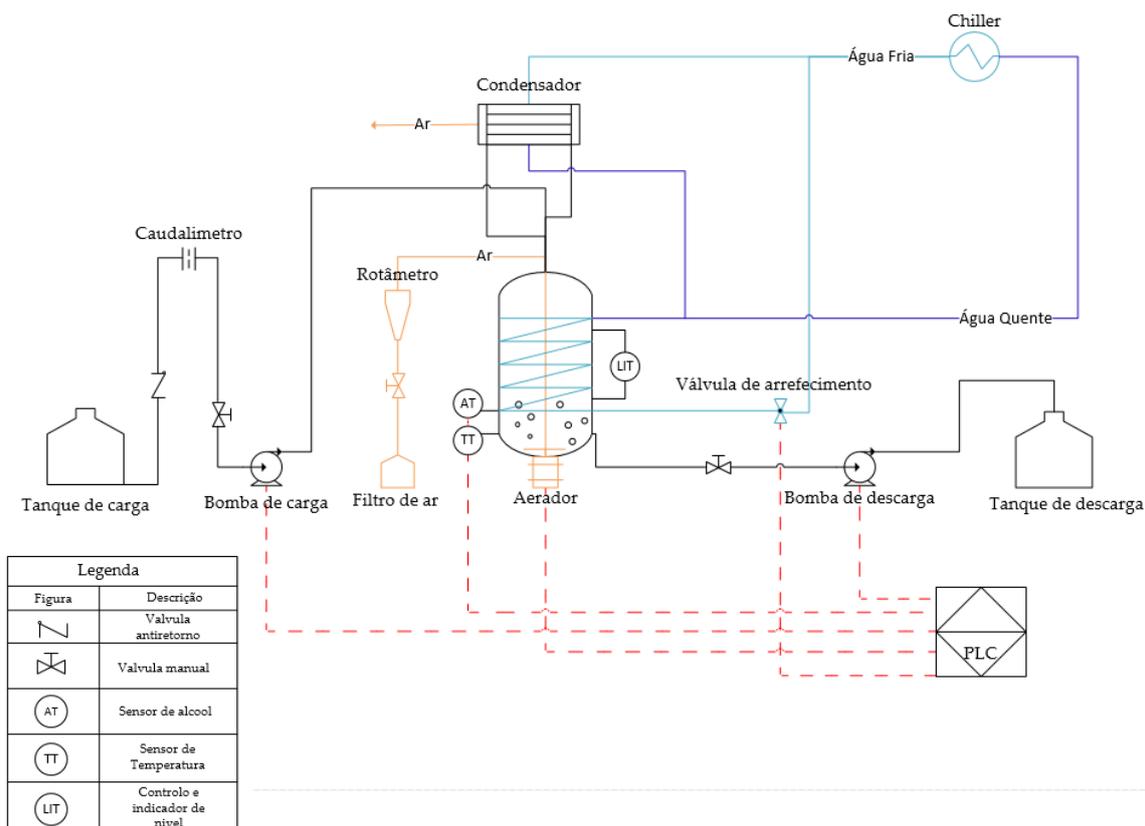


Figura 3.9-Esquema do processo industrial para produção de vinagre em semi-contínuo

No arranque, foi carregado no reator vazio, 400 L de inóculo de arroz disponível na empresa com 2,86 %(v/v) de álcool 10,15 %(p/v) de acidez. Foram realizados alguns ciclos até que estes fossem semelhantes entre si, aplicando os parâmetros que se encontram na tabela 3.1. Estes foram selecionados por experiência dos operadores.

Devido há necessidade das bactérias se adaptarem a novas condições do meio, foram realizados ciclos, que não constam na dissertação, após a alteração de alguma variável no processo. Estes deram oportunidade as bactérias de se adaptarem ao novo meio e começarem a realizar ciclos constantes, antes de estes serem considerados.

Tabela 3.1-Parâmetros aplicados para arranque do acetificador industrial

Parâmetros aplicados no arranque	
Volume de carga	150 L
Volume de fermentação	450 L
Volume do inóculo	300 L
Álcool residual	0,55 %(v/v)

As características do fermentado de arroz utilizado como carga de todos os testes encontra-se na tabela 3.2. Neste fermentado foram inseridos 0,53 g/L de nutrientes comerciais devido à escassez dos mesmos como já foi referido neste capítulo.

Tabela 3.2 - Características do fermentado de arroz para carga do fermentador

Características do fermentado de arroz para carga	
Álcool	13,3 % (v/v)
Acidez	0,7 % (p/v)
Nutrientes	0,53 g/L

A calibração do PLC foi realizada com o auxílio de um ficheiro excel fornecido pela Cetotec na compra do aparelho. Esta traça uma curva de calibração através da inserção de três valores de resistência, extraídos pelo PLC, associados a um valor de álcool. Através da medição da concentração de álcool exata destas 3 amostras, é inserido no PLC juntamente com o valor de resistência associado. A curva de calibração e respetivos valores de concentração de álcool e resistência podem ser consultados no anexo C.

3.2.1- Volume de carga e descarga

O primeiro teste a ser realizado foi a variação do volume de carga/descarga. Os volumes de carga testados foram $\frac{1}{2}$; $\frac{1}{3}$; $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{8}$ do volume de fermentação.

Em qualquer um destes, a percentagem de álcool final foi 0,5 % (v/v), sendo este valor pré-definido no PLC para a descarga do vinagre. O fluxo de arejamento foi 4 Nm³/h, constante ao longo de todos os ciclos.

Foram retiradas amostras ao longo dos ciclos para medição de álcool e acidez, para que fosse possível seguir a fermentação e retirar conclusões.

A análise da acidez de todas as amostras recolhidas foi feita por titulação com hidróxido de sódio (1 M), da marca VWR. O processo consiste na titulação de 6 ml de amostra, usando fenolftaleína como indicador.

Para a medição de álcool foram utilizados dois processos distintos. Quando as misturas apresentam um grau de álcool elevado foi utilizado o ebuliómetro, caso contrário, as medições foram efetuadas no acetocan. As medições feitas neste aparelho são baseadas em espectroscopia NIR que consegue quantificar a concentração de substâncias numa mistura. Este aparelho consegue medir a concentração de álcool entre os 0 e os 20% (v/v) [43].

Foi efetuada a calibração deste aparelho para vinagre de álcool. Esta consistiu na preparação de 5 soluções de ácido acético (99,8 % (m/v)) e álcool etílico (96 %

(v/v)) com concentrações dispersas ao longo do processo de fermentação e se encontram na tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Concentração das soluções de calibração do Acetoscan

Soluções	% Ácido Acético (p/v)	% Álcool (v/v)
1	9,90	0,48
2	8,00	1,44
3	8,85	2,40
4	7,05	3,36
5	5,90	4,80

De acordo com as instruções do aparelho, estes valores foram inseridos numa tabela providenciada pelo fornecedor. Esta consiste numa reta de calibração entre as soluções com concentração conhecida e as medidas pelo aparelho antes da calibração. A reta de calibração obtida e o respetivo R^2 são apresentados na equação seguinte:

$$y = -0,0684x + 0,2519; R^2 = 0,9342$$

3.2.2- Percentagem de álcool residual

Dado que as bactérias tendem a diminuir as suas taxas de produção de ácido acético a concentrações baixas de etanol no meio, foram comparados os cenários de 0,5%(v/v) de álcool residual na descarga com 1% (v/v) para testar a sua influência na produtividade. Foi apenas testado o volume de carga de 1/8 do volume de fermentação devido à escassez de tempo para ser realizada nos restantes volumes. Esta mudança consiste apenas na predefinição do álcool residual no sistema PLC.

3.3- Avaliação Económica

Na avaliação económica foram considerados 6 cenários de possível poupança para a Mendes Gonçalves comparando-os com a cenário actual de compra externa. Em todos estes cenários foram considerados preços constantes, uma taxa de juro de 2,65% [44], um imposto de selo de 4% [45] e uma taxa de atualização de 11% considerando o risco associado ao investimento.

4

Apresentação e discussão de resultados

A Mendes Gonçalves consome anualmente milhões de litros de vinagre de álcool com 20 %(m/v) de acidez para as suas produções internas de molhos. Este é posteriormente diluído para uma concentração de 10%(m/v) quando usado como matéria-prima. Atualmente este valor representa um gasto de milhares nesta matéria-prima.

Como a empresa tem o equipamento necessário para a produção interna de vinagre até 12 %(m/v) de acidez, pelo processo semi-batch, é essencial conseguir produzir um inóculo para iniciar a produção industrial. Este inóculo consiste num pequeno volume de meio contendo um elevado número de células viáveis na sua fase exponencial de crescimento [46]. Para que isto seja possível é fundamental encontrar um conjunto de parâmetros, que permita esta produção.

4.1- Produção do inóculo de vinagre de álcool à escala piloto

Comparativamente aos restantes vinagres, o fabrico de vinagre de álcool é particularmente difícil. O álcool é despromovido de nutrientes que normalmente se encontram nas restantes matérias-primas e existem poucos estudos sobre a sua produção. Por esta razão, foi escolhido o mesmo procedimento usado para outros vinagres, descrito no capítulo 3, para iniciar a produção num reator à escala piloto. Foi selecionado um inóculo de arroz, devido à sua semelhança com o vinagre de álcool comparativamente aos restantes disponíveis na empresa.

Após alguns ciclos no novo fermentador, foi feita uma carga de álcool com uma concentração 10,5 % (v/v) de álcool e 1,1 g/L de nutrientes (10 %(v/v) de álcool) em concordância com a especificação do fornecedor.

Segundo Lopez J. e Wood J., as bactérias acéticas apresentam longas fases *lag* com completa ausência de crescimento celular no início das fermentações [47]. A sua duração depende de vários fatores como a concentração inicial de substrato, produto, historial da cultura entre outras [42]. Estas fases devem-se à necessidade das bactérias se adaptarem ao meio depois da alteração das suas condições. Neste período de tempo, os microrganismos sintetizam as enzimas requeridas para degradação de substrato, gastando assim, a maior porção da sua energia para este fim, não sendo observada produção de ácido acético [46].

Em concordância, a concentração de 1,1g/L de nutrientes foi mantida durante 1 mês, devido tanto à escassez de informação sobre a duração desta fase, como à escassez de nutrientes na carga. Como não se registaram alterações neste período de tempo, a concentração de nutrientes foi aumentada para 1,3 g/l (10 % (v/v) de álcool).

No decorrer da semana seguinte, houve um aumento exponencial de acidez e conseqüente diminuição do álcool no meio, chegando a atingir taxas de produção de ácido acético de 0,15 % (m/v) ácido acético/h. No entanto, este cenário apenas ocorreu durante 3 dias até a sua produção cessar.

Devido as características da carga, atribuiu-se esta paragem a esgotamento de nutrientes, voltando-se a aumentar a sua concentração, registando sempre o mesmo cenário.

Para tentar despistar o arejamento ao fermentador como um fator limitante, o fluxo de ar foi aumentado de 0,04 bar para 0,05 bar, no entanto não foi observada diferença nas taxas de acidez.

Foi possível estabilizar a produção de vinagre de álcool, com taxas de acidificação de 0,2%(m/v) ácido acético. No anexo D encontra-se um resumo da alteração da concentração de nutrientes e relativas conseqüências. Como este acetificador não contém um sistema de PLC, não foi possível contabilizar ou manter os ciclos constantes durante as experiências, sendo que era efetuada uma carga sempre que necessário de modo a que os valores de descarga fossem atingidos durante o dia, para que esta fosse efetuada manualmente.

Diferentes espécies de bactérias acéticas têm diferentes necessidades nutritivas e a presença ou ausência de um nutriente essencial para as bactérias pode por vezes diminuir as taxas de fermentação. Devido à dificuldade de cultura, associada à identificação das mesmas no meio, existe pouca informação sobre as necessidades nutricionais de cada espécie [47].

O aumento progressivo das taxas de acetificação pode ser explicado por adaptação celular às condições de fermentação. A melhor estirpe de bactérias vai ser naturalmente selecionada, destacando-se o melhor caminho metabólico para a síntese de novas enzimas, aumentando a capacidade de fermentação e conseqüentemente as taxas de acetificação. Deste modo, ao aumentar o número de ciclos consecutivos obtém-se melhores taxas de acetificação e bactérias selecionadas [42]. É natural que bactérias selecionadas para produção de vinagre de álcool sejam menos sensíveis à escassez nutricional do meio.

4.2 – Protocolo de arranque otimizado

Após o acerto da concentração de nutrientes, necessário para a produção de vinagre de álcool, através do processo de habituação e seleção de bactérias provenientes dos reatores industriais da Mendes Gonçalves, efetuou-se uma experiência para determinar o período de transição expectável de uma matéria-

prima atualmente em produção, em particular o fermentado de arroz, para a produção de vinagre de álcool.

A estratégia seguida foi a introdução gradual da nova matéria-prima no depósito de carga através de um aumento sequencial iniciado com 33%, passando para os 66% e por fim a carga da nova matéria-prima pura. As características da de cada carga pode ser consultado no anexo E. Entre cada condição efetuaram-se 1 a 2 ciclos completos de produção de vinagre, conforme se pode verificar pelos resultados apresentados na no anexo E.

Até à introdução da nova matéria-prima pura, não se observaram reduções significativas no processo de acetificação com a exceção de uma quebra bastante considerável, fruto de uma descarga do ciclo anterior com muito pouco álcool residual.

Quando se efetuou a terceira adição da nova matéria prima pura, a fermentação acética passou por um período em que a atividade fermentativa foi muito baixa ou mesmo nula durante 8 dias. Este período de seleção e crescimento das bactérias mais apropriadas para a conversão da nova matéria-prima durou cerca de 15 dias. Durante o mesmo teve-se o cuidado de, sempre que a taxa de produção de ácido fosse nula, nunca deixar a concentração de etanol dentro do reator baixar dos 2,5% de modo a criar um meio propício à reação [39].

A partir do momento em que se verificou atividade fermentativa, após o período de seleção, os ciclos realizados foram progressivamente ficando mais curtos e a acidez à descarga aumentando. Como este reator não tem um condensador, existem grandes perdas por evaporação devido ao volume de fermentação reduzido (6 L) juntamente com 15 dias sem atividade o que provoca uma diminuição da concentração total.

Com base nos resultados da experiência podemos concluir ser necessário um período de adaptação /seleção das bactérias acéticas à nova matéria-prima nas condições descritas de cerca duas semanas.

A influência do tempo dispensado no processo de arranque no custo final é bastante significativa. Assim, um bom controlo desta etapa determina, conseqüentemente, a sua produtividade [46].

No decorrer das experiências, não foi possível produzir inóculo suficiente para o arranque à escala industrial. Neste subcapítulo é feita uma estimativa de custos e de tempo até à produção do inóculo e à implementação do processo industrial. Esta estimativa considera que a produção de vinagre de álcool será feita com os parâmetros otimizados nesta dissertação.

Para produzir quantidade suficiente de inóculo para um reator de 10 000 L de capacidade são necessários 1 000 L de inóculo. Estes poderão ser produzidos no fermentador de 600 L com um inóculo proveniente do reator piloto de 6 L. São necessários 100 L de inóculo para o arranque do fermentador de 600 L.

Com base nos dados experimentais de introdução de uma nova matéria-prima, foi considerado que seriam necessários 15 dias para o arranque do

fermentador de 6 L e apenas 3 dias de arranque, tanto no reator de 600L, como no de 10 000L devido aos seus inóculos já serem constituídos por estirpes de bactérias selecionadas à produção de vinagre de álcool. Os dados relativos à produção do inoculo são apresentados na tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Dados relativos à produção do inoculo para um reator de 10 000 L

Volume do fermentador (L)	Tempo de arranque (h)	Tempo de ciclo (h)	Tempo de produção de inoculo (h)
6	360	21,5	600
600	72	21,5	215
10 000	72	21,5	-

Assim, consegue-se estimar que iria demorar aproximadamente 72 dias para produzir um inoculo para um fermentador de 10 000 L. Devido à sensibilidade das bactérias, é apresentado na tabela 4.5, uma previsão otimista, realista e pessimista do tempo necessário para a produção de um inoculo para o arranque à escala industrial.

Tabela 4.5 – Previsão otimista, realista e pessimista da produção do inoculo para arranque à escala industrial

Previsão	Tempo de produção de inoculo (dias)
Otimista	68
Realista	72
Pessimista	86

Os custos de produção deste inoculo apresentam-se na tabela 4.6, os quais não consideraram o impacto da paragem de produção de outros tipos de vinagre nos acetificadores usados na produção do inoculo.

Tabela 4.6 - Custo de produção do inoculo para fermentador de 10 000L

Custos	Inoculo para fermentador de 600 L	Inoculo para fermentador de 10 000L	Arranque do fermentador de 10 000 L
Nutrientes (€)	1,15	11,51	-
Álcool (€)	9	90	-
Acetificação (€)	0,83	41,73	86,4

Considerando um cenário pessimista, e iniciando o arranque dia 1 de janeiro de 2019, o arranque à escala industrial estaria completo dia 28 de março de 2019, com um custo associado de 241 €.

O chiller instalado no fermentador de 600L, não foi comprado especificamente para este propósito, apresentando uma potência de 7,5K.h. No entanto, num ciclo com 21,5 h, com uma concentração de ácido acético na carga

de 70 g/L, e uma concentração de 124 g/L na descarga, são formadas 24 300 g de ácido acético num ciclo com 1/3 de carga em 450 L de meio de fermentação.

Como a energia de reação é de 493 KJ/mol, a potência necessária para o arrefecimento seria apenas de 2,6 KW.

Como é possível confirmar, a potência do chiller é bastante superior à necessária promovendo o aumento dos custos de produção neste acetificador. Deste modo, foi considerada que a potência do chiller seria de 2,6 KW nos custos de produção do inoculo para o fermentador de 10 000L. Como a água de arrefecimento anda em circuito, e como o equipamento não perde água numa quantidade significativa [48], não foi considerado o custo desta utilidade.

Os restantes acetificadores são arrefecidos por uma torre de arrefecimento cujo gasto energético não foi calculado por escassez de dados.

4.3 – Otimização da produção de vinagre

O processo de produção de vinagre em semi-batch pode ser otimizado alterando alguns parâmetros no processo.

O arejamento do meio é um dos mais importantes devido à necessidade de um fluxo ótimo de oxigénio no meio de fermentação. Caso seja em excesso, vai aumentar a quantidade de álcool e ácido acético perdido por evaporação; caso o fermentado esteja carenciado, as taxas de fermentação acética vão ser menores.

Como as bactérias diminuem as suas taxas de produção de ácido acético em meios de concentração de álcool baixas [47], é necessário encontrar em equilíbrio entre o álcool residual no vinagre e a acidez desejada para maior produtividade.

A Mendes Gonçalves mantém os seus acetificadores a uma temperatura de fermentação de 31°C controlada por um sistema PLC, temperatura considerada ótima para a fermentação acética. [35]. No entanto, de acordo com Rubio-Fernández et al., 2004, ao aplicar um gradiente de temperatura durante o processo de acidificação, a produtividade aumenta 15 a 20%, para vinagre de vinho. É sugerido, para início da fermentação para uma concentração de 9% (m/v) de ácido acético, uma temperatura de 32°C para taxas de produtividade superiores. Quando a concentração de ácido atingisse os 10% (m/v) seria apenas necessária uma temperatura de 28°C para não causar danos à bactéria que se encontra num meio com concentração elevada de ácido acético [35].

Por fim, o volume de carga e descarga do processo, que influencia a gama de álcool e acidez a que as bactérias vão produzir ácido acético. Este parâmetro será discutido ao longo deste capítulo.

Apesar da necessidade de otimização dos restantes parâmetros, o tempo de adaptação das bactérias a novas condições, juntamente com os demorados tempos de ciclo, impossibilitou o estudo de outras variáveis de interesse.

4.3.1- Otimização do volume de carga/descarga à escala industrial na produção de vinagre de arroz em modo Semi-Batch

O processo industrial envolve a escolha de um volume de carga e de descarga e, como consequência, a escolha da gama de acidez e álcool a que as bactérias trabalham durante o processo de acetificação, e a sua concentração inicial no início do ciclo. Foram realizados testes de produtividade com rácios de volumes díspares, os quais se encontram representados na tabela 4.7.

Tabela 4.7 - Volumes definidos para cada rácio de volume de carga/fermentação

Rácio	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$
Volume (L)				
Volume de fermentação	450	450	450	450
Volume de carga/descarga	225	150	113	56
Volume de inoculo	225	300	337	394

A escolha destes rácios para os testes de otimização deveu-se à experiência dos operadores e consiste numa tentativa de aproximação ao método contínuo. Como foi referido no subcapítulo 2.7, no método contínuo, a descarga de vinagre no final do ciclo é menor, o que propõe que a quantidade de bactérias a permanecerem dentro do fermentador é superior, o que poderá significar melhores taxas de produção de ácido acético, apesar da concentração de ácido acético no início do ciclo ser superior.

Ao alterar o volume de carga, a concentração inicial de álcool e de ácido acético de cada ciclo é diferente, apesar da concentração total se manter constante. Deste modo quanto maior for o volume de carga, maior será a concentração inicial de álcool no meio e menor será a concentração de ácido acético. Ou seja, as bactérias acéticas irão trabalhar numa gama de álcool superior quanto maior for o volume de carga. É apresentada na tabela 4.8, a percentagem volumétrica de etanol e de ácido acético no início de cada ciclo e a respetiva concentração total.

Tabela 4.8 - Valores teóricos da concentração de etanol, ácido acético e total no início de ciclo com diferentes rácios de carga/descarga considerando um cenário ideal com base nos balanços do anexo B.

Rácio	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$
Componentes				
% (v/v) Etanol	6,65	4,43	3,34	1,66
% (v/v) Ácido acético	7,32	9,53	10,63	12,31
Concentração total %/(v/v)	13,97	13,97	13,97	13,97

Através dos dados obtidos do PLC correspondentes à evolução do etanol ao longo do ciclo, e através da análise de acidez de amostras retiradas de hora a hora, durante o tempo laboral, foi possível representar os ciclos com dados do reator de 600 L com as características indicadas no capítulo 3. Para que fosse possível comparar diferentes volumes de carga, sem ter em consideração o período de adaptação das bactérias como uma variável, foram escolhidos 4 ciclos para cada um dos volumes de carga, após estes começarem a estabilizar, proporcionando assim a adaptação das bactérias às novas condições no meio. A figura 4.12 representa os 4 ciclos correspondentes ao volume de carga de 1/3 do volume de fermentação.

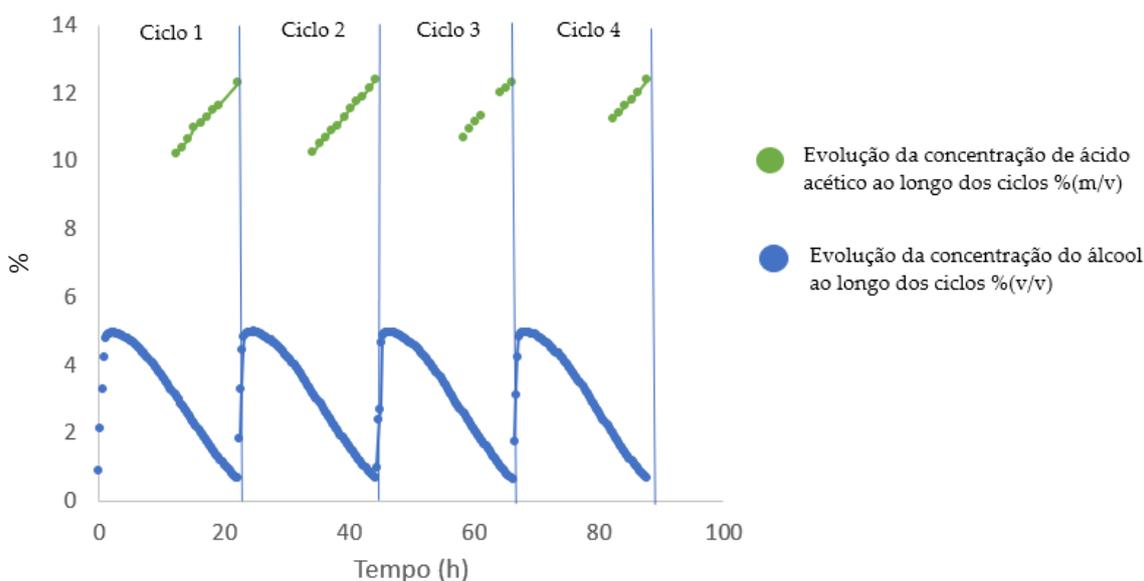


Figura 4.10-Evolução do álcool e do ácido acético ao longo dos ciclos para um volume de 1/3

Como pretendido, os ciclos são muito semelhantes entre si, como se pode observar na tabela 4.9 onde são exibidos os dados relativos aos ciclos representados na figura 4.12.

Tabela 4-9- Dados de 4 ciclos, depois de um período de adaptação das bactérias às novas condições do meio para o volume de carga de 1/3 do volume de fermentação

Ciclos	Tempo de ciclo (h)	Álcool inicial % (v/v)	Tempo de carga/descarga (h)	Volume de descarga (L)
1	22,25	4,73	2,5	150
2	21,75	4,75	2,25	150
3	21,25	4,75	2	150
4	21,25	4,74	2,25	150

Como não existem diferenças significativas entre os ciclos, foi feita uma média dos mesmos, para que fosse possível fazer uma comparação com os restantes volumes de carga. Estas médias entre os ciclos encontram-se discriminadas na tabela 4.10.

Tabela 4.10 – Dados correspondentes a um ciclo com rácio de volume de 1/3

Rácio	Tempo de ciclo (h)	Álcool inicial % (v/v)	Tempo de carga/descarga (h)	Volume de descarga
1/3	21,63	4,74	2,25	150

O mesmo foi feito para os restantes rácios de volumes, cujos dados obtidos se encontram resumidos na tabela 4.11 e a representação dos 4 ciclos de cada rácio de volumes encontra-se na figura 4.13. Os dados dos restantes ciclos podem ser encontrados no anexo F.

Tabela 4.11- Resumo dos dados obtidos durante 4 ciclos nas diferentes condições.

Rácio	Tempo de ciclo (h)	Álcool inicial % (v/v)	Tempo de carga/descarga (h)	Volume de descarga (L)
1/3	21,63	4,74	2,25	150
1/4	16,63	3,67	1,19	113
1/8	14,25	1,80	1,56	56

Não foram obtidos resultados práticos para o volume de carga de 1/2, pois após esperar 3 semanas pelo seu arranque, não foram registados aumento da acidez no meio.

Neste processo era esperada uma desaceleração das taxas de produção de ácido, não só devido à descarga de metade das bactérias que se encontram no acetificador, diminuindo a quantidade de bactérias viáveis que permanecem no reator para o batch seguinte para metade, mas também devido à elevada concentração de etanol no início do ciclo inibindo o crescimento bacteriano [38].

Segundo Gullo, 2014, quanto maior for a gama de álcool na acetificação, maior será a quantidade de espécies de bactérias que se encontram a produzir ácido acético o que pode significar uma maior número de necessidades nutricionais distintas [39].

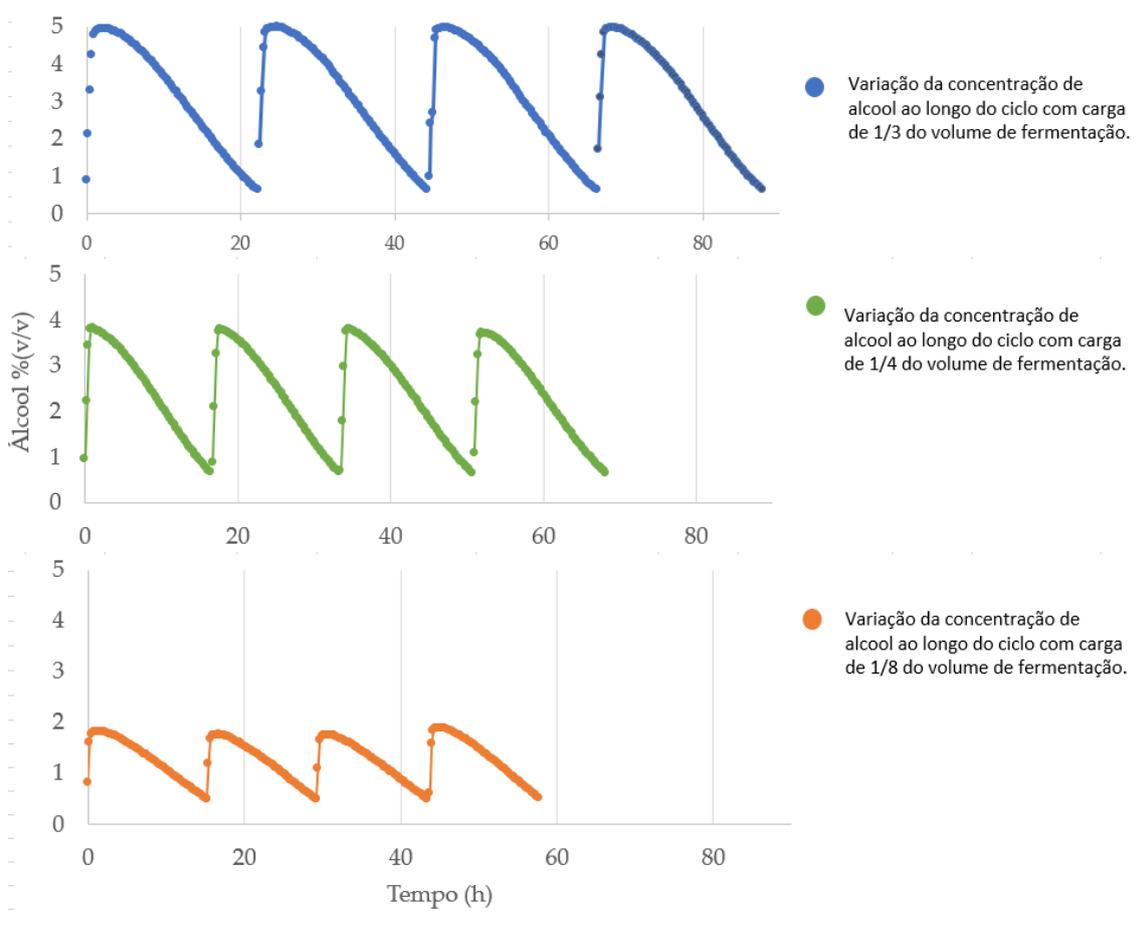


Figura 4.11-Representação dos ciclos com 1/3, 1/4 e 1/8 de volume de carga

Como é possível observar na figura 4.13, quanto maior for o volume de carga, maior será a concentração de álcool no meio no início do ciclo, e conseqüentemente, o ciclo será mais longo; por outro lado o volume de vinagre produzido é superior. Para quantificar a produtividade de cada um destes cenários, foi feita uma razão entre o volume produzido (L) e o tempo de ciclo (h), de acordo com a equação 4.1. Os resultados são apresentados na tabela 4.12.

Equação 4.1-Formula para o cálculo da produtividade de cada rácio de volumes.

$$\text{Produtividade} = \frac{\text{Volume produzido por ciclo (L)}}{\text{Tempo de ciclo (h)}}$$

Tabela 4.12- Produtividade dos diferentes rácios de volumes.

Volume	Tempo de ciclo (h)	Volume de descarga (L)	Produtividade (L/h)
1/3	21,63	150	6,94
1/4	16,63	113	6,80
1/8	14,25	56	3,97

Foi feito um teste estático para avaliar se existiam diferenças significativas na produtividade para cada uma das condições. Para este propósito foi usado uma ANOVA com 1 fator a 4 níveis, juntamente com um teste LSD (*Least Significance Difference*) ou teste de Fisher. Os resultados de ambos os testes afirmam que todos os volumes de carga apresentam diferenças significativas entre si em termos de produtividade. Os cálculos necessários a estes testes podem ser consultados no anexo G.

Consultando a tabela 4.12, podemos observar que a condição de 1/3 de volume de carga é aquele que proporciona um maior número de litros por hora, ou seja, é a condição mais produtiva.

O volume $\frac{1}{8}$ é aquele que mostra menos produtividade e que apresenta um maior desvio em relação aos restantes. Com volumes inferiores de carga e descarga, existe uma maior formação e acumulação de espuma devido à morte celular e a resíduos da fermentação. Estes são descarregados em menor volume comparativamente às restantes experiências. Esta formação de espuma não só prejudica as bactérias que se encontram funcionais, como não facilita o controlo de volume de fermentação do reator, mais significativo para volumes pequenos. Esta falta de controlo no volume de carga e descarga, não permite ciclos com o mesmo volume, o que incita uma constante adaptação das bactérias a novas concentrações.

Devido à pouca sensibilidade do sensor de volume para volumes de carga pequenos e à interferência da espuma, o volume de carga/descarga foi inferior ao valor programado. Com base na média do álcool inicial dos 4 ciclos selecionados, foi calculado o volume real a partir do sistema de equações descrito na equação 4.2

Equação 4.2 - Sistema de equações para cálculo do volume de carga real

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{Alcool inicial \%} \left(\frac{v}{V} \right) = \frac{(\text{Volume de inoculo (L)} * \text{alcool residual \%} \left(\frac{V}{V} \right)) + (\text{Volume de carga(L)} * 13,3\%)}{\text{Volume de fermentação}} \\ \text{Volume de carga (L)} + \text{Volume de inoculo(L)} = \text{Volume de fermentação (L)} \end{array} \right.$$

Foi possível concluir que o volume carregado foi de apenas 45,7 L, diminuindo consideravelmente a produtividade da condição para 3,24 L de vinagre por hora.

Como a carga tem um volume inferior, o ciclo é iniciado com mais ou menos 2 % (v/v) de álcool, o que mantém as bactérias a produzir a baixas concentrações de substrato proporcionando taxas de produção de ácido inferiores. Existe também uma inibição por ácido acético devido às altas concentrações durante todo o ciclo [39].

Podemos afirmar que numa tentativa de aproximação ao método contínuo existe uma maior quantidade de células no início da fermentação, contudo esta não compensa a morte celular e acumulação associada à elevada concentração de ácido durante o ciclo, a baixa concentração de álcool e os pequenos volumes de descarga.

No que diz respeito aos volumes de carga de 1/3 e 1/4, apesar de muito semelhantes entre si, a condição de 1/3 é mais produtiva. Como as condições dos dois testes são muito semelhantes, foi considerado que o volume de carga 1/3 do volume de fermentação será o melhor devido aos dados experimentais.

Por outro lado, quanto maior for a concentração de álcool durante a acetificação, maior vai ser a percentagem de álcool e ácido acético perdida por evaporação.

Utilizando as características da carga usada nos testes práticos, representadas na tabela 3.3, capítulo 3, foi calculado a quantidade de ácido acético esperado num cenário ideal, ou seja, apenas considerando a estequiometria da reação para todos os rácios de volume carga/fermentação. Este balanço não só não contabiliza as perdas de etanol e ácido acético por evaporação e arrasto, como também não considera o álcool residual no vinagre, necessário para evitar “overoxidation”. A massa de ácido acético produzida neste cenário ideal e as retiradas experimentalmente são apresentadas na tabela 4.13. Os cálculos destas perdas encontram-se no anexo H.

Tabela 4.13 - Massa de ácido acético esperada e real para os diferentes volumes de carga

Rácio	Ácido acético Ideal (Kg/ciclo)	Ácido acético Prática (Kg/ciclo)	Perdas (Kg/ciclo)	%
1/3	21,58	20,00	1,58	7,32
¼	16,26	14,75	1,51	9,29
1/8	8,06	6,77	1,29	16,00

Ao analisar os dados da tabela 4.13, podemos afirmar que quanto maior for o volume de carga, a diferença existente em relação ao cenário ideal vai ser superior. Ao realizar uma carga de volume superior, iremos iniciar o ciclo com uma maior concentração de álcool no meio, e conseqüentemente iremos ter um ciclo mais longo, ambas as condições permitem uma maior evaporação de álcool durante o período de acetificação.

Assim, o volume de 1/8 é aquele que apresenta menor perda em quantidade, mas uma maior perda por evaporação em percentagem. Taxas de acetificação inferiores proporcionam uma maior evaporação já que o álcool não é consumido tão eficazmente, podendo proporcionar uma diminuição da concentração total. Esta diferença na concentração total juntamente com a formação de espuma, proporcionou diferença de 1º de acidez na descarga como se pode observar nos dados da tabela 4.14.

Tabela 4.14 – Concentração em % (m/v) de ácido acético no vinagre para as diferentes condições

Volume de carga	Acidez de descarga %(m/v)
1/3	12,39
¼	12,35
1/8	11,35

O fermentador utilizado para as experiências está acoplado a um condensador que recupera 60% dos compostos evaporados [40]. Ou seja, os valores da tabela 4.14 são as conseqüências de apenas 40% das perdas de álcool e ácido acético perdidos por evaporação.

4.3.2- Análise à carga

Considerando que o tempo de carga ainda é longo, é expectável que as bactérias continuem a produzir ácido acético durante este intervalo de tempo. Apesar da carga ser controlada pelo sistema PLC, para que a temperatura não diminua mais do que 29,5°C, é natural que as taxas de produção de acidez diminuam devido à mudança do meio. Foi feita uma análise durante a carga dos diferentes rácios de modo a quantificar esta diminuição. Foram retiradas

amostras do meio de 10 em 10 min durante o processo de carga do fermentador de modo a tentar quantificar o quanto as bactérias são afetadas durante este período. Foi então possível criar o gráfico representado na figura 4.14, onde a evolução da acidez do meio é representada, tal como a diminuição da acidez expectável durante a carga. Foi também possível representar o aumento do álcool durante a carga, representado na figura 4.14.

Como é possível observar na figura 4.14, a diminuição da acidez nos dois cenários é praticamente igual. Podemos assumir que o tempo de carga é um período onde as bactérias acéticas não se encontram a produzir ácido de um modo significativo. Logicamente, quanto maior for o tempo de carga, maior será o tempo de paragem.

Este cenário repetiu-se para os volumes de $\frac{1}{4}$ e um $\frac{1}{8}$. Não foi possível reproduzir a experiência para o volume de $\frac{1}{2}$, dado que, em todo o processo, não foi registado aumento de acidez.

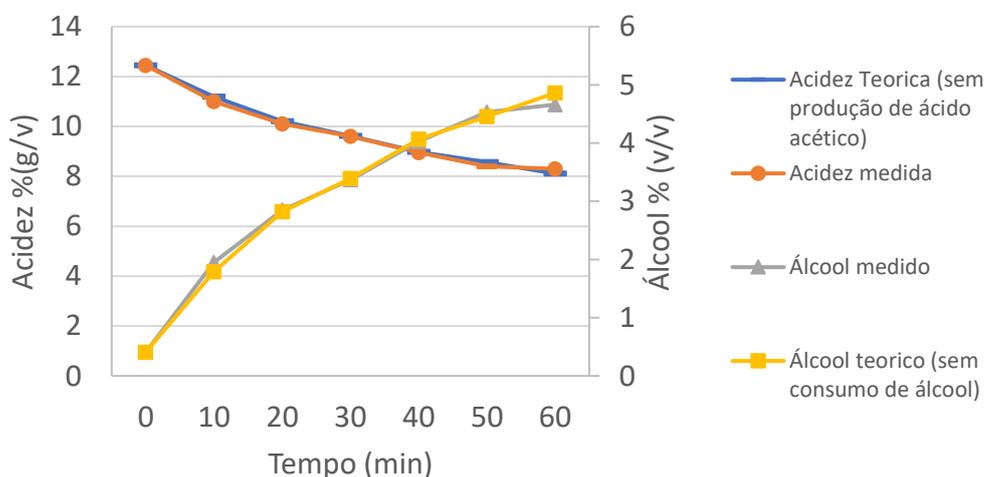


Figura 4.12- Evolução da concentração de ácido acético e álcool durante a carga para o volume de $\frac{1}{3}$ comparativamente com as suas concentrações teóricas

4.3.3- Percentagem de álcool residual

O vinagre de arroz comercializado contém 5% de acidez, no entanto este é produzido com uma percentagem de acidez mais elevada para que seja mais produtivo e para existir uma poupança de espaço na produção e armazenamento. Assim sendo, todo o vinagre produzido sofre uma diluição pós-filtração, para ser vendido ao grau desejado.

Foi feito um estudo no que diz respeito ao álcool residual, já que não existe uma necessidade direta de atingir concentrações de álcool tão baixas. Foi programado no sistema PLC para a descarga ser iniciada com um álcool residual de 1 % (v/v) com uma carga de $\frac{1}{8}$ do volume de fermentação. Esta experiência

foi realizada com este volume de carga devido ao seu curto tempo de ciclo. Este teste deveria ter sido realizado para todos os outros volumes de carga considerados nesta dissertação, mas devido à falta de tempo ficaram por realizar.

Tal como nas restantes condições, foram selecionados 4 ciclos, após a adaptação das bactérias às novas condições. Os dados resumidos dos ciclos são apresentados na tabela 4.15 e representados na figura 4.13.

Tabela 4.15 - Média os dados relativos aos 4 ciclos realizados, com volume de carga de 1/8 do volume de fermentação com 1% (v/v) de álcool residual na descarga.

Tempo de ciclo (h)	Álcool inicial %(v/v)	Tempo de carga/descarga (h)	Volume de descarga (L)
4,63	1,39	0,56	56

Previsivelmente, o tempo de ciclo é inferior ao dos restantes volumes testados, devido a metade do álcool carregado ser descarregado no vinagre sem sofrer acetificação.

Como se pode observar na figura 4.15, e consultar no anexo I, o álcool inicial nem sempre é o mesmo, e inferior ao expectável, devido às dificuldades associadas ao carregamento de volumes tão pequenos de fermentado e à espuma resultante da morte celular, que se acumula devido à pequena quantidade de volume descarregada em semelhança ao sucedido previamente com este volume de carga com álcool residual de 0,5%(v/v).

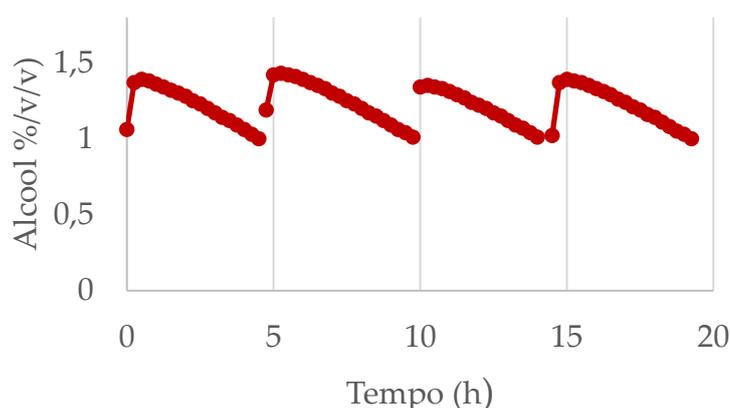


Figura 4.13-Evolução da concentração de álcool em 4 ciclos, com um volume de carga de 1/8 do volume de fermentação com uma descarga com 1% (v/v) de álcool residual.

De modo a superar estas interferências, foi calculado o volume de carga real através da média da percentagem volumétrica do álcool inicial dos 4 ciclos selecionados, tal como realizado anteriormente para a condição de um 1/8 de volume de carga com 0,5%(v/v) de álcool residual, através da equação 4.2. Com

este cálculo, admitiu-se que a carga efetuada apenas correspondeu a 14,3L, diminuindo a produtividade.

Como a carga de volumes pequenos provoca problemas no controlo, impedindo uma análise conclusiva, foi comparado a produtividade deste com a produtividade dos restantes volumes testados. Na tabela 4.16 são apresentadas as produtividades de todos os cenários considerados.

Tabela 4.16 - Comparação entre os valores de produtividade para os restantes volumes com álcool residual de 0,5%(v/v) e o volume de carga 1/8 com 1%(v/v) de álcool residual.

Volume %(v/v) de álcool residual	Produtividade (L/h)
1/3 (0,5%)	6,94
¼ (0,5%)	6,80
1/8 (0,5%)	3,24
1/8 (1%)	3,17

Ao comparar a produtividade deste cenário com os restantes volumes com um álcool residual na descarga de 0,5% (v/v) conseguimos perceber que ao descarregar o vinagre com uma maior quantidade de álcool não será mais produtivo para um volume de 1/8. No entanto será interessante refazer a experiência em condições de fermentação menos problemáticas e mais estáveis. Sem experiências adicionais, a probabilidade de existir uma concentração de etanol residual que embora torne a conversão de etanol em ácido acético mais rentável, apenas do ponto de vista de matéria-prima, é possível existir uma vantagem económica se existir uma taxa média de acetificação por ciclo de produção que favoreça o processo produtivo em termos de gastos energéticos.

4.4-Avaliação económica

De acordo com os dados da Mendes Gonçalves, o consumo interno de vinagre de álcool teve um aumento a uma taxa média anual de 16% e é esperado que o consumo continue a aumentar devido ao crescimento da produção de molhos na empresa. Na figura 4.16, encontra-se representada uma estimativa realista, otimista a pessimista do consumo interno deste vinagre. Devido à confidencialidade dos dados da empresa, os valores quantitativos do consumo são apresentados no anexo J.

Atualmente, o vinagre de álcool adquirido pela empresa apresenta um grau de acidez de 21 %(m/v). Uma porção é posteriormente diluída para a produção de molhos e outra é revendida. Como este produto representa um gasto na ordem dos milhares de euros anuais, foi feito um estudo económico para avaliar o cenário de produção interna de vinagre de álcool com uma acidez de 12 %(v/v), comparando-o ao atual. Não foi considerada a hipótese de atingir a mesma acidez do fornecedor pois seria necessário um modo de produção em fed-

bacth, o qual não foi estudado. Para esta avaliação foram usados os valores otimizados do subcapítulo 4.3.

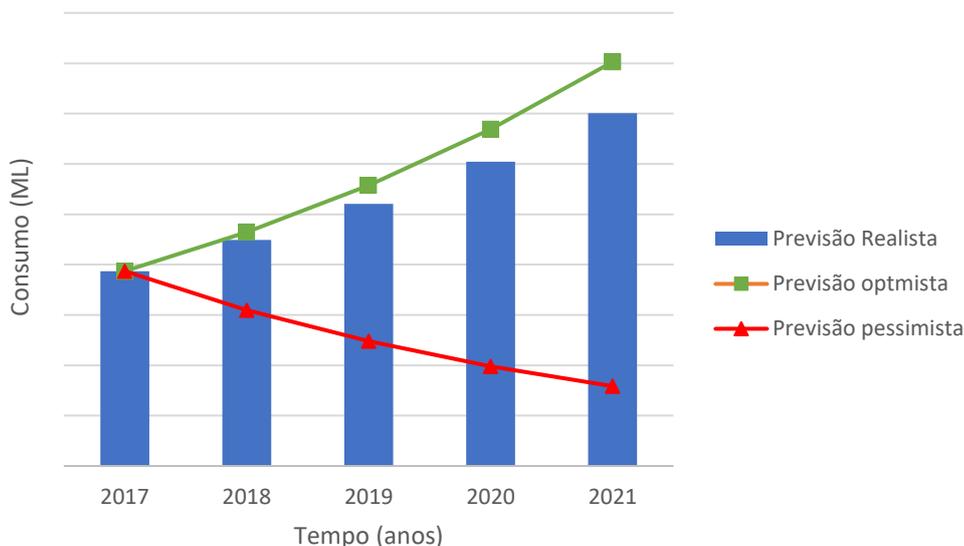


Figura 4.14-Estimativa realista, otimista e pessimista do consumo interno de vinagre de álcool a 21 %(m/v).

É apresentado no anexo K, o preço das matérias-primas, das utilidades e do vinagre por compra externa que deram origem a esta análise.

Na tabela 4.17 são discriminados os custos de produção de 1 L de vinagre de álcool a 12%, num fermentador de 10 000 L da empresa segundo os dados adquiridos experimentalmente e disponíveis na empresa.

Tabela 4.17 – Custos de produção interna de vinagre de álcool a 12% (m/v)

Custos	€/L de vinagre de álcool a 12%(m/v)
Matéria-prima	0,09
Nutrientes (inoculo externo)	0,0049
Nutrientes (bactérias internas)	0,0117
Acetificação	0,031
Filtração	0,00024

Os custos de acetificação consideram a energia gasta pelo fermentador como a bomba de carga e descarga juntamente com o sistema de refrigeração e aerador. Nos custos de filtração apenas foram considerados os consumos energéticos do filtro. Não foram considerados os custos das utilidades porque o consumo de água pelo sistema de refrigeração não é significativo dado que esta se encontra num circuito fechado como apresentado na figura 3.9 do capítulo 3.

Como todos os fermentadores à exceção do 600L se encontram ligados a uma torre de arrefecimento, os custos energéticos e de utilidades não foram considerados por falta de dados sobre a torre.

Como a empresa adquire o vinagre com uma acidez de 21% (m/L), e a sua produção seria com uma acidez de 12 % (m/v) foi calculado o custo de cada um por grau de acidez (€/L.^o de acidez), através dos dados da tabela 4.17 e os apresentados no anexo K. Desta maneira foi possível concluir que a produção interna representa uma poupança de 9,9%/ano.

Para que a produção consiga cobrir todo o consumo interno, seria necessário um fermentador de 40 000 L. Apesar da empresa possuir equipamento com esta capacidade a produção dedicada de vinagre de álcool iria provocar uma quebra de grande dimensão na produção de outros tipos de vinagre, sendo que o vinagre de álcool consegue ser adquirido por via externa enquanto que os restantes não.

Deste modo, foi considerada a ocupação de um reator de 10 000 L ou a compra de um acetificador de maior proporção que consiga responder às necessidades da empresa na totalidade.

No anexo J são apresentadas a capacidade de todos os fermentadores da Mendes Gonçalves e a sua respetiva produção anual. É de notar que os fermentadores se encontram em constante mudança de matéria-prima e sofrem uma limpeza de 3 horas, 6 vezes por ano, o que, apesar de pouco significativa, provoca uma diminuição na produção.

Neste momento a Mendes Gonçalves apresenta uma taxa de ocupação de 71% sem a produção de vinagre de álcool, aumentando para 86% com a implementação da produção interna de vinagre de álcool num acetificador de 10 000L. A tabela 4.18 apresenta uma análise de sensibilidade da taxa de ocupação ao aumento da procura de outros vinagres.

Tabela 4.18 - Análise de sensibilidade às variações na procura de outros tipos de vinagre

Variação do mercado de vinagre (%)	Com produção de vinagre de álcool	Sem produção de vinagre de álcool
	Taxa de Ocupação da Mendes Gonçalves	
-40%	52%	43%
-30%	60%	50%
-20%	69%	57%
-10%	77%	64%
0%	86%	71%
10%	95%	78%
20%	103%	86%
30%	112%	93%
40%	120%	100%

Como é possível observar na tabela 4.18, num cenário de um acetificador dedicado à produção de vinagre de álcool, um aumento de 10% na procura de outros tipos de vinagre, coloca a empresa numa taxa de ocupação de 95%.

Apesar da escolha do acetificador, seria necessário ponderar as bactérias para o arranque do processo industrial. Dada a possibilidade de compra de um inoculo de bactérias selecionadas para a produção de vinagre de álcool que, de acordo com o fornecedor, requerem uma adição menor de nutrientes (1,3g/L) e proporcionam um arranque mais rápido; ou a aplicação do protocolo de arranque otimizado descrito no subcapítulo 4.2 com seleção interna bactérias disponíveis na empresa.

Para encontrar a solução mais rentável para a empresa, foram considerados 6 cenários possíveis para a produção interna de vinagre de álcool a 12%(v/v) na Mendes Gonçalves. Não foram consideradas series de produção, devido ao tempo e aos custos de arranque associados.

Cenário A

Arranque através da seleção interna de bactérias, para um acetificador de 10 000L da empresa.

Este cenário é uma solução imediata sem grandes custos associados, já que a empresa possui o equipamento necessário à produção. No entanto, apenas consegue responder a 40% do consumo interno, continuando a comprar 60% do vinagre de álcool consumido. Na tabela 4.19, são apresentados os custos anuais de produção de vinagre de álcool a 12%(m/v) com seleção interna de bactérias.

Tabela 4.19 - Custo anual no ano de arranque da produção de vinagre de álcool com 12%(m/v) de acidez num fermentador de 10 000L com bactérias da empresa.

Custo	€/ano	%
Arranque	241	0,16
Matérias-primas	141 048	92,6
Acetificação e Filtragem	11 047	7,25
Total	152 336	100%

O custo de investimento desta solução é constituído apenas pelo arranque à escala industrial responsável por 0,16% do custo de produção, apenas realizado uma única vez. Comparando os custos anuais deste cenário com os de compra externa, o cenário A representa uma poupança anual de 7,8% no 1^a ano e 9,9% nos anos seguinte. De acordo com a tabela 4.20, ao final de 10 anos este cenário representa uma poupança de 486 992€

Tabela 4.20- Comparação entre as despesas do cenário A e atual e a sua respetiva poupança num período de 10 anos

Anos	Despesa Cenário B	Despesa Cenário atual	Poupança
1	463 675	503 208	+ 39 534
2	453 490	503 208	+ 89 251
3	453 490	503 208	+ 138 969
4	453 490	503 208	+ 188 687
5	453 490	503 208	+ 238 404
6	453 490	503 208	+ 288 122
7	453 490	503 208	+ 337 839
8	453 490	503 208	+ 387 557
9	453 490	503 208	+ 437 275
10	453 490	503 208	+ 486 992

A desvantagem deste cenário é o volume do fermentador que não consegue produzir o suficiente para cobrir consumo interno. No entanto, permite uma poupança quase imediata.

Cenário B

Arranque através da compra de um inoculo de bactérias selecionadas para produção de vinagre de álcool, para um acetificador de 10 000L da empresa.

Para o arranque da produção de vinagre de álcool num fermentador de 10 000L, seria apenas necessário um inoculo de 40 L de volume juntamente com 5 000 L de vinagre filtrado com as 3%(v/v) de álcool e 6 a 7%(m/v) de acidez, de acordo com as especificações do fornecedor.

Este inoculo apresenta um custo de 2 400 €, que constitui o investimento neste cenário. Por outro lado, como se pode observar na tabela 4.21, existe uma diminuição nos custos das matérias-primas devido à diminuição da quantidade de nutrientes necessária à reação. Esta diminuição provoca uma poupança anual de matérias-primas de 9 215 €, o que diminui os custos de produção 6%.

Tabela 4.21 - Custos anuais no ano de arranque da produção de vinagre de álcool com 12%(m/v) de acidez num fermentador de 10 000L com compra de inóculo de bactérias selecionadas.

Custo	€/ano	%
Arranque	2 486	1,70
Matérias-primas	131 833	90,7
Acetificação e Filtragem	11 047	7,60
Total	145 366	100%

Como o arranque é apenas feito uma vez, o investimento no inóculo consegue ser recuperado no ano de implementação, com uma poupança de 11,1% e 11,7% nos anos seguintes comparativamente ao cenário atual.

A comparação entre as despesas do cenário B com o cenário atual podem ser consultados na tabela 4.22.

Tabela 4.22- Comparação entre as despesas do cenário B e atual e a sua respetiva poupança num período de 10 anos

Anos	Despesa Cenário B	Despesa Cenário atual	Poupança
1	447 256	503 208	55 952
2	444 275	503 208	114 884
3	444 275	503 208	173 817
4	444 275	503 208	232 750
5	444 275	503 208	291 682
6	444 275	503 208	350 615
7	444 275	503 208	409 548
8	444 275	503 208	468 480
9	444 275	503 208	527 413
10	444 275	503 208	586 346

Este cenário constitui uma poupança de 586 346 € em 10 anos se o consumo de vinagre de álcool pela empresa se manter constante. No entanto, este encontra-se em crescimento a uma taxa média anual de 16%. Esta diferença no consumo terá de ser preenchida, tanto no cenário A como no B, pela compra de vinagre por via externa.

Cenário C

Aquisição de um acetificador com capacidade de 40 000L, com 100% de capital próprio, com arranque através da seleção interna de bactérias.

Um fermentador de 40 000L tem uma capacidade máxima de produção anual de 4.074.418 L/ano. Este valor excede o consumo de vinagre atual da empresa, no entanto este encontra-se em crescimento a uma taxa média de crescimento anual de 16%. Como os custos de acetificação não aumentam proporcionalmente e o volume produzido consegue ser adaptado às necessidades, esta será a capacidade mais apropriada para responder às necessidades da empresa e proporcionar alguma margem de crescimento.

O acetificador representara um investimento de 200 000 €, considerando todos os custos envolvendo a sua instalação e transporte.

Considerando que é necessário um volume de 10 000 L de inóculo para o arranque de um fermentador desta dimensão, os custos associados à seleção interna de bactérias, pelo método descrito no subcapítulo 5.2, representa um investimento total de 201 085€. Os custos de produção serão iguais aos do cenário A e podem ser consultados na tabela 19.

Devido ao tempo de arranque, este fermentador teria de funcionar a um volume de fermentação de 30 000 L para conseguir produzir o suficiente para responder as necessidades da empresa. Nos restantes anos apenas precisa de um volume de fermentação de 25 000 L.

Na tabela 4.23 são apresentadas as despesas do cenário C comparativamente as despesas do cenário atual e as respetivas poupanças num período de 10 anos.

Tabela 4.23- Comparação entre as despesas do cenário C e atual e a sua respetiva poupança num período de 10 anos

Anos	Despesa Cenário C	Despesa Cenário atual	Poupança
1	660 233	503 208	-157 025
2	458104	503 208	-111 921
3	458104	503 208	-66 817
4	458104	503 208	-21 713
5	458104	503 208	+ 23 391
6	458104	503 208	+ 68 495
7	458104	503 208	+ 113 599
8	458104	503 208	+ 158 703
9	458104	503 208	+ 203 807
10	458104	503 208	+ 248 911

Com este cenário é possível recuperar o investimento em 4 anos e 6 meses, com uma poupança anual de 9% em relação ao cenário atual correspondendo a

uma poupança de 248 991 € em 10 anos. Este cenário proporciona alguma segurança comparativamente aos anterior por proporcionar o aumento da capacidade de produção.

Cenário D

Aquisição de um acetificador com capacidade de 40 000L, com 100% de capital próprio, com arranque através da compra de bactérias selecionadas para produção de vinagre de álcool.

A melhor solução para o arranque num acetificador desta capacidade, seria um inoculo de apenas 200 L de bactérias previamente selecionadas, que teria um custo de 1 200 €. Deste modo o investimento do inoculo e do fermentador somam um total de 201 200 €, suportável de acordo com a poupança anual. A comparação entre este cenário e o atual e a respetiva poupança encontra-se na tabela 4.24.

Tabela 4.24 - Comparação entre as despesas do cenário D e atual e a sua respetiva poupança num período de 10 anos

Anos	Despesa Cenário D	Despesa Cenário atual	Poupança
1	559 184	503 208	-55 976
2	357 120	503 208	+ 90 112
3	357 120	503 208	+ 236 200
4	357 120	503 208	+ 382 287
5	357 120	503 208	+ 528 375
6	357 120	503 208	+ 674 463
7	357 120	503 208	+ 820 551
8	357 120	503 208	+ 966 639
9	357 120	503 208	+ 1 112 727
10	357 120	503 208	+ 1 258 815

Este cenário representa uma poupança de 29% anual comparativamente ao cenário atual, recuperando o investimento no 2º ano.

Este cenário é o que apresenta um maior investimento inicial, mas é aquele que apresenta uma maior percentagem de poupança e consequentemente uma maior poupança num período de 10 anos (1 258 815 €).

Cenário E

Aquisição de um acetificador com capacidade de 40 000L, com 40% de capital próprio, com arranque através da seleção interna de bactérias.

Foi analisado o cenário de compra de um fermentador de 40 000L com 40% de capital próprio e 60% de capital alheio, realizando um investimento total de 660 233 €, incluindo o fermentador e o arranque industrial por seleção interna das bactérias da empresa de acordo com o protocolo otimizado descrito no subcapítulo 4.2.

Neste cenário foi considerado um empréstimo de 395 140€ a 7 anos, com uma taxa de juro de 2,65% [44] e um imposto de selo de 4% [45]. Foi escolhido este tempo de pagamento tendo em conta a vida útil do equipamento e a poupança feita anualmente com a implementação deste cenário.

Na tabela 4.25 são apresentados os dados relativos ao pagamento do capital alheio juntamente com o fluxo de caixa num período de 7 anos.

Tabela 4.25- Dados relativos ao pagamento do empréstimo de 60% do capital investido

Ano	Capital em dívida (€)	Juro anual (€)	Reembolso anual (€)	Valor em dívida (€)	Fluxo de caixa (€)
1	396 140	10 498	56 591	339 548	-479 546
2	339 548	8 998	56 591	282 957	-377 839
3	282 957	7 498	56 591	226 366	-288 131
4	226 366	5 999	56 591	169 774	-209 041
5	169 774	4 499	56 591	113 183	-139 347
6	113 183	2 999	56 591	56 591	-77 962
7	56 591	1 500	56 591	0	-23 925

Dado que a implementação deste cenário proporciona uma poupança anual de 9 % em relação ao cenário atual, o capital investido consegue ser recuperado num período de 6 anos, apresentando uma poupança de 414 339 € num período de 10 anos. Este projeto apresenta um valor atual líquido (VAL) de -23 925 € e uma taxa interna de retorno (TIR) de 9,22%.

Cenário F

Aquisição de um acetificador com capacidade de 40 000L, com 40% de capital próprio, com arranque através da compra de bactérias selecionadas para produção de vinagre de álcool.

Considerando que o empréstimo deste cenário apresenta as mesmas condições descritas no cenário E, o investimento para a compra de um novo

acetificador juntamente com a compra de um inoculo de 1 000 L de bactérias selecionadas à produção de vinagre de álcool com aumento do volume do inoculo nas instalações da empresa, apresenta um custo total de 618 226 €. O investimento de 40% de capital próprio e 60% de capital alheio neste projeto, gera o pagamento descrito na tabela 4.26, onde são também apresentados os fluxos de caixa num período de 7 anos.

Este cenário apresenta uma poupança anual de 29,0% anualmente em relação ao cenário atual, apresentando uma poupança 230 706 € num período de 10 anos. Os indicadores deste projeto são os que apresentam valores mais vantajosos, com uma TIR de 16% e um VAL de 58 756 €

Tabela 4.26- Dados relativos ao pagamento do empréstimo de 60% do capital investido

Ano	Capital em dívida (€)	Juro anual (€)	Reembolso anual (€)	Valor em dívida (€)	Fluxo de caixa (€)
1	370 936	9 830	52 991	317 945	-391 044
2	317 945	8 426	52 991	264 954	-291 294
3	264 954	7 021	52 991	211 963	-203 054
4	211 963	5 617	52 991	158 972	-125 023
5	158 972	4 213	52 991	105 982	-56 043
6	105 982	2 809	52 991	52 991	+ 4 912
7	52 991	1 404	52 991	0	+ 58 756

Para conseguir comprar os cenários de modo a tomar a decisão mais vantajosa para a empresa, é apresentada na tabela 4.27 um resumo dos indicadores relativos aos 6 cenários

No caso de a empresa apresentar capital para pagar 100% do investimento, o cenário mais vantajoso seria o D. Ou seja, seria melhor comprar um acetificador de 40 000L produzindo todo o vinagre de álcool consumido internamente e comprar um inoculo de 200 L de bactérias selecionadas para a produção de vinagre de álcool, que necessitaria de uma quantidade menor de nutrientes.

Caso a empresa precise de capital alheio, o melhor cenário seria o F. Qualquer um deles conclui que a compra de um fermentador e a do inoculo seria mais vantajoso.

Tabela 4.27 – Resumo dos indicadores dos 6 cenários considerados

Cenários	Tempo de recuperação de capital (anos)	Poupança anual (%)	Poupança em 10 anos (€)	VAL (€)	TIR (%)
A	0	9,9	486 992	-	-
B	0	11,7	586 346	-	-
C	5	9,0	248 991	-	-
D	2	29,0	1 258 815	-	-
E	8	9,0	96 576	-23 925 €	9
F	6	29,0	230 706	58 756 €	16

Por outro lado, se a empresa pretender uma solução imediata, o mais vantajoso seria o cenário B, que apresenta lucro logo no primeiro ano. No entanto, com o crescimento do consumo interno de vinagre de álcool, não representaria uma solução a longo prazo.

Conclusões e proposta de trabalhos futuros

A Mendes Gonçalves é uma empresa portuguesa produtora de vinagre e molhos, no entanto adquire vinagre de álcool, uma das matérias-primas na produção de molhos, por via externa. Como a empresa possui o equipamento necessário à produção interna de vinagre de álcool a 12%(m/v) de acidez, por processo semi-batch, está em consideração a sua produção interna.

A produção de vinagre de álcool é complexa devido à sua matéria-prima (etanol destilado) ser completamente despromovida dos nutrientes necessário à acetificação.

As dificuldades associadas à produção deste vinagre foram ultrapassadas por aumento sequencial da concentração de nutrientes adicionados à carga do acetificador à escala piloto. Foi também possível chegar a uma concentração de nutrientes que permita a seleção de bactérias de outra matéria-prima para a produção de vinagre de álcool que permite o arranque da produção de vinagre de álcool à escala industrial de bactérias disponíveis na empresa.

Apesar desta concentração ser mais elevada do que a recomendada pelo fornecedor para as suas bactérias já selecionadas para a produção de vinagre de álcool, acredita-se que uma diminuição da sua concentração é possível quando forem realizados um elevado número de ciclos nas mesmas condições.

Foi realizada a otimização do volume de carga a um fermentador de 600L, concluindo-se que o volume de carga 1/3 do volume de fermentação é o volume indicado para a produção de vinagre de arroz que, devido às suas semelhanças com o vinagre de álcool, podemos considerar que será a melhor o ótimo para a produção de vinagre de álcool.

Apesar de só ter sido possível otimizar um parâmetro no processo industrial os restantes parâmetros de otimização do processo industrial são um aspeto importante na produção de vinagre. A quantidade de oxigénio é um dos parâmetros que pode ser limitativo para a reação quando realizado em defeito, mas aumentar as perdas de álcool e ácido acético quando realizado em excesso e devia ser otimizado para cada tipo de vinagre devido à diferença entre as espécies de bactérias. Para concluir o trabalho iniciado com o álcool residual, seria interessante a análise dos tempos de ciclo e acidez na descarga dos volumes

de carga de 1/3 e 1/4 do volume de fermentação com álcool residual de 1%, de modo a concluir se realmente não seria economicamente benéfico.

De acordo com H. Rubio-Fernández et al., 2004, aplicando um gradiente de temperatura durante o processo de acidificação reduz o tempo de ciclo para vinagre de vinho. Seria interessante aplicar este gradiente na produção de vinagre de álcool que segundo o autor, apesar de aumentar a produtividade do processo, diminuiria os custos energéticos associados ao arrefecimento.[35]

Foram comparados seis cenários de possível poupança para a Mendes Gonçalves, comparativamente do cenário atual, resumidos na tabela 4.28.

Tabela 28 - Resumo dos cenários de poupança considerados para a Mendes Gonçalves na produção interna de vinagre de álcool com 12% de acidez

Cenário	Seleção de Bactérias	Volume do acetificador (L)	Capital	Poupança em 10 anos (€)	Recuperação de capital (anos)
A	Interna	10 000	Próprio	486 992	0
B	Externa	10 000	Próprio	586 346	0
C	Interna	40 000	Próprio	248 991	5
D	Externa	40 000	Próprio	1 258 815	2
E	Interna	40 000	Alheio	96 576	8
F	Externa	40 000	Alheio	230 706	6

A compra de um inoculo de bactérias selecionadas será mais vantajoso devido à diminuição da quantidade de nutrientes na carga, diminuindo o custo das matérias-primas. Concluiu-se que a compra deste inoculo juntamente com um acetificador 40 000 L de capacidade seria o mais rentável para a empresa permitindo uma poupança de 1 258 815 € em 10 anos, considerando que o investimento é feito somente de capital próprio.

Por outro lado, caso a empresa pretenda uma solução imediata, o cenário B será o mais indicado, apresentando uma poupança logo no 1^a ano de implementação e apenas necessitando de equipamento já disponíveis na empresa. Caso este cenário seja implementado, é de ter em conta o possível aumento do consumo interno de vinagre de álcool estimado em 16% ao ano, que o cenário A não conseguiria sustentar devido à capacidade do fermentador.

Referências bibliográficas

- [1] Decreto de Lei nº174/2017 de 8 de Maio. Diário da Republica nº88-I série, pp. 1–2, "Ministério da Agricultura do desenvolvimento rural e pescas, Lisboa, 2016.
- [2] J. S. Bowers Jr, "Vinegar," *Ullmanns Encyclopedia of Industrial Chemistry*, vol. 38. pp. 119–126, 2012.
- [3] L. Solieri and P. Giudici, *Vinegars of the world*, 1ª edição. Milão: Springer, 2009.
- [4] V. Costa (2014), "Análise do processo de fabrico de vinagres," Tese de Mestrado em Engenharia Alimentar, Processamento de Alimentos. Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa, 2014.
- [5] CETOTEC, "Vinegar processes," <http://www.cetotec.com/>. [Online]. Available: <http://cetotec.com/en/vinegar-production-technology/vinegar-processes/>. [Accessed: 16-Mar-2018].
- [6] Mendes Gonçalves, "dentro da Fábrica...," 2006. [Online]. Available: <http://www.mendesgoncalves.pt/pt/dentro-da-fabrica>. [Accessed: 12-Mar-2018].
- [7] A. Bernart and V. P. S. Zanardo, "Vivências: Revista Eletrônica de Extensão da URI ISSN 1809-1636," *Revista Eletrônica Extensão da URI*, vol. 7, no. 13, pp. 155–162, 2010.
- [8] F. P. P. Marques, "Características físico-químicas, nutricionais e sensoriais de vinagres de diferentes matérias-primas.," Escola de Agronomia e Engenharia dos Alimentos da Universidade Federal de Goiás, 2008.
- [9] PONTI S.A, "History of vinegar - In ancient times." [Online]. Available: <https://www.ponti.com/en/in-ancient-times/>. [Accessed: 16-Feb-2018].
- [10] PONTI S.A., "History of vinegar - The Middle Ages and beyond." [Online]. Available: <https://www.ponti.com/en/the-middle-ages-and-beyond/>. [Accessed: 16-Feb-2018].
- [11] J. C. Nachtigal, U. A. Camargo, and M. A. F. (Ed.). Conceição, "Uvas sem sementes cultivares BRS Morena, BRS Clara e BRS Linda.," 2004.
- [12] P. R. F. Pedroso(2013), "Produção de vinagre de maçã em biorreator airlift". Tese de Mestrado em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina.
- [13] L. A. Rizzon and J. Meneguzzo, *Elaboração do vinagre*, 1ª Edição. Bento Gonçalves: Embrapa, 2002.
- [14] H. A. Conner and R. J. Allgeier, "Vinegar: Its History and Development," *Advances in Applied Microbiology*, vol. 20, no. C. pp. 81–133, 1976.
- [15] J. F. Bourgeois and F. Barja, "The history of vinegar and of its acetification systems," *Arch. des Sci.*, vol. 62, no. 2, pp. 147–160, 2009.
- [16] ReportLinker, "Vinegar Sector: Worldwide Forecast until 2021," 2017. [Online]. Available: <https://www.reportlinker.com/p03588375/Global-Vinegar-Market.html>. [Accessed: 05-Aug-2018].
- [17] IMARC Group, "Vinegar Market | Global Industry Trends, Share, Size, Growth,

- Opportunity and Forecast 2018-2023,” 2017. [Online]. Available: <https://www.imarcgroup.com/vinegar-manufacturing-plant>. [Accessed: 13-Mar-2018].
- [18] Marina Lemos Gonzaga, “Os milagres do vinagre: Márcia Peltier,” 2017. [Online]. Available: <https://www.marciapeltier.com.br/os-milagres-do-vinagre/>. [Accessed: 01-Sep-2018].
- [19] F. R. E. Mde, H. F. Gmbh, and C. Kg, “Rank mde ,” *Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 2012.
- [20] M. N. Antol, *The Incredible Secrets of Vinegar*. New York: Avery Publishing Group, 2000.
- [21] C. of A. and H. E. New Mexico State University, “Vinegar as herbicide,” 2004. [Online]. Available: <http://aces.nmsu.edu/ces/yard/2004/041004.html>. [Accessed: 21-Feb-2018].
- [22] N. H. Budak, E. Aykin, A. C. Seydim, A. K. Greene, and Z. B. Guzel-Seydim, “Functional Properties of Vinegar,” *J. Food Sci.*, vol. 79, no. 5, 2014.
- [23] T. H. E. E. Commission, “COMMISSION REGULATION (EU) 2016/263 of 25 February 2016,” 2016.
- [24] S. C. Tan, “Vinegar Fermentation,” *J. Biotechnol.*, vol. 15, no. December, pp. 57–69, 2005.
- [25] S. Hailu, S. Admassu;, and Y. K. Jha, “Vinegar Production Technology – An Overview,” no. November, pp. 29–32, 2012.
- [26] A. Casali, “Sabor Básico: O Vinagre - Origem, Produção e Tipos - Post I de II,” 2014. [Online]. Available: <http://saborbasico.blogspot.pt/2014/03/o-vinagre-origem-producao-e-tipos-post.html>. [Accessed: 20-Feb-2018].
- [27] A. Spiegel, “A Guide To Where Your Vinegar Comes From, And How To Use It | HuffPost,” 2012. [Online]. Available: https://www.huffingtonpost.com/2014/11/24/vinegar-guide_n_1380713.html. [Accessed: 20-Feb-2018].
- [28] Jennifer Fogaça, “Processo de produção de álcool.” [Online]. Available: <http://mundoeducacao.bol.uol.com.br/quimica/processo-producao-alcool.htm>. [Accessed: 17-Feb-2018].
- [29] A. S. de Aquino, “Análise de Rotas Alternativas para Sequestro Químico de CO₂: Produção de Metanol, Gás de Síntese e Ácido Acético,” 2008.
- [30] E. Kosher, “Kosher Certification: Vinegar -,” 2017. [Online]. Available: <https://earthkosher.com/kosher-certification-vinegar/>. [Accessed: 19-Feb-2018].
- [31] P. e A. Ministério da Agricultura, “ANAV - Associação Nacional das Indústrias de Vinagre,” 2012. [Online]. Available: <http://www.anav.com.br/legislacao.php?id=29>. [Accessed: 20-Feb-2018].
- [32] E. Zilioli, “Composição química e propriedades funcionais no processamento de vinagres,” Faculdade de Engenharia dos Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 2013.
- [33] M. Plessi,(2003) “VINEGAR,” in *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, Academic Press, San Diego, CA ,pp. 5996–6004.
- [34] A. Filipa and F. Henriques, “Análise de um Processo Fermentativo para

- Desenvolvimento de um Produto Alimentar.” Tese de Mestrado em Tecnologia Química. Instituto Superior Técnico de Tomar, Tomar.
- [35] H. Rubio-Fernández, M. D. Salvador, and G. Fregapane, “Influence of fermentation temperature on semi-continuous acetification for wine vinegar production,” *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 219, no. 4, pp. 393–397, 2004.
- [36] H. F. Gmbh and C. Kg, “Vinegar technology 1.”
- [37] Y. Hai Lin *et al.*, “An optimum medium designed and verified for alcohol vinegar fermentation,” *African J. Biotechnol.*, vol. 10, no. 42, pp. 8421–8427, 2011.
- [38] C. Berraud, “Production of highly concentrated vinegar in fed-batch culture,” *Biotechnol Lett*, vol. 22, no. 6, pp. 451–454, 2000.
- [39] M. Gullo, E. Verzelloni, and M. Canonico, “Aerobic submerged fermentation by acetic acid bacteria for vinegar production: Process and biotechnological aspects,” *Process Biochem.*, vol. 49, no. 10, pp. 1571–1579, 2014.
- [40] S. Modena, “Cetotec vinegar technology,” 2016.
- [41] Cetotec, “Training Vinegar Technology,” in *Training Vinegar Technology*, 2014.
- [42] I. De Ory, L. E. Romero, and D. Cantero, “Operation in semi-continuous with a closed pilot plant scale acetifier for vinegar production,” *J. Food Eng.*, vol. 63, no. 1, pp. 39–45, 2004.
- [43] “Cetotec - Acetoscan,” <https://www.cetotec.com/>.
- [44] “Taxas de juro bancárias - Empréstimos e depósitos,” *Banco de Portugal e Banco Central Europeu*, 2018. [Online]. Available: https://www.bportugal.pt/sites/default/files/anexos/10-taxas_juro_bancarias.pdf%0A.
- [45] pwc- Portugal, “Imposto do Selo | Guia fiscal 2018 | PwC Portugal,” 2018. [Online]. Available: <https://www.pwc.pt/pt/pwcinforfisco/guia-fiscal/2018/imposto-do-selo.html>. [Accessed: 30-Aug-2018].
- [46] I. De Ory, L. E. Romero, and D. Cantero, “Optimum starting-up protocol of a pilot plant scale acetifier for vinegar production,” vol. 52, pp. 31–37, 2002.
- [47] A. Lopez, L. W. Johnson, C. B. Wood, L. W. Johnson, and C. B. Wood, “Observations on a Laboratory Method for Submerged Acetic Fermentation,” 1961.
- [48] Water&Process Technologies, “Closed Recirculating Cooling Systems | GE Water,” 2012. [Online]. Available: https://www.suezwatertechnologies.com/handbook/cooling_water_systems/ch_3_2_closed.jsp. [Accessed: 03-Sep-2018].
- [49] edisciplinas, “Distribuição F de Snedecor a 5%.” [Online]. Available: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/3333945/mod_resource/content/1/Distribicao_F_5%25.pdf. [Accessed: 03-Sep-2018].
- [50] SACHS, L.G. Tecnologia dos produtos agropecuários – Transformações de produtos vegetais. FFALM, Bandeirantes, Pp.58-73, 1990.

Anexo A

CONFIDENCIAL

Anexo B

Para que fosse possível calcular os balanços mássicos num cenário ideal, foram consideradas as propriedades apresentadas na tabela B.1.

Tabela B.1-Propriedades consideradas para o cálculo de balanços

	Densidade (g/ml)	MM (g/mol)	Cp (273,15K) (KJ/Kg. K)
Etanol	0,789	46	2,30
Ácido Acético	1,05	60	2,58
Ar	1,292	-	-
Oxigénio	-	32	1,414
Água	1,01	18	4,186

Utilizando as características da carga usada nos testes práticos, representadas na tabela 3 no capítulo 3, foi calculado a quantidade de ácido acético esperado num cenário ideal, ou seja, apenas considerando a estequiometria da reação, para um rácio de $\frac{1}{3}$ entre o volume de carga/fermentação. É claro que este balanço não só não contabiliza as perdas de etanol e ácido acético por evaporação e arrasto, como também não considera o álcool residual no vinagre, necessário para evitar “overoxidation”.

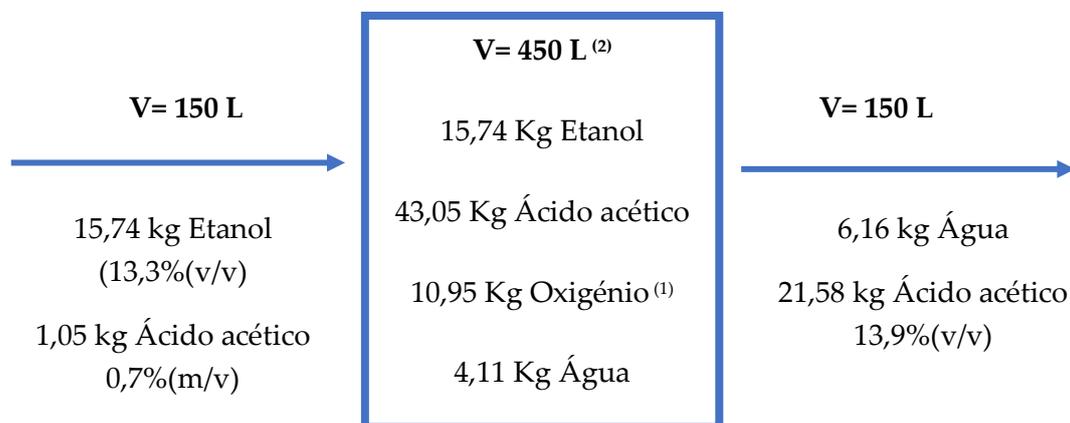


Figura O.1 – Diagrama representativo do balanço de massa numa situação ideal para um rácio de $\frac{1}{3}$

Com uma carga de 150 L contendo 13,3%(v/v) de etanol, que equivale a 15,74 Kg, idealmente, o vinagre produzido irá conter 14% (m/v) de acidez (21,58 Kg de ácido acético).

Seguindo a estequiometria da reação, seriam necessários 10,95 Kg de oxigénio para 15,74 Kg de etanol reagirem. Com um arejamento de 4 Nm³/h,

com um tempo de ciclo de 21,5 h, passam pelo acetificador 11,73 Kg de oxigénio. Deste modo, este componente encontra-se em excesso, mas não o suficiente para provocar um aumento de perdas por evaporação.

Tabela B.2- Balanço de massa teórico, considerando um cenário ideal com rácio entre o volume de carga/descarga e fermentação de 1/3

	Carga (150 L)		Meio de fermentação (450 L) ⁽²⁾		Descarga (150 L)	
	Volume (L)	Massa (Kg)	Volume (L)	Massa (Kg)	Volume (L)	Massa (Kg)
Álcool	19,95	15,74	19,95	15,74	-	-
Ácido acético	1,10	1,05	41,00	43,05	20,00	21,58
Oxigénio	-	-	8	10,95 ⁽¹⁾	-	-
Água	-	-	-	-	6,10	6,16

⁽²⁾ no início de ciclo

⁽¹⁾ ao longo do ciclo

Anexo C

A tabela C.1 apresenta os valores definidos na calibração do PLC no acetificador de 600L para todos os ensaios de otimização.

Tabela C.1- Valores de álcool e resistência utilizados para a calibração do PLC

Gama de valores	Álcool %(v/v)	Resistência
Alta	3,86	1276
Média	1	3629
Baixa	0,5	7037

Calibração OK

Estes valores deram origem à curva de calibração, associada a um R^2 de 0,9701 representada na figura C.1.

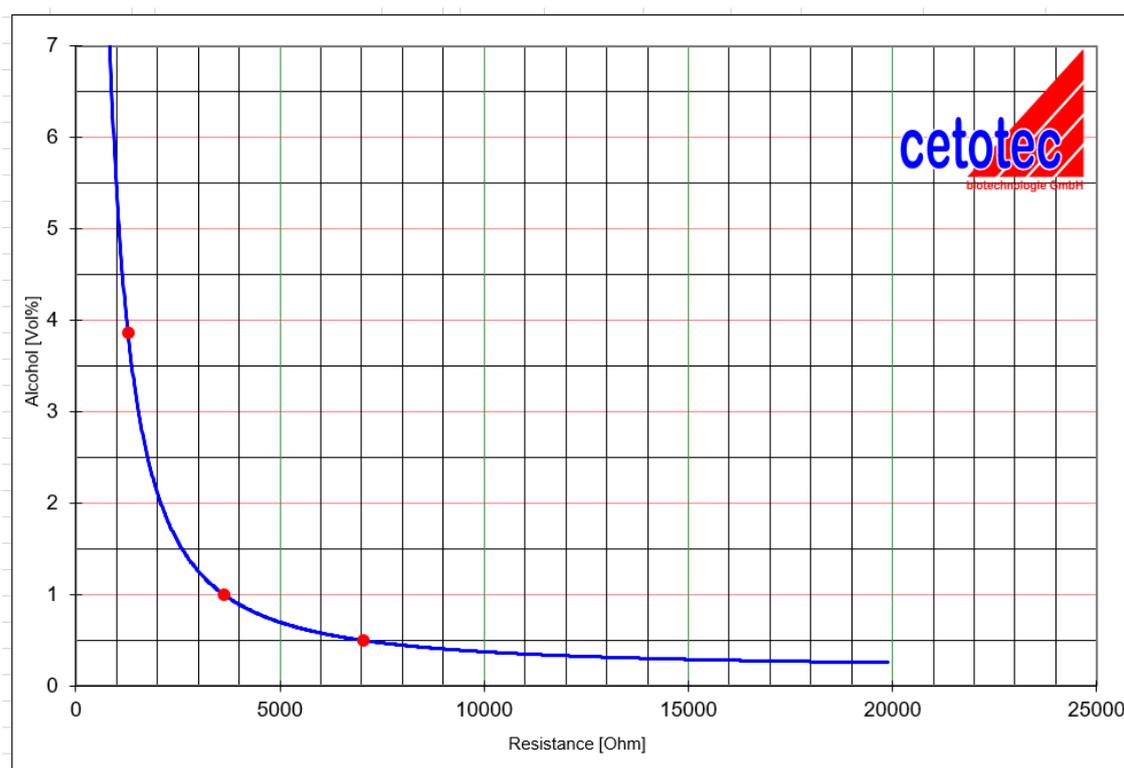


Figura C.1- Curva de calibração do PLC

CONFIDENCIAL

CONFIDENCIAL

CONFIDENCIAL

Anexo F

As tabelas F1 e F2 apresentam os dados dos 4 ciclos selecionados para cada uma das condições.

Tabela F1- Dados de 4 ciclos, depois de um período de adaptação das bactérias às novas condições do meio, para o volume de carga de 1/4 do volume de fermentação e álcool residual de 0,5%(v/v)

Ciclos	Tempo de ciclo (h)	Álcool inicial % (v/v)	Tempo de carga/descarga (h)	Volume de descarga(L)
1	16,5	3,81	1	113
2	16,5	3,79	1	113
3	17,25	3,7	1,5	113
4	17,75	3,81	2	113

Tabela F2- Dados de 4 ciclos, depois de um período de adaptação das bactérias às novas condições do meio, para o volume de carga de 1/8 do volume de fermentação e álcool residual de 0,5%(v/v)

Ciclos	Tempo de ciclo (h)	Álcool inicial % (v/v)	Tempo de carga/descarga (h)	Volume de descarga real(L)
1	15,25	1,82	1,75	46,41
2	14	1,75	1,25	43,95
3	13,75	1,76	1,25	44,30
4	14	1,87	2	48,16

Anexo G

De forma a saber se existiam diferenças significativas de produtividade nos volumes experimentados, foi realizado uma ANOVA de 1 fator (Produtividade) a 4 níveis (volume de carga). Considerando como repetição a produtividade correspondente a cada ciclo. Os dados correspondentes a este teste são apresentados na tabela G.1 e G.2.

Tabela G.1- ANOVA para os 4 volumes, considerando os ciclos como repetições, para o fator produtividade

Níveis (volumes)	Repetições (Produtividade)				Σ Repetições	Média Repetições
1/3	6,74	6,90	7,06	7,06	27,8	6,94
1/4	6,95	6,85	6,55	6,85	27,2	6,80
1/8	3,04	3,14	3,34	3,44	13,0	3,24
Σ	-	-	-	-	94,4	23,60

Tabela G.2- Resultados gerados pela análise de variância

Fonte de Variação	SS	G.L	Ms	Fo
Entre Níveis	37,89	3	12,63	579,32
Erro	0,26	12	0,022	
Total	38,16	15		

Para um nível de significância de 5%, com 3 graus de liberdade para o tratamento e 12 graus de liberdade para o erro, o valor na tabela de distribuição de Fisher é de 3,49 [49]. Deste modo existem diferenças significativas entre todos os volumes, sendo assim dispensado o teste LSD.

Anexo H

De acordo com os dados recolhidos ao longo das experiências com os diferentes volumes de carga, foi possível realizar um balanço mássico com valores práticos para as diferentes condições, apresentados nas tabelas H.1, H.2, H.3 e H.4

Para o volume de 1/3, foi obtida uma descarga com 12,39 %(m/v) de ácido acético e 0,5%(v/v) de etanol. O balanço a esta condição é apresentado na tabela H.1

Tabela H.1- Balanço mássico com os valores referentes aos 4 ciclos selecionados para o volume de carga de 1/3 do volume de fermentação

	Carga (150L)	Carga+ inoculo ⁽³⁾ (450L)	Descarga (150L)
Álcool (Kg)	15,74	16,87	0,67
Ácido acético (Kg)	1,10	39,73	20,00
Água (Kg)	-	3,88	1,94
Oxigénio (Kg)	-	25,05 ⁽⁴⁾	21,22

Comparativamente ao cenário ideal, este apresenta uma perda por evaporação de 1,58 Kg.

Para o volume de 1/4, foi obtida uma descarga com 12,35 %(m/v) de ácido acético e 0,5%(v/v) de etanol. O balanço a esta condição é apresentado na tabela H.2

Tabela H.2- Balanço mássico com os valores referentes aos 4 ciclos selecionados para o volume de carga de 1/4 do volume de fermentação

	Carga (113L)	Carga+ inoculo ⁽³⁾ (450L)	Descarga (113L)
Álcool (Kg)	11,65	13,14	0,50
Ácido acético (Kg)	0,82	44,15	14,30
Água (Kg)	-	3,27	1,09
Oxigénio (Kg)	-	25,05 ⁽⁴⁾	22,71

Comparativamente ao cenário ideal, este apresenta uma perda por evaporação de 1,51 Kg.

Para o volume de 1/8, foi obtida uma descarga com 11,45 %(m/v) de ácido acético e 0,5%(v/v) de etanol. O balanço a esta condição é apresentado na tabela H.3

Tabela H.3-Balanço mássico com os valores referentes aos 4 ciclos selecionados para o volume de carga de 1/8 do volume de fermentação

	Carga (113L)	Carga+ inoculo ⁽³⁾ (450L)	Descarga (113L)
Álcool (Kg)	5,83	7,54	0,25
Ácido acético (Kg)	0,10	47,27	6,60
Água (Kg)	-	1,89	0,27
Oxigénio (Kg)	-	25,05 ⁽⁴⁾	24,12

Comparativamente ao cenário ideal, este apresenta uma perda por evaporação de 1,29 Kg.

⁽³⁾ Início de ciclo

⁽⁴⁾ Ao longo do ciclo

Anexo I

A tabela I.1 representa os dados relativos aos 4 ciclo selecionados para um volume de carga de 1/8 do volume de fermentação com álcool residual de 1%(v/v)

Tabela I.1- Dados de 4 ciclos, depois de um período de adaptação das bactérias às novas condições do meio, para o volume de carga de 1/8 do volume de fermentação e álcool residual de 1%(v/v)

Ciclos	Tempo de ciclo (h)	Álcool inicial %(v/v)	Tempo de carga/descarga (h)	Volume de descarga real(L)
1	4,5	1,39	0,75	14,27
2	5	1,43	0,5	15,73
3	4,25	1,35	0,5	12,80
4	4,75	1,39	0,5	14,27

Anexo J

CONFIDENCIAL

Anexo K

CONFIDENCIAL