



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

TAYANE PAULO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DA TEMPERATURA NA FERMENTAÇÃO VHG EM  
BATELADA ALIMENTADA: ESTRATÉGIA PARA POTENCIALIZAR A  
PRODUÇÃO DE ETANOL 1G**

Recife  
2024

TAYANE PAULO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DA TEMPERATURA NA FERMENTAÇÃO VHG EM  
BATELADA ALIMENTADA: ESTRATÉGIA PARA POTENCIALIZAR A PRODUÇÃO  
DE ETANOL 1G**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Valorização de Biomassa.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Silveira Sonogo

Coorientador: Prof. Dr. Kaio César da Silva Rodrigues

Recife

2024

**TAYANE PAULO DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DA TEMPERATURA NA FERMENTAÇÃO VHG EM  
BATELADA ALIMENTADA: ESTRATÉGIA PARA POTENCIALIZAR A PRODUÇÃO  
DE ETANOL 1G**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Jorge Luíz Silveira Sonogo (Presidente)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Emmanuel Damilano Dutra (Titular Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Diego Andrade Lemos (Titular Externo)  
Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

Recife

2024

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Silva, Tayane Paulo da.

Avaliação da redução da temperatura na fermentação VHG em  
batelada alimentada: estratégia para potencializar a produção de  
etanol 1g / Tayane Paulo da Silva. - Recife, 2024.

79f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco,  
Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia, 2024.

Orientação: Prof. Dr. Jorge Luiz Silveira Sonogo.

Coorientação: Prof. Dr. Kaio César da Silva Rodrigues.

1. Etanol; 2. fermentação VHG; 3. degrau de temperatura. I.  
Sonogo, Jorge Luiz Silveira. II. Rodrigues, Kaio César da Silva.  
III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

**TAYANE PAULO DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DA TEMPERATURA NA FERMENTAÇÃO VHG EM  
BATELADA ALIMENTADA: ESTRATÉGIA PARA POTENCIALIZAR A PRODUÇÃO  
DE ETANOL 1G**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Aprovado em: 15/05/2024

**COMISSÃO EXAMINADORA**

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** JORGE LUIZ SILVEIRA SONEGO  
Data: 15/05/2024 14:41:31-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr. Jorge Luíz Silveira Sonogo

UFPE

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** EMMANUEL DAMILANO DUTRA  
Data: 17/05/2024 11:48:59-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr. Emmanuel Damilano Dutra

UFPE

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** DIEGO ANDRADE LEMOS  
Data: 16/05/2024 09:47:29-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr. Diego Andrade Lemos

UFSCAR

*Dedico esse trabalho aos meus amados pais  
e irmãos, por todo incentivo, compreensão e  
apoio.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por sua presença em minha vida, por todos os momentos e oportunidades a mim concedidos. Tudo fica mais leve quando sentimos que não estamos sozinhos.

A minha família, principalmente meus pais Maria e Josinaldo e meus irmãos Tatiane, Thayan, Thayná, Diego e Breno por todo apoio, amor, carinho e assistência que me proporcionam a todo momento. Tenho orgulho de fazer parte dessa família, e sou grata a Deus pelo papel de cada um em minha vida, por tantos momentos de afeto, carinho, cuidado e muito amor.

Ao meu orientador Dr. Jorge Sonego por me oportunizar desenvolver meu trabalho em seu laboratório. E, principalmente por toda orientação, apoio, disposição, incentivo lições, paciência e ensinamentos no decorrer de cada etapa desta dissertação. Ao meu Coorientador Dr. Kaio Rodrigues por sua disponibilidade e solicitude em me orientar, ensinar e incentivar durante todos os momentos da construção deste trabalho.

Ao Marcos Araújo pelos ensinamentos e auxílios na etapa de simulação e por sempre me prestar ajuda durante o trabalho. Aos meus colegas de laboratório, em especial Amanda por toda parceria, amizade, conquistas e superação dos problemas durante os experimentos. Também sou grata ao Willian, Ariednes, Alex e Raissa por todo apoio e ajuda durante os experimentos e análises para obtenção dos resultados deste trabalho.

Ao Professor Dr Jorge Cavalcanti por ceder seu laboratório e equipamentos para análise cromatográfica em diversos momentos durante a realização desse trabalho.

Agradeço a Universidade Federal de Pernambuco e ao PPGBiotec por todo aprendizado que a mim disponibilizaram e demonstração de comprometimento com a qualidade e excelência de ensino.

Agradeço a todos os que fizeram parte da minha formação, seja direta ou indiretamente, que de alguma maneira agregaram de maneira positiva, o meu muito obrigada!

*Tayane Paulo da Silva*

## RESUMO

Em escala mundial o Brasil se destaca sendo um dos maiores produtores de etanol, que por sua vez se trata de uma fonte de energia renovável importante para minimizar os problemas relacionados as emissões de gases do efeito estufa. A maior parte do etanol produzido no país origina-se a partir da fermentação utilizando cana-de-açúcar como fonte de carbono, a uma concentração em torno de  $180 \text{ g.L}^{-1}$ , resultando ao final do processo fermentativo em baixas concentrações de etanol no vinho. A fermentação VHG por proporcionar uma condição com altíssima carga de açúcares, acima de  $250 \text{ g.L}^{-1}$ , visa obter uma concentração final de etanol mais elevada em relação as fermentações convencionais. Neste contexto, o presente trabalho apresenta propostas estratégicas com o objetivo de avaliar o efeito da redução da temperatura do meio durante a produção de etanol por fermentação VHG em batelada alimentada. Foram avaliadas as fermentações VHG conduzidas em temperaturas constantes de 28, 30, 32, 34 e 36 °C empregando mosto com uma concentração de substrato de  $250 \text{ g.L}^{-1}$ , as quais resultaram em dados experimentais de concentração celular, concentração de substrato e concentração de etanol. A partir disto, foi possível desenvolver a modelagem matemática que representa o processo fermentativo em condição VHG em modo batelada alimentada e realizar a estimativa de parâmetros cinéticos do modelo híbrido de Andrews-Levenspiel. Os parâmetros ( $\mu_{\max}$ ,  $n$ ,  $K_S$ , e  $C_{E\max}$ ) foram escritos em função da temperatura e, foram empregados nas simulações computacionais para avaliar a estratégia de redução abrupta (degrau) da temperatura durante o processo fermentativo em VHG. Posteriormente, foi determinada a redução da temperatura através de dois e três degraus. O emprego da estratégia de redução da temperatura durante a fermentação alcoólica em batelada alimentada possibilitou o uso de mosto com concentração de ART de 265,12 e 283,62  $\text{g.L}^{-1}$ , gerando uma concentração de etanol de 111,32 e 118,14  $\text{g.L}^{-1}$ , o que significa um aumento de 11,69 % e 23,31% comparado à concentração final de etanol obtida nas fermentações com  $263,50 \text{ g.L}^{-1}$  à temperatura constante de 34 °C e 36 °C.

Palavras-chave: Etanol, fermentação VHG, degrau de temperatura.

## ABSTRACT

On a global scale, Brazil stands out as one of the largest producers of ethanol, which in turn is an important source of renewable energy for minimizing problems related to greenhouse gas emissions. Most of the ethanol produced in the country comes from fermentation using sugar cane, at a concentration of around  $180 \text{ g.L}^{-1}$ , resulting in low concentrations of ethanol in the wine at the end of the fermentation process. VHG fermentation, by providing a condition with a very high sugar load, above  $250 \text{ g.L}^{-1}$ , aims to obtain a higher final ethanol concentration compared to conventional fermentations. This work presents strategies with the objective of evaluating the effect of reducing the temperature of the medium during ethanol VHG fermentation in fed-batch. VHG fermentations were carried out at constant temperatures (28, 30, 32, 34 and  $36 \text{ }^\circ\text{C}$ ) using must with a substrate concentration of  $250 \text{ g.L}^{-1}$ , which resulted in experimental data on cell concentration, substrate concentration and ethanol concentration. It was possible to develop the mathematical model that represents fed-batch ethanol fermentation under VHG conditions. The kinetic parameters of the Andrews-Levenspiel hybrid model were obtained. The parameters ( $\mu_{max}$ ,  $n$ ,  $K_S$ , e  $C_{Emax}$ ) were written as a function of temperature and were used in computational simulations to evaluate the strategy of abrupt (step) temperature reduction during the VHG fermentation. Subsequently, the temperature reduction was evaluated through two or three steps. The use of the temperature reduction strategy in fed-batch ethanol fermentation allowed the use of must with ART concentrations of 265.12 and  $283.62 \text{ g.L}^{-1}$ , generating an ethanol concentration of 111.32 and  $118.14 \text{ g.L}^{-1}$ , which means an increase of 11.69% and 23.31% compared to the final ethanol concentration obtained in fermentations with  $263.50 \text{ g.L}^{-1}$  at a constant temperature of  $34 \text{ }^\circ\text{C}$  and  $36 \text{ }^\circ\text{C}$ .

**Keywords:** Ethanol, VHG fermentation, temperature step.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3.1	Ilustração do biorreator STR.	22
Figura 3.2	Ilustração do processo de batelada alimentada.	24
Figura 3.3	Ilustração do sistema contínuo.	25
Figura 3.4	Imagem da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	27
Figura 3.5	Via metabólica da fermentação alcoólica pela levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	28
Figura 4.1	Bancada com aparato experimental para fermentação VHG em batelada alimentada. A) Banho termostático; B) Módulo de controle; C) Biorreator; D) Substrato; E) Bomba de alimentação.	36
Figura 5.1	Valores experimentais de concentração de etanol ( $C_E$ ), concentração de substrato ( $C_S$ ) e concentração de células ( $C_X$ ) ao longo do tempo da fermentação VHG em batelada alimentada com $C_{S0}$ de $264,86 \pm 1,57 \text{ g.L}^{-1}$ e temperatura de $28 \text{ }^\circ\text{C}$ .	42
Figura 5.2	Valores experimentais de concentração de etanol ( $C_E$ ), concentração de substrato ( $C_S$ ) e concentração de células ( $C_X$ ) ao longo do tempo em fermentação VHG em batelada alimentada com $C_{S0}$ de $260,35 \pm 2,92 \text{ g.L}^{-1}$ e temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ .	43
Figura 5.3	Valores experimentais de concentração de etanol ( $C_E$ ), concentração de substrato ( $C_S$ ) e concentração de células ( $C_X$ ) ao longo do tempo em fermentação VHG em batelada alimentada com $C_{S0}$ de $269,74 \pm 3,53 \text{ g.L}^{-1}$ e temperatura de $32 \text{ }^\circ\text{C}$ .	43
Figura 5.4	Valores experimentais de concentração de etanol ( $C_E$ ), concentração de substrato ( $C_S$ ) e concentração de células ( $C_X$ ) ao longo do tempo em fermentação VHG em batelada alimentada com $C_{S0}$ de $263,97 \pm 2,04 \text{ g.L}^{-1}$ e temperatura de $34 \text{ }^\circ\text{C}$ .	44

- Figura 5.5 Valores experimentais de concentração de etanol ( $C_E$ ), 44  
concentração de substrato ( $C_S$ ) e concentração de células  
( $C_X$ ) ao longo do tempo em fermentação VHG em batelada  
alimentada com  $C_{S0}$  de  $276,97 \pm 3,81 \text{ g.L}^{-1}$  e temperatura de  
 $36 \text{ }^\circ\text{C}$ .
- Figura 5.6 Comparação entre os valores simulados (linhas) e 49  
experimentais (símbolos) para a fermentação VHG em  
batelada alimentada com  $C_{S0} = 264,86 \pm 1,57 \text{ g.L}^{-1}$  e  
temperatura de  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ .
- Figura 5.7 Comparação entre os valores simulados (linhas) e 49  
experimentais (símbolos) para a fermentação VHG em  
batelada alimentada com  $C_{S0} = 260,35 \pm 2,92 \text{ g.L}^{-1}$  e  
temperatura de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ .
- Figura 5.8 Comparação entre os valores simulados (linhas) e 50  
experimentais (símbolos) para a fermentação VHG em  
batelada alimentada com  $C_{S0} = 269,74 \pm 3,53 \text{ g.L}^{-1}$  e  
temperatura de  $32 \text{ }^\circ\text{C}$ .
- Figura 5.9 Comparação entre os valores simulados (linhas) e 50  
experimentais (símbolos) para a fermentação VHG em  
batelada alimentada com  $C_{S0} = 263,97 \pm 2,04 \text{ g.L}^{-1}$  e  
temperatura de  $34 \text{ }^\circ\text{C}$ .
- Figura 5.10 Comparação entre os valores simulados (linhas) e 51  
experimentais (símbolos) para a fermentação VHG em  
batelada alimentada com  $C_{S0} = 276,97 \pm 3,81 \text{ g.L}^{-1}$  e  
temperatura de  $36 \text{ }^\circ\text{C}$ .
- Figura 5.11 Apresentação dos degraus de temperatura em fermentação 58  
VHG em batelada alimentada. (A)  $C_{S0} = 263,50 \text{ g.L}^{-1}$  com 2  
degraus de temperatura:  $1^\circ - 34 \text{ }^\circ\text{C}$  para  $32 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $2^\circ - 32 \text{ }^\circ\text{C}$   
para  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . (B)  $C_{S0} = 284,58 \text{ g.L}^{-1}$  com 3 degraus de  
temperatura:  $1^\circ - 34 \text{ }^\circ\text{C}$  para  $32 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $2^\circ - 32 \text{ }^\circ\text{C}$  para  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $3^\circ -$   
 $30 \text{ }^\circ\text{C}$  para  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ .
- Figura 5.12 Simulação de dois degraus de temperatura em fermentação 60  
VHG em batelada alimentada.  $C_{S0} = 263,50 \text{ g.L}^{-1}$  com 2

degraus de temperatura: 1° - 34 °C para 32 °C e 2° - 32 °C para 30 °C ( $C_{Ed} = 60 \text{ g.L}^{-1}; 80 \text{ g.L}^{-1}$ ).

- Figura 5.13 Comparativo das simulações das fermentações VHG em 62  
batelada alimentada com  $C_{S0} = 284,58 \text{ g.L}^{-1}$ : (A) temperatura  
constante de 34 °C; (B) 3 degraus de temperatura: 1° degrau  
de 34 °C para 32 °C, 2° degrau de 32 °C para 30 °C e 3°  
degrau de 30 °C para 28 °C ( $C_{Ed} = 40 \text{ g.L}^{-1}; 60 \text{ g.L}^{-1}; 80 \text{ g.L}^{-1}$ ).
- Figura 5.14 Fermentação VHG em batelada alimentada com 64  
 $C_{S0} = 265,12 \pm 1,88 \text{ g.L}^{-1}$ , aplicados 2 degraus de  
temperatura: 1° - 34 °C para 32 °C e o 2° - 32 °C para 30 °C  
( $C_{Ed} = 60 \text{ g.L}^{-1}; 80 \text{ g.L}^{-1}$ ).
- Figura 5.15 Fermentação VHG em batelada alimentada com 65  
 $C_{S0} = 283,62 \pm 1,64 \text{ g.L}^{-1}$ , aplicados 3 degraus de  
temperatura: 1° - 34 °C para 32 °C, 2° - 32 °C para 30 °C e o  
3° - 30 °C para 28 °C ( $C_{Ed} = 40 \text{ g.L}^{-1}; 60 \text{ g.L}^{-1}; 80 \text{ g.L}^{-1}$ ).

## LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1	Comparativo entre os valores finais de $C_{Sf}$ , $C_{Ef}$ e $C_{Xf}$ para as fermentações VHG em batelada alimentada em diferentes temperaturas.	47
Tabela 5.2	Parâmetros cinéticos para as fermentações conduzidas a 28, 30, 32, 34 e 36°C.	52
Tabela 5.3	Equações para $\mu_{max}$ , $K_s$ , $n$ e $C_{E_{max}}$ ajustadas em função da temperatura.	54
Tabela 5.4 –	Simulações de fermentação VHG com aplicação de 1, 2 e 3 degraus de temperatura para $C_{S0}$ de 263,50 e 284,58 g.L <sup>-1</sup> .	55
Tabela 5.5 –	Variáveis ao longo da fermentação VHG em batelada alimentada com redução de temperatura por degraus.	67

## LISTA DE SÍMBOLOS

$K_S$	Constante de saturação ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$Y_{E/S}$	Coefficientes de rendimento de etanol ( $\text{g}_E.\text{g}_S^{-1}$ )
$Y_{X/S}$	Coefficientes de rendimento de substrato a células ( $\text{g}_X.\text{g}_S^{-1}$ )
$C_E$	concentração de etanol ( $\text{g.L}^{-1}$ ).
$C_{E\text{máx}}$	Concentração máxima de etanol
$C_S$	Concentração de substrato limitante ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$C_{Sf}$	Concentração de substrato na alimentação ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$C_X$	Concentração de células ( $\text{g.L}^{-1}$ )
E	Etanol
F	Vazão de alimentação
$K_{is}$	Constante de inibição pelo substrato ( $\text{g.L}^{-1}$ )
P	Produto
S	Substrato
$V_0$	Volume inicial
$V_f$	Volume final
X	Células
$\mu_{\text{max}}$	velocidade específica máxima de crescimento celular ( $\text{h}^{-1}$ )
$C_{Sf}$	Concentração de substrato limitante final ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$n$	Constante adimensional
$\mu$	Velocidade específica de crescimento celular ( $\text{h}^{-1}$ )

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	16
2. OBJETIVOS .....	19
2.1 Objetivo Geral .....	19
2.2 Objetivos Específicos.....	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	20
3.1 Etanol como biocombustível no Brasil .....	20
3.1.1 Matérias primas para a produção de etanol no Brasil .....	21
3.2 Biorreator STR em sistemas de fermentação .....	22
3.3 Formas de condução dos Processos Fermentativos .....	23
3.4 Variáveis que afetam a Produção de Etanol.....	26
3.4.1 Microrganismo .....	26
3.4.3 Temperatura e Etanol.....	30
3.4.4 Substrato.....	31
3.5 Fermentação VHG .....	32
3.5.1 Fermentação VHG aplicada em estudos científicos .....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	35
4.1 Microrganismo e Meio de Cultivo.....	35
4.2 Equipamento.....	35
4.3 Ensaios de Fermentação VHG em Diferentes Temperaturas.....	36
4.4 Procedimento Experimental .....	36
4.5 Modelagem Matemática da Fermentação VHG em Batelada Alimentada .....	37
4.6 Procedimento de Estimativa dos Parâmetros Cinéticos .....	40
4.7 Simulação Computacional da Redução da Temperatura Durante o Processo Fermentativo .....	40
4.8 Metodologias Analíticas .....	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	42

5.1 Fermentação VHG em batelada alimentada com diferentes temperaturas .....	42
5.2 Ajuste de Modelo e Estimativa de Parâmetros Cinéticos.....	48
5.3 Avaliação da estratégia de redução da temperatura por degrau durante a fermentação VHG .....	54
5.4 Produção de etanol por fermentação VHG em batelada alimentada com redução da temperatura por degrau: Validação experimental .....	63
Variáveis .....	67
Unidade .....	67
Fermentações .....	67
6. CONCLUSÕES .....	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	71

## 1. INTRODUÇÃO

O etanol combustível, também conhecido como álcool etílico ou bioetanol, é um tipo de álcool constituído pela fórmula  $C_2H_5OH$ . Existem duas variantes na produção industrial do etanol, o etanol hidratado, o qual é resultante direto da coluna de destilação, apresenta cerca de 5% de água em seu volume, enquanto o etanol anidro, que contém aproximadamente 0,5% de água, é obtido do etanol hidratado em que carece de um processo posterior à destilação para a diminuir a quantidade de água em seu meio (HORII 1999; UNICA, 2007; BNDES, 2008).

O Brasil é o segundo maior produtor de etanol do mundo, atingindo cerca de 26,2% da produção mundial na safra de 2021/2022, ficando atrás dos Estados Unidos, o qual, também ocupa o primeiro lugar em produção, sendo responsável por quase 55% da produção global (ANP, 2022; VIDAL, 2022; VIDAL, 2024). No Brasil, na safra de 2022/2023, a região nordeste foi responsável por cerca 6,7% do total de etanol produzido a partir da cana-de-açúcar no país (CONAB, 2023). Alcançando 1,87 bilhões de litros, com destaque para o estado de Alagoas, responsável pela produção de aproximadamente 445,9 milhões de litros (CONAB, 2023; VIDAL, 2024).

Nas destilarias, o teor de etanol (8-11% v.v<sup>-1</sup>) alcançado no vinho após a fermentação é considerado baixo, isso implica na utilização de equipamentos de grandes volumes, o que demanda a utilização de baixas concentrações de açúcares (~180 g.L<sup>-1</sup>) no mosto no início do processo fermentativo, a fim de obter um bom tempo de consumo total dos açúcares e respectiva conversão em etanol (TAYLOR *et al.*, 1995). Ainda, no momento em que ocorre a destilação do vinho fermentado faz-se necessário o uso de quantidade de vapor considerável, sendo 2,5 vezes maior do que o volume obtido de etanol em kg, isto, em decorrência do baixo percentual de etanol presente no vinho. (EZEJI *et al.*, 2003; MOHANA *et al.*, 2009; MORANDIN *et al.*, 2011).

Ao final da destilação é gerado um grande volume de vinhaça (10-15 vezes o volume de etanol produzido), um resíduo com elevada demanda bioquímica de oxigênio e rico em minerais, como potássio, cálcio, magnésio,

nitrogênio e fósforo (AMORIM *et al.*, 2011; MOHANA *et al.*, 2009). Esse excessivo volume de vinhaça gerado resulta em elevados gastos com transporte ao campo para utilizá-la como fertilizante na lavoura de cana (LUZ, 2005; SILVA, 2012).

Uma alternativa para contornar esses problemas existentes no processo fermentativo é obter um vinho com elevado teor alcoólico (MAIORELLA; BLANCH; WILKE, 1983). Uma forma de aumentar o teor alcoólico no vinho é a adoção da fermentação empregando altíssima concentração de açúcar no mosto, técnica conhecida como fermentação *Very High Gravity* - VHG. As fermentações em altíssima gravidade fazem uso de concentrações de açúcares superiores a  $250 \text{ g.L}^{-1}$  (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008). A adoção da fermentação com a tecnologia VHG permite alcançar mais de 15% (v.v<sup>-1</sup>) de etanol no vinho fermentado, permitindo uma maior produção de etanol sendo caracterizado por não modificar radicalmente as configurações fabris presentes (CRUZ, 2019).

No entanto, o aumento do teor alcoólico do vinho leva a uma maior toxicidade para a levedura, podendo tornar mais lento ou até provocar a parada do processo fermentativo (LIMA, *et al.*, 2001). Esse efeito tóxico do etanol na levedura é intensificado em temperaturas acima de 28°C (AMORIM, *et al.*, 1996). Os estudos de fermentação alcoólica sobre o efeito de temperaturas baixas (na faixa de 26 a 30 °C) com o objetivo de obter vinhos com teor alcoólico elevados, são causados pelo aumento da resistência da levedura ao etanol em baixas temperaturas, e possibilitaram a condução de fermentações com maior concentração de açúcares no substrato (RIVERA *et al.* 2007; VELOSO *et al.* 2019; CRUZ *et al.* 2021)

Neste estudo propõe-se um processo empregando altas concentrações de açúcar no mosto (tecnologia VHG), visando obter um vinho com elevado teor alcoólico (superior à 13 °GL). Dessa forma, a fermentação alcoólica em batelada alimentada em condição VHG será realizada juntamente com uma estratégia de redução da temperatura do meio durante o cultivo. Assim, espera-se um

aumento da produção de etanol e as reduções do volume de vinhaça gerado e do gasto energético na etapa de destilação, devido à obtenção de um vinho com alta concentração de etanol.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

A presente dissertação tem como objetivo geral avaliar o efeito da redução da temperatura do meio no desempenho do processo fermentativo, durante a produção de etanol por fermentação VHG em batelada alimentada.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- ✓ Avaliar a condução da fermentação VHG em batelada alimentada em temperaturas constantes.
- ✓ Desenvolver a modelagem matemática do processo fermentativo em condição VHG em modo batelada alimentada.
- ✓ Realizar a estimativa dos parâmetros cinéticos a partir de dados experimentais obtidos em diferentes temperaturas.
- ✓ Avaliar, por meio de simulações computacionais, diferentes estratégias de redução abrupta (degrau) da temperatura durante o processo fermentativo em VHG.
- ✓ Validar experimentalmente as melhores condições definidas na etapa de simulação do processo.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Etanol como biocombustível no Brasil

A crescente preocupação com os problemas ambientais relacionados às emissões de gases de efeito estufa decorrentes do uso dos combustíveis fósseis, tem aumentado a busca por fontes alternativas de combustíveis renováveis (KECHKAR *et al.*, 2019; SAYED *et al.*, 2017). Neste cenário, o etanol se apresenta como uma fonte de energia renovável e altamente sustentável, gerando uma quantidade menor de poluentes quando comparado aos derivados do petróleo (BAI *et al.*, 2008; WHEALS *et al.*, 1999).

O etanol apresenta características físico-químicas que contribuem para uma combustão mais limpa, quando comparada a gasolina e ao óleo diesel, além de proporcionar um bom desempenho nos motores. Diferente dos outros combustíveis, o etanol possui em sua composição apenas carbono, hidrogênio e oxigênio. Assim, em sua combustão não ocorre a geração de dióxido de enxofre (liberado pela queima de combustíveis fósseis), além de também apresentar menores emissões de monóxido de carbono e hidrocarbonetos (ÚNICA, 2007; SÃO PAULO, 2014). Em 26 de dezembro de 2017, a RenovaBio (Política Nacional de Biocombustíveis) foi instituída pela Lei 13.576, que incentiva a produção de biocombustíveis no país, além de contribuir para a participação competitiva de vários biocombustíveis no mercado nacional, e também dentre outros objetivos, apoia a redução de emissões de gases causadores do efeito estufa (VIDAL, 2021, 2024).

A gasolina C, caracterizada pela adição de etanol anidro em sua composição, é o único tipo para ser distribuído em todo Brasil para abastecimento de veículos automotores. A gasolina A, denominada gasolina pura, a qual é produzida em centros petroquímicos e refinarias, é sujeita a inclusão de etanol anidro (numa proporção aproximada de 27% em volume) pelas distribuidoras de combustíveis para elaboração da gasolina C. Em 2022 os níveis produtivos de etanol anidro ultrapassaram 11 bilhões de litros. O etanol hidratado, por sua vez, é utilizado prontamente como biocombustível para

abastecer os veículos automotores movidos a etanol ou com motor Flex-Fuel. A estimativa de produção para a safra de 2023/2024 chega a quase 19 bilhões de litros de etanol hidratado (ÚNICA, 2007; ANP, 2022; BRASIL, 2022; CONAB, 2023).

### 3.1.1 Matérias primas para a produção de etanol no Brasil

No Brasil, a maior parte do etanol produzido origina-se a partir da utilização da cana-de-açúcar como matéria-prima, diferente de outros países que fazem uso da hidratação do etileno e/ou utilizam cultivares amiláceos como o trigo, arroz, mandioca, beterraba e milho, este último sendo a principal fonte de matéria-prima dos Estados Unidos para a produção de etanol (RAJAGOPAL *et al.*, 2007; MILANEZ *et al.*, 2008). Entretanto, nas últimas safras brasileiras, principalmente na região Centro-Oeste, o milho vem ganhando destaque como fonte de matéria-prima para fabricação do etanol, chegando a representar 13,4% da produção do país (VIDAL, 2022).

Ainda, entre todas as formas de produção de etanol, a rota de fermentação utilizando cana-de-açúcar como matéria-prima é a mais utilizada no Brasil, uma vez que, esse método produtivo influencia diretamente nos custos de produção das destilarias brasileiras (PACHECO, 2011; VIDAL, 2022). A partir de diversos fatores relacionados as regiões de cultivo, as variações dos tipos de solo e as diversas variedades de cana-de-açúcar disponíveis possibilitam o cultivo dessa planta em diversas áreas do país (BASSO *et al.* 2011).

Além da utilização do caldo de cana-de-açúcar nas fermentações para obtenção de etanol de primeira geração (1G), o melaço de cana é uma opção de matéria prima também utilizada nas destilarias brasileiras. Esse subproduto é derivado do processamento do açúcar (CORTEZ *et al.*, 1992). A sua aplicação nas fermentações é justificada principalmente por se tratar de um composto rico em carbono, além de apresentar baixo custo. Apresenta em sua composição sacarose (30-40%), glicose (7-9), frutose (5-12%), cinzas (7-15%), compostos nitrogenados (2-8%) e ácidos não nitrogenados (2-8%) (TECLU *et al.*, 2009). Essas concentrações podem variar de acordo com o tipo da cana-de-açúcar,

local de plantio e métodos de obtenção do açúcar, influenciando a composição e a qualidade do melaço obtido (COSTA *et al.*, 2012; QI *et al.*, 2018).

### 3.2 Biorreator STR em sistemas de fermentação

O uso de biorreatores em processos fermentativos apresenta grandes vantagens, tendo em vista a condução do processo biológico sobre condições ambientais controladas, por se tratar de um sistema fechado em que se pode integrar instrumentação (sensores de pH, temperatura, aeração, pressão, alimentação etc.) visando controlar, conter e influenciar de forma positiva as reações do meio (KAUR e SHARMA, 2021).

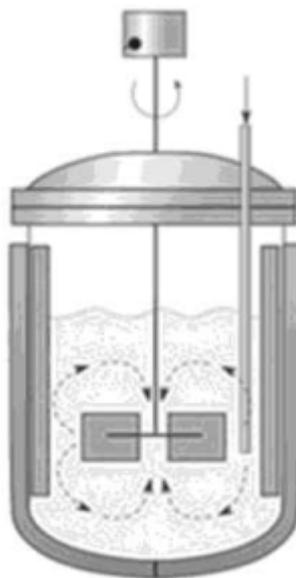


Figura 3.1 – Ilustração do biorreator STR. (Fonte: TONSO *et al.*, 2021)

O biorreator agitado mecanicamente, também conhecido como Biorreator STR (sigla do inglês “*stirred tank reactor*” - STR), pode ser utilizado na ausência ou presença de células vivas. O Biorreator STR é o mais utilizado na indústria, dentre a grande variedade de biorreatores existentes (ex.: reatores: pneumáticos, leito fixo, membranas planas, entre outros). O STR é classificado como reator de fase aquosa, onde a fermentação acontece de forma submersa, em que, sua dimensão varia a depender da demanda requerida. O Biorreator

STR (Figura 3.1) pode ser composto por um tanque cilíndrico com altura 2-3 vezes maior que o diâmetro, agitador acoplado de turbinas em seu eixo central, chicanas em seu interior tendo em vista melhorar a homogeneização e impedir a formação de vórtice em meio a agitação, podendo ainda, apresentar aspersor com intensão de promover aeração por meio de injeção de gás. As dimensões bem como os tipos de instrumentos auxiliares podem variar a depender da escala do reator e também em relação ao tipo do microrganismo (ZHONG, 2011; SCHMIDELL e FACCIOTTI, 2001; TONSO *et al.*, 2021).

### **3.3 Formas de condução dos Processos Fermentativos**

A condução de um processo fermentativo depende principalmente das características do microrganismo e tipo de meio de cultivo, tendo em vista o produto de interesse ao longo do processo. Os resultados obtidos a partir da fermentação também são decorrentes das metodologias empregadas para geração de produtos. Em um processo fermentativo típico, em batelada, o microrganismo de interesse e o meio de cultivo (contendo nutrientes adequados as necessidades nutricionais das células) são adicionados a um biorreator no início do processo, no qual com o passar do tempo a fermentação resulta no aumento de massa celular e, a depender do caso, geração de metabólitos de interesse (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

O processo em batelada, também conhecido como descontínuo, é um regime de fermentação em que o volume do biorreator é constante do início ao término da fermentação, onde não ocorre a saída ou entrada de substâncias do biorreator (TOSETTO, 2002). Em relação a problemas com contaminação, a batelada é considerada um processo seguro de fermentação, uma vez que, antes de iniciar a fermentação é indicado realizar esterilização do reator e do meio de cultivo, para então inserir um novo inóculo. São empregadas diferentes medidas de controle para garantir a ausência de agente contaminantes, a depender do microrganismo e do produto de interesse (SCHMIDELL *et al.*, 2001; TONSO, *et al.*, 2021).

A batelada alimentada (ilustrado na Figura 3.2) é outro exemplo de condução do processo fermentativo. A principal característica desse processo é que difere da batelada em termos de volume de trabalho constante. Nesta, ocorre variação de volume ( $V$ ) no decorrer do tempo de fermentação de acordo com a vazão de alimentação ( $F$ ). Essa alimentação é composta pelo meio de cultivo, podendo também apresentar variação de fluxo ou ser constante, ou seja, o volume de trabalho do biorreator vai aumentar com o passar do tempo até o término da alimentação. A batelada alimentada possibilita controle da concentração do substrato no meio fermentativo em razão da vazão ( $F$ ) de alimentação, possibilitando direcionar o metabolismo do microrganismo para rota metabólica de interesse, visando a geração de produto (CARVALHO e SATO, 2001; LIMA, 2004; TONSO *et al.*, 2021).

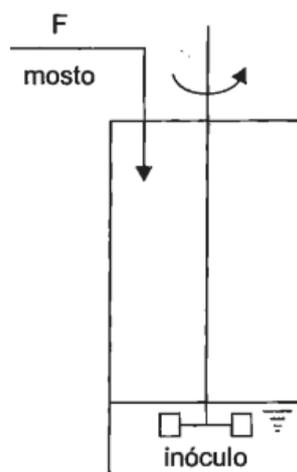


Figura 3.2 – Ilustração do processo de batelada alimentada. (Fonte: CARVALHO e SATO, 2001)

O reciclo de células integrado a condução de processo requerido (seja em batelada, batelada alimentada ou contínuo), é uma alternativa que estimula o aumento da eficiência da fermentação. Quando o microrganismo possui características que permitem o seu manejo, ao término da fermentação o mosto é submetido a separação de células por sedimentação ou centrifugação e o caldo fermentado é direcionado as operações unitárias de recuperação do produto. Essa estratégia de operação provoca a redução de tempo e custos gastos na

preparação de um novo concentrado de inóculo que esteja adaptado ao meio (CARVALHO e SATO, 2001; LIMA, 2004; TONSO *et al.*, 2021).

O processo de fermentativo contínuo (ilustrado na Figura 3.3) apresenta vazões volumétricas ( $F$ ) constantes na alimentação de substrato e saída de mosto, de modo que durante o processo não ocorre variação de volume. Caracteriza-se por apresentar longos tempos de operação em estado estacionário, com concentração de substrato limitante, células e produto permanecendo constantes no decorrer da fermentação (SCHMIDELL e FACCIOTTI, 2001; TONSO *et al.*, 2021). Na fermentação contínua é necessário estabelecer um fluxo contínuo através do reator, e pode ocorrer com reatores em série, este último sendo caracterizado pela alimentação de um dado reator ser a vazão de saída do reator anterior (SCHMIDELL *et al.*, 2001; TONSO *et al.*, 2021).

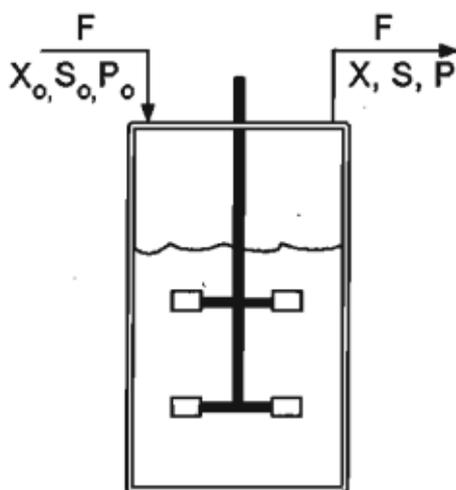


Figura 3.3 – Ilustração do sistema contínuo ( $X, S$  e  $P$  sendo concentrações de células, substrato e produto no reator e  $X_0, S_0$  e  $P_0$  referentes a tais concentrações no meio de alimentação) (Fonte: SCHMIDELL e FACCIOTTI, 2001)

A maior parte das usinas brasileiras produtoras de etanol fazem o uso de mosto formado por misturas de caldo de cana-de-açúcar e melaço (em diferentes proporções), a fim de atingir a concentração ideal de açúcares fermentáveis de cerca de 20 °Brix ( $\sim 180 \text{ g.L}^{-1}$ ) (BASSO *et al.*, 2011; VIDAL, 2022).

Aproximadamente 80% das usinas de etanol do Brasil fazem uso do processo fermentativo em batelada alimentada, ao passo que apenas 20% operam com o modo contínuo, em todas elas realizam o reciclo de leveduras (BASSO *et al.*, 2021). Nas destilarias, o processo fermentativo em batelada alimentada ocorre fazendo o uso vários de tanques (dornas), em temperaturas entre 32 e 35°C num intervalo de tempo de fermentação que varia entre 6–12 horas até que se conclua o processo fermentativo. Diante disso, a produção de etanol tem como consequência baixos valores de concentração de etanol no vinho entre 8 e 12% (v.v<sup>-1</sup>) (WHEALS *et al.*, 1999; AMORIM *et al.*, 2011; BASSO *et al.*, 2021).

### **3.4 Variáveis que afetam a Produção de Etanol**

#### **3.4.1 Microrganismo**

Dentro do reino dos fungos, diferindo dos mofo e bolores que, em sua maioria, se tratam de organismos multicelulares, as leveduras se manifestam predominantemente como organismos unicelulares (SANTIN, 1996). São capazes de utilizar diferentes fontes de carbono e energia para o seu desenvolvimento, onde a seleção por certo tipo de nutriente influencia na diversidade de espécies em diferentes nichos (FERNANDES, 2008). Por realizarem a produção de álcool por via fermentativa, as leveduras são os microrganismos mais importantes no ponto de vista econômico, com destaque para a *Saccharomyces cerevisiae* (GASPARINI, 1986). Esta se trata da espécie de levedura pertencente ao Domínio *Eukarya*, Reino *Fungi*, Filo *Ascomycota*, Classe *Hemiascomycetes*, Ordem *Saccharomycetaceae* e Gênero *Saccharomyces* (TORTORA, *et al.*, 2012).

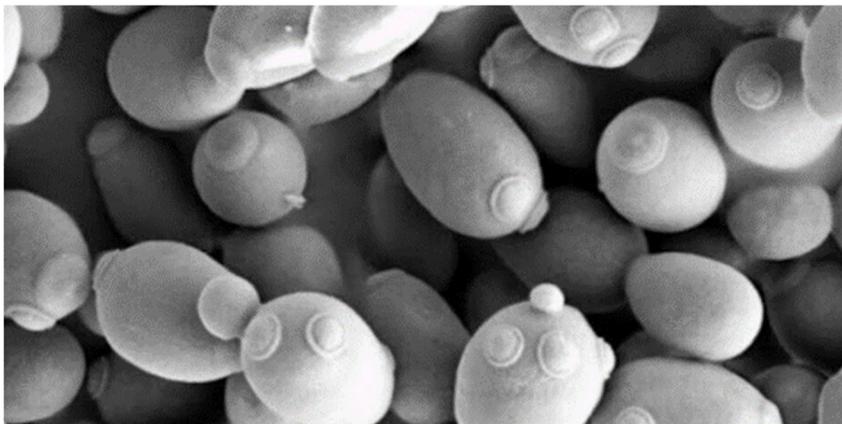


Figura 3.4 – Imagem da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. (Fonte: Everaldo Rodrigues, <https://blogeditoradaunicamp.com/2021/10/21/o-papel-da-levedura-na-historia-da-humanidade/>)

Esta levedura pode ser cultivada na presença ou ausência de oxigênio, apresentando distinções quando submetidas as mesmas. Com a presença de oxigênio, na respiração, ocorre a oxidação dos nutrientes para a manutenção substancial das necessidades vitais da célula, proporcionando aumento da massa celular com o aumento da função multiplicativa. Na ausência de oxigênio livre, o aumento da massa celular é reduzido propiciado pelo aumento da função fermentativa, que direciona o metabolismo ao consumo da fonte de carbono para produção de álcool e dióxido de carbono. Ainda, a depender da quantidade de oxigênio presente no meio e a sua disposição à célula, a respiração e fermentação podem coexistir em meio ao cultivo (GASPARINI,1986; BAEYENS *et al.*, 2015).

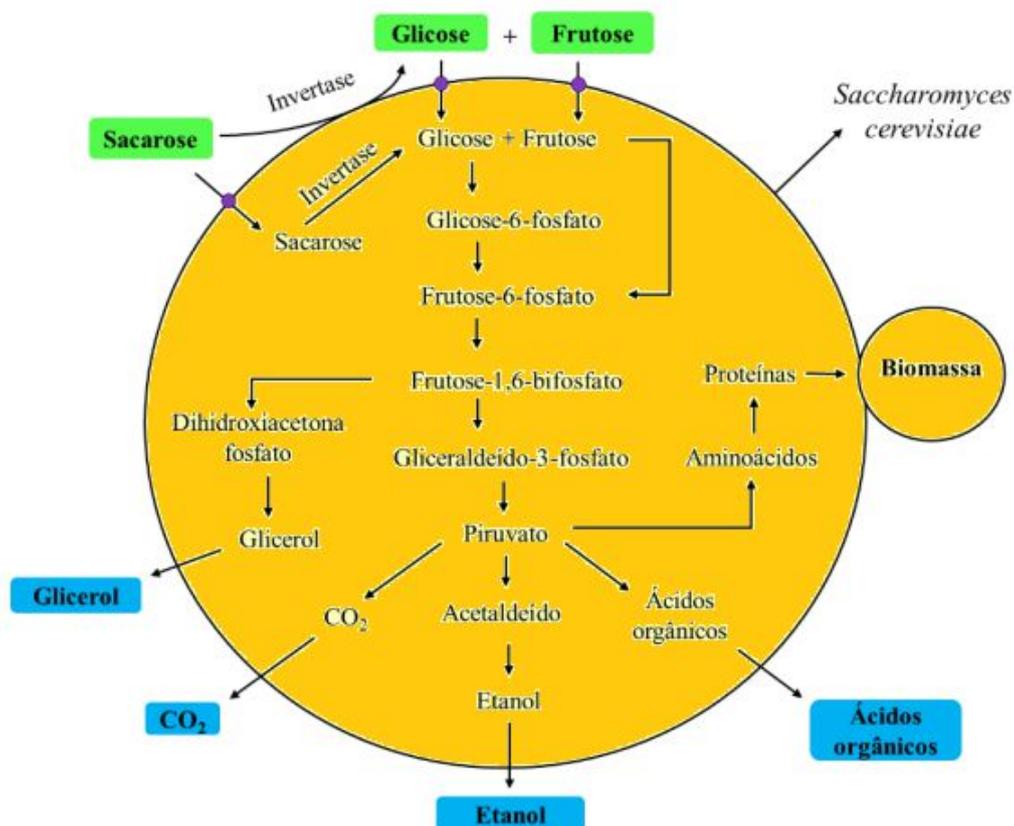


Figura 3.5 – Via metabólica da fermentação alcoólica pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. (Fonte: RODRIGUES, 2019 – Adaptado)

A *Saccharomyces cerevisiae* é comumente utilizada na fermentação alcoólica, realizando a conversão de açúcares presentes no mosto para a produção de etanol em diversos processos fermentativos, como vinho, cerveja, pão, cachaça e combustíveis. Na produção de etanol em escala industrial, essa levedura se destaca por apresentar tolerância às condições de estresse das dornas (LANDRY *et al.*, 2006; MUSSATTO, *et al.* 2010).

A Figura 3.5 ilustra a via metabólica da fermentação alcoólica da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, na qual é apresentada a reação de hidrólise da sacarose que é mediada a partir da enzima invertase presente na levedura (no meio intracelular e extracelular) gerando glicose e frutose, após reações sucessivas ocasionadas pela glicólise e são convertidas em piruvato. O piruvato é convertido a etanol e CO<sub>2</sub>, inicialmente ocorrendo a descarboxilação do piruvato gerando o acetaldeído, que é reduzido mediado pela ação da álcool-

desidrogenase para a formação do etanol (NELSON & MICHAEL, 2014; BAEYENS *et al.*, 2015).

Ao submeter um dado microrganismo de interesse ao meio de cultivo é necessário que o mesmo contenha todos os nutrientes necessários para seu desenvolvimento, ocasionando no aumento da população no meio de cultivo. Existem diversos fatores estressantes que a levedura enfrenta ao longo do processo fermentativo industrial e necessitam de controle de pH, temperatura, pressão osmótica, teor alcoólico, entre outros (FERNANDES, 2008; BASSO *et al.* 2021).

#### 3.4.2 pH

As fermentações alcólicas podem se desenvolver em uma ampla faixa de pH, mas apresentam valores ideais contidos na faixa de pH entre 4,0 e 5,0, sendo que, geralmente a faixa de pH dos mostos industriais está contida entre 4,5 a 5,5. Nos processos que utilizam o reciclo de células, antes de dar início a um novo processo, é realizado um tratamento utilizando solução de ácido sulfúrico em uma faixa de pH entre 2,0 e 3,2 em determinado intervalo de tempo para a redução da carga microbiana. A condução em meios ácidos proporciona a restrição do crescimento do fermento e conseqüente aumento no rendimento de etanol e redução da concentração de glicerol, ainda também reduzindo a contaminação bacteriana (AMORIM, 1996; LIMA, *et al.* 2001; BASSO *et al.*, 2021).

### 3.4.3 Temperatura e Etanol

A temperatura se trata de uma das mais importantes variáveis do processo fermentativo, devido a desnaturação de ribossomos, enzimas e problemas relacionados a fluidez da membrana (PHISALAPHONG *et al.*, 2006).

As leveduras são microrganismos que se desenvolvem em temperaturas moderadas. Na produção industrial apresentam faixa que varia entre 26 °C a 35 °C. Nas dornas de fermentação, a temperatura pode comumente alcançar valores de até 38 °C. A velocidade do processo fermentativo aumenta à medida em que se aumenta a temperatura no meio, porém tem como consequência o aumento da susceptibilidade da levedura à toxicidade do etanol acumulado no meio (LIMA *et al.* 2001).

O etanol se trata de um composto tóxico para a célula devido a formação de peptidoglicano reticulado que influi para que ocorra a lise celular. Esse efeito é intensificado quando ocorre o aumento da temperatura, sendo ainda agravado em meios com altas concentrações de açúcares (GRUBB E MAWSON 1993; JONES, 1989). Nos experimentos de Laluce *et al.* (2009), as fermentações conduzidas a 38 °C e 40 °C e com duração de 7 e 8 horas, respectivamente, resultaram em inibição quanto a produção de etanol e identificação de morte celular comprovada pelos baixos valores (65,9%) de viabilidade celular. Ainda neste estudo, foi recomendada a realização da redução da temperatura no processo fermentativo para obter a diminuição da morte celular e obter o consequente aumento dos níveis de produção de etanol.

A toxicidade do etanol à levedura é expressa independente da faixa de temperatura, mas podendo ser aumentada conforme é submetida a temperaturas mais elevadas, fazendo com que ocorra a interrupção do processo fermentativo ainda que apresente quantidades significativas de açúcares residuais no meio. O etanol por se tratar do principal componente tóxico para a levedura durante o processo fermentativo, em altas concentrações, passa a perturbar o processo de desenvolvimento celular, além de também de reduzir a

velocidade de produção de etanol, e por consequência interferindo na produtividade volumétrica do processo (MAIORELLA *et al.*, 1983; FERNANDES, 2008).

O efeito inibidor do etanol sobre a levedura é mais intenso conforme aumenta a temperatura, em decorrência do aumento do fluxo de entrada e saída de compostos da membrana, o que facilita o transporte de compostos tóxicos para o interior da célula (D'AMORE *et al.*, 1987; PHISALAPHONG *et al.*, 2006). As altas concentrações de etanol no processo fermentativo estimulam diversos problemas para as leveduras, como o aumento da velocidade de morte celular, que resulta na diminuição do produto requerido, provocado por uma cascata de reações prejudiciais a célula (ALMEIDA, 2017).

#### 3.4.4 Substrato

É necessário que ocorra a padronização da concentração de açúcares presentes no mosto, a qual apresenta valores em graus Brix que variam entre 15 e 28. Nas destilarias brasileiras a média é de 18 a 20 °Brix. Os mostos mais diluídos apresentam menores tempos de fermentação, mas produzem pouco etanol e requerem maiores volumes úteis nos fermentadores, maiores volumes de água para diluição e maior consumo de vapor na destilação para recuperação do etanol produzido (LIMA *et al.*, 2001; BASSO *et al.*, 2021). Contudo, o aumento da concentração dos açúcares nos mostos apresenta efeito prejudicial sobre as células de levedura, em que levam a levedura a estresse osmótico, diminuindo o crescimento e a viabilidade celular (LIMA *et al.*, 2001; CERQUEIRA, 2013; BASSO *et al.*, 2021). O processo de hidrólise da sacarose causada devido a enzima invertase presente na parede celular da levedura gera uma molécula de glicose e uma de frutose, estes açúcares contidos no mosto também designados como açúcares redutores totais - ART (ANTONINI, 2012; SANTOS, 2022).

### 3.5 Fermentação VHG

A fermentação VHG consiste em utilizar altíssimas concentrações de açúcares aplicados ao mosto de fermentação. A sigla VHG se refere ao termo em inglês *Very High Gravity*. Este tipo de fermentação faz uso de concentrações acima de 250 g.L<sup>-1</sup> de substrato com intenção de proporcionar uma fermentação com maior carga de substrato fazendo com que a concentração final de etanol também seja mais alta que 8-11% (v/v<sup>-1</sup>) obtidos nas fermentações convencionais (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008).

O uso da tecnologia VHG impõe condições estressantes às células de levedura, pois as altas concentrações de açúcares provocam o aumento da pressão osmótica, afetando a fisiologia celular. As altas concentrações de etanol obtidas ao final das fermentações em condições VHG são associadas com a perda de viabilidade durante a fermentação VHG, taxas de fermentação reduzidas e fermentações incompletas. Na aplicação da fermentação VHG para aumentar o teor alcoólico no vinho fermentado, o efeito inibidor do etanol sobre a levedura deve ser considerado (D'AMORE *et al.*, 1987; PHISALAPHONG *et al.*, 2006).

De acordo com Amorim *et al.* (1996), o efeito tóxico do etanol sobre a *Saccharomyces cerevisiae* é constante em temperaturas inferiores a 28 °C, mas é intensificado em temperaturas acima de 28 °C. A produção de etanol pode ser realizada em uma faixa de temperatura de 26 a 35 °C. Dessa forma, uma das maneiras de se aumentar a concentração de etanol no vinho é conduzir o processo fermentativo a baixa temperatura, aumentando assim a resistência da levedura ao etanol.

#### 3.5.1 Fermentação VHG aplicada em estudos científicos

No trabalho de Cruz (2015), é possível verificar a obtenção de um vinho com teor alcoólico elevado de 14,4 °GL (113,6 g.L<sup>-1</sup>), obtido a partir de condições de fermentação com alta concentração de substrato no mosto, o qual foi

conduzido em batelada alimentada à temperatura de 26 °C. O tempo para a conclusão da fermentação, considerando o consumo total do substrato, foi de 19 horas, o qual influenciou diretamente no valor de produtividade volumétrica em etanol do processo, sendo  $6,0 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , sendo considerado um valor baixo quando comparado aos  $\sim 9,0 \text{ g}_{\text{etanol}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  obtidos em processos convencionais.

Os estudos de otimização de composição de meio para fermentação em VHG de Kłosowski, Mikulski (2018), tiveram como objetivo avaliar a possibilidade de melhorar a eficiência da fermentação através da utilização de um meio de composição complementar otimizada de milho, centeio, trigo e melaço de beterraba como matérias-primas, que resultaram, dentre outros, uma maior concentração de etanol quando adicionaram 25, 33 e 50% de melaço de beterraba no mosto, obtendo valores de etanol acima de  $112 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Nestas fermentações, os substratos apresentavam cerca de 25 °Brix (aproximadamente  $240 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) e foram submetidas a análise de concentração de carboidratos nos tempos de 24, 48 e 72 horas até que os açúcares presentes fossem consumidos.

Yamakawa *et al.* (2017) realizaram uma avaliação da fermentação VHG em múltiplos estágios contínuos com recuperação, reativação e reciclagem celular utilizando uma mistura de caldo e melaço de cana-de-açúcar como matéria-prima. Foram utilizados diferentes perfis de temperatura a cada estágio, variando de 34 a 28°C de maneira decrescente a cada estágio. No último estágio, quando a temperatura atingiu 28°C ocorreu a manutenção celular e preservação de suas atividades por meio de microaeração, que por sua vez, resultou no consumo total dos açúcares e produção de 15% (v/v) de etanol. Para tais resultados foram testadas diferentes condições de microaeração e reativação, em meio de reativação formulado com 1,1 g de nitrogênio e 1,2 g de fósforo por 100 g de células (base seca) e 1,0 g de ART/g células (base seca) em condições aeróbicas, anaeróbicas com e sem a adição de nitrogênio e fósforo.

A melhoria da produção de etanol em fermentação descontínua alimentada utilizando uma mistura de caldo de cana e melaço sob condições de VHG foi estudada por Cruz, Resende e Ribeiro (2021), na qual teve como um

dos objetivos avaliar os efeitos da temperatura, concentração de açúcar e concentração celular utilizando um Delineamento Composto Central. A concentração de células, açúcar e temperatura foram 15,0% (v/v), 300 g.L<sup>-1</sup> e 27 °C respectivamente, a partir de tais condições foi possível obter 135,0 g.L<sup>-1</sup> de etanol, 4,42 g.L<sup>-1</sup> de produtividade e 90,0% de rendimento após 30 horas de fermentação.

O uso das tecnologias aplicadas a otimização produtiva visando o aumento no rendimento, são de grande importância para o país. Em termos de processamento industrial, é necessário a aplicação do aperfeiçoamento de tais tecnologias, sendo fundamental, o desenvolvimento científico e tecnológico afim de obter resultados superiores sejam para etanol de primeira e de segunda geração (PACHECO, 2011).

Embora traga benefícios ao processo, a utilização de temperaturas menores em fermentações VHG diminui a velocidade das reações do metabolismo, tornando mais lento o consumo de substrato, bem como as formações de produto e biomassa. Como consequência, a produtividade em etanol é consideravelmente menor em comparação à produtividade do processo convencional, sendo esta a principal limitação da técnica de fermentação VHG. Assim, a redução da temperatura durante o processo fermentativo pode contornar efeitos tóxicos causados pelo etanol formado na fermentação (Laluce *et al.* 2009) e ao mesmo tempo reduzir o tempo de processo em comparação a uma fermentação VHG conduzida inteiramente a uma temperatura menor.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Microrganismo e Meio de Cultivo

Utilizou-se a concentração de 20 g.L<sup>-1</sup> da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Fleischmann). O meio de fermentação foi composto por 250 g.L<sup>-1</sup> de sacarose (ART= 263,50 g.L<sup>-1</sup>), 7,78 g.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,94 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 9,44 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e 7,39 g.L<sup>-1</sup> de ureia. Tratou-se de um meio de cultivo sintético que simulou a composição do melaço e combinou uma variedade de nutrientes que essenciais para o desenvolvimento das leveduras. Ainda, foi utilizado 270 g.L<sup>-1</sup> de sacarose (ART= 284,58 g.L<sup>-1</sup>) nas validações das simulações de fermentação VHG, 8,40 g.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,10 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 10,19 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e 7,98 g.L<sup>-1</sup> de ureia.

### 4.2 Equipamento

Os ensaios de fermentação VHG foram conduzidos em um biorreator de bancada (New Brunswick modelo Bioflo 110) do tipo tanque agitado, com volume de trabalho de 1 L. Esse sistema era equipado com controlador de temperatura, pH e rotação. O aparato experimental também fez uso de bomba peristáltica (Watson Marlow 101u/r 32rpm) e banho termostático (Tecnal, TE-2005), estes se tratando de equipamentos auxiliares para a condução e controle do processo fermentativo (Figura 4.1).

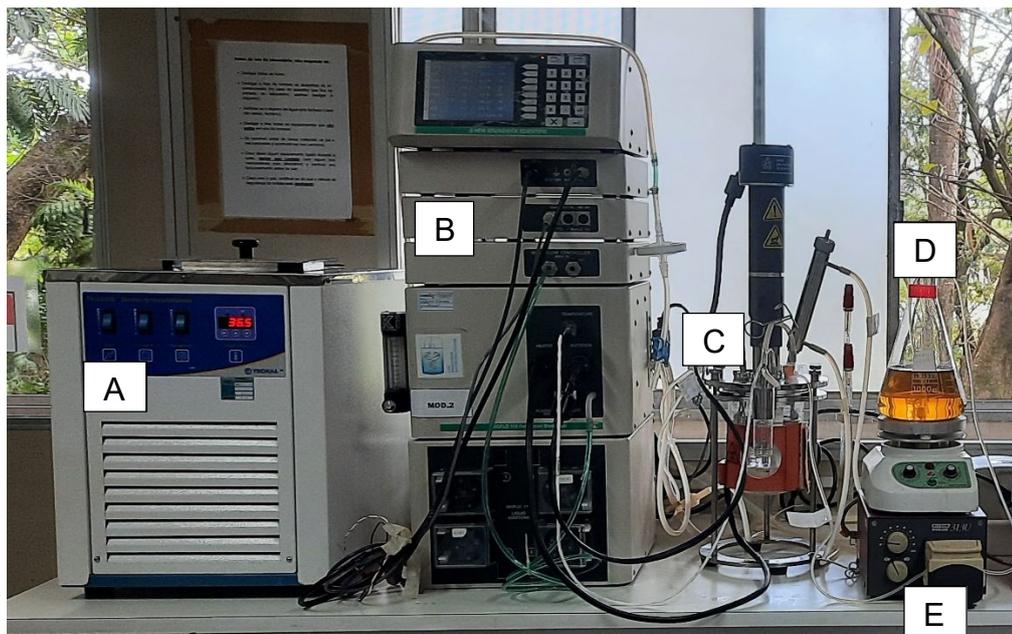


Figura 4.1 – Bancada com aparato experimental para fermentação VHG em batelada alimentada. A) Banho termostático; B) Módulo de controle; C) Biorreator; D) Substrato; E) Bomba de alimentação. (Fonte: arquivo pessoal da autora)

### 4.3 Ensaio de Fermentação VHG em Diferentes Temperaturas

Inicialmente, realizaram-se fermentações em batelada alimentada em condição VHG e temperaturas constantes de 28, 30, 32, 34 e 36 °C em duplicata, com o intuito de gerar os dados experimentais de concentração celular ( $C_X$ ), concentração de substrato ( $C_S$ ) e concentração de etanol ( $C_E$ ) para serem usados na estimativa dos parâmetros cinéticos de crescimento microbiano em função da temperatura, tais valores obtidos serão utilizados para realizar a simulação computacional da redução da temperatura durante o processo fermentativo, na sessão 4.7 deste trabalho.

### 4.4 Procedimento Experimental

Adotou-se o procedimento semelhante ao utilizado por Sonogo *et al.* (2016). Nas fermentações em batelada alimentada foi utilizado um volume de inóculo de 0,3 L (30% do volume de trabalho), o qual continha a levedura e água.

O inoculo foi previamente hidratado em água destilada e agitadas por 20 min a 150 rpm no biorreator de bancada (New Brunswick modelo Bioflo 110).

Ao volume inicial do inóculo foi alimentado 0,7 L de meio de cultivo (mosto) com tempo de enchimento da dorna ( $t_e$ ) de 7 h. Esta etapa é referente a condução de processo em batelada alimentada que atua como medida preventiva da inibição pelo substrato. Quando necessário foi utilizado antiespumante para cessar a formação excessiva de espuma. Com o enchimento da dorna, ao término do tempo de alimentação (7 horas) o processo de fermentações VHG em batelada alimentada à temperatura constante (Figuras 5.1 a 5.5) passou a ser batelada e foram conduzidos até 16 horas de fermentação.

Os experimentos de fermentação VHG com redução de temperatura por degraus, tiveram mesmo tempo de alimentação. Para redução de temperatura das fermentações foi acionado o sistema de resfriamento do biorreator para retirada de calor até que atingisse a temperatura desejada em cada degrau de temperatura, como previsto na simulação (Figuras 5.14 e 5.15).

A agitação foi mantida em 150 rpm do início até o final das fermentações. Para cada fermentação foram retirados 5 mL de amostra a cada 2 horas de processo além de também da hora 0. As amostras foram usadas para determinação das concentrações de células ( $C_X$ ), substrato ( $C_S$ ), etanol ( $C_E$ ).

#### **4.5 Modelagem Matemática da Fermentação VHG em Batelada Alimentada**

Um modelo matemático foi proposto para descrever o comportamento dinâmico do processo fermentativo em batelada alimentada em condição VHG. Para a realização da modelagem considerou-se duas fases, a fase de alimentação do mosto (batelada alimentada) e a fase em batelada. Durante a fase de enchimento da dorna, considerando geração do produto (etanol) associada ao crescimento celular e a variação do volume devido à vazão de alimentação ( $F$ ), os balanços de massa para células ( $X$ ), substrato ( $S$ ) e etanol

(E), considerando, podem ser representados por um conjunto de equações diferenciais ordinárias (Equações 1-4).

Após a etapa de alimentação do mosto, o processo fermentativo continua em modo batelada até que o substrato seja esgotado. Nesta fase da fermentação, as equações de balanço de massa, considerando volume constante ( $F=0$ ), para células (X), substrato (S) e etanol (E) podem ser representadas por um segundo conjunto de equações diferenciais (Equações 5-7).

Durante a fase de alimentação (enchimento da dorna):

$$\frac{dC_X}{dt} = \mu \cdot C_X - C_X \cdot \frac{1}{V} \cdot F \quad (1)$$

$$\frac{dC_S}{dt} = (C_{S_F} - C_S) \cdot \frac{1}{V} \cdot F - \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \mu \cdot C_X \quad (2)$$

$$\frac{dC_E}{dt} = \frac{Y_{E/S}}{Y_{X/S}} \cdot \mu \cdot C_X - C_E \cdot \frac{1}{V} \cdot F \quad (3)$$

$$\frac{dV}{dt} = F \quad (4)$$

onde:

$C_X$  é a concentração celular ( $\text{g.L}^{-1}$ ).

$\mu$  é a velocidade específica de crescimento celular ( $\text{h}^{-1}$ ).

$C_S$  é a concentração de substrato limitante ( $\text{g.L}^{-1}$ ).

$C_{S_F}$  é a concentração de substrato na alimentação ( $\text{g.L}^{-1}$ ).

$C_E$  é a concentração de etanol ( $\text{g.L}^{-1}$ ).

$Y_{X/S}$  e  $Y_{E/S}$  são os coeficientes de rendimento de substrato a células ( $\text{g}_X \cdot \text{g}_S^{-1}$ ) e a etanol ( $\text{g}_E \cdot \text{g}_S^{-1}$ ), respectivamente.

Após a etapa de enchimento da dorna:

$$\frac{dC_x}{dt} = \mu \cdot C_x \quad (5)$$

$$\frac{dC_s}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \mu \cdot C_x \quad (6)$$

$$\frac{dC_E}{dt} = \frac{Y_{E/S}}{Y_{X/S}} \cdot \mu \cdot C_x \quad (7)$$

Os coeficientes de rendimento de substrato a células e a produto (etanol),  $Y_{X/S}$  e  $Y_{E/S}$ , foram obtidos pelas Equações 8 e 9.

$$Y_{X/S} = \frac{C_{x_f} \cdot V_f - C_{x_0} \cdot V_0}{(V_f - V_0) \cdot C_{S_F} - C_{S_f} \cdot V_f} \quad (8)$$

$$Y_{E/S} = \frac{C_{E_f} \cdot V_f}{(V_f - V_0) \cdot C_{S_F} - C_{S_f} \cdot V_f} \quad (9)$$

onde:

Os subscritos "0" e "f" referem-se aos tempos inicial e final, respectivamente. O subscrito "F" refere-se à alimentação.

O modelo híbrido de Andrews-Levenspiel, considerando as inibições pelo substrato e produto dado pela Equação 10, foi utilizado como modelo cinético de crescimento celular

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{C_s}{(K_S + C_S + \frac{C_S^2}{K_{IS}})} \cdot \left(1 - \frac{C_E}{C_{E_{max}}}\right)^n \quad (10)$$

onde,  $\mu$  é a velocidade específica de crescimento celular ( $h^{-1}$ ),  $\mu_{max}$  é a velocidade específica máxima de crescimento celular ( $h^{-1}$ ),  $C_s$  é a concentração

de substrato limitante ( $\text{g.L}^{-1}$ ) (ART: açúcares redutores totais),  $K_S$  é a constante de saturação ( $\text{g.L}^{-1}$ ),  $K_{IS}$  é a constante de inibição pelo substrato ( $\text{g.L}^{-1}$ ),  $C_E$  é a concentração de etanol ( $\text{g.L}^{-1}$ ),  $C_{E_{\max}}$  é a concentração máxima de etanol a partir da qual cessa-se o crescimento celular ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e  $n$  é uma constante adimensional (BASTOS, 2010; HISS, 2001).

#### 4.6 Procedimento de Estimativa dos Parâmetros Cinéticos

Estimou-se os parâmetros cinéticos do modelo adotado utilizando o algoritmo genético (GA) para otimização, juntamente com o algoritmo de Runge-Kutta para solução numérica das equações diferenciais para cada condição de temperatura avaliada. Nessa etapa foi utilizado o software livre Scilab®.

Utilizando os dados coletados das fermentações realizadas em laboratório, conforme descrito na sessão 4.3 deste trabalho, foi possível estimar os parâmetros cinéticos ( $\mu_{\max}$ ,  $K_S$ ,  $K_{IS}$ ,  $C_{E_{\max}}$ ,  $n$ ,  $Y_{XS}$  e  $Y_{PS}$ ) para as fermentações VHG nas temperaturas constantes de 28, 30, 32 e 34 °C. O critério utilizado para encontrar o melhor ajuste foi a minimização da soma quadrados dos resíduos entre os dados calculados e experimentais.

#### 4.7 Simulação Computacional da Redução da Temperatura Durante o Processo Fermentativo

As fermentações VHG em batelada alimentada foram simuladas empregando o modelo descrito (Equações 1-7) e os parâmetros cinéticos obtidos a partir dos ensaios de fermentação nas diferentes temperaturas (36 a 28 °C). Foram realizadas simulações empregando a estratégia de redução por degraus de temperatura do meio fermentativo conforme as seguintes condições:

- ✓ Fermentações com redução de temperatura em 1, 2 e 3 degraus respeitando a variação de 36 °C - 28 °C com concentração de açúcar redutor total de  $C_S=263,50 \text{ g.L}^{-1}$ ;

- ✓ Fermentações com redução de temperatura em 1, 2 e 3 degraus respeitando a variação de 36 °C - 28 °C com concentração de açúcar redutor total de  $C_S=284,58 \text{ g.L}^{-1}$ ;

Para realização das simulações previstas nessa etapa, foi utilizado o algoritmo de Runge-Kutta para solução numérica das equações diferenciais que representam o modelo. Para tal, uma rotina contendo o modelo e o método de integração numérica foi elaborada em ambiente Scilab®.

Foram simuladas diferentes condições de redução de temperatura, cujo os resultados (Sessão 5.3) foram avaliados e discutidos para tomada de decisão de quais simulações seriam validadas. Para determinar o melhor momento para a aplicação do degrau de temperatura foi considerado as concentrações de toxicidade do etanol disponíveis na literatura, possibilitando seguir a fermentação aplicando os degraus até o consumo total de substrato, expresso em açúcares retiros totais ART.

#### **4.8 Metodologias Analíticas**

A concentração celular foi estimada pelo método da massa seca. Amostras do caldo fermentativo foram centrifugadas a 10.000 rpm e 4 °C por 10 minutos (Hettik|Zentrifugen, Rotina 420R). O sobrenadante foi reservado e o corpo de fundo lavado por duas vezes com água destilada e colocado em estufa a 80 °C por 24 h para secagem.

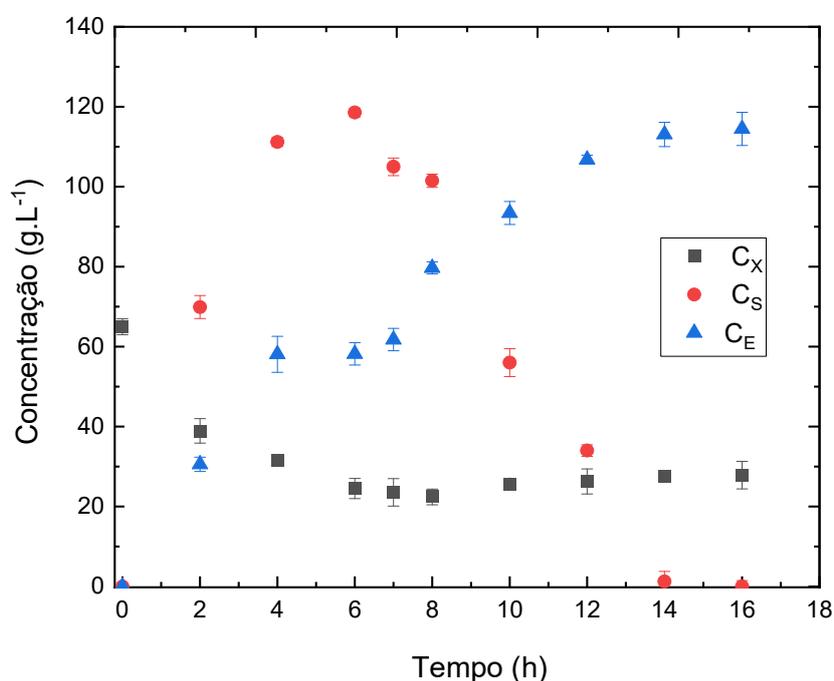
Após o tratamento de diluição e filtragem do sobrenadante, determinou-se as concentrações de sacarose, glicose, frutose e etanol por cromatografia líquida de alta eficiência (Agilent Technologies 1100), usando um detector de índice de refração e uma coluna (Aminex HPX-87H) para determinação de açúcares, conforme descrito por Sonogo *et al.* (2014). A determinação da viabilidade celular foi acompanhada através do método de coloração com azul de metileno (LEE; ROBINSON; WANG, 1981).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

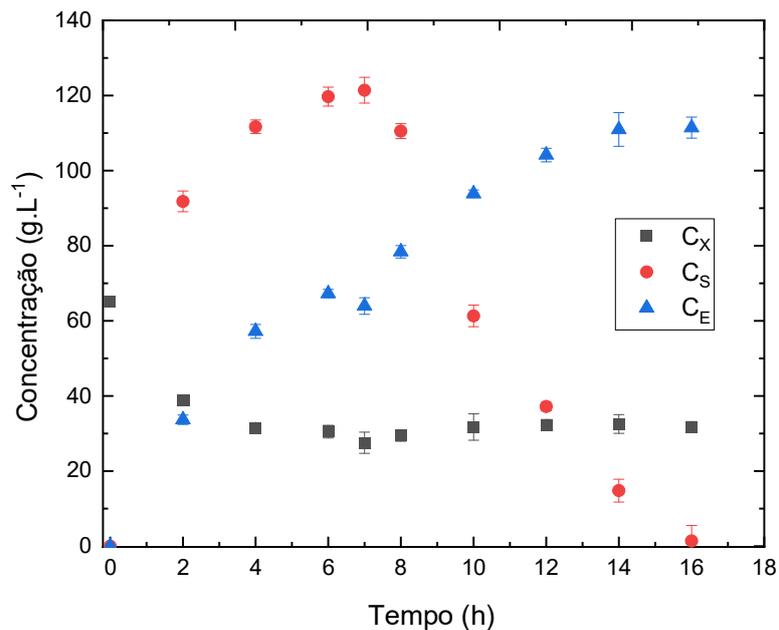
### 5.1 Fermentação VHG em batelada alimentada com diferentes temperaturas

A fim de avaliar o efeito da temperatura e para realizar a modelagem matemática da fermentação VHG em batelada alimentada, foram conduzidos experimentos de fermentação com tempo de enchimento ( $t_e$ ) da dorna de 7 horas com uma concentração de açúcares redutores totais (ART) de  $C_{S0} \sim 263,5 \text{ g.L}^{-1}$ , a qual corresponde à concentração de substrato na alimentação ( $C_{FS}$ ) de  $\sim 376,43 \text{ g.L}^{-1}$ .

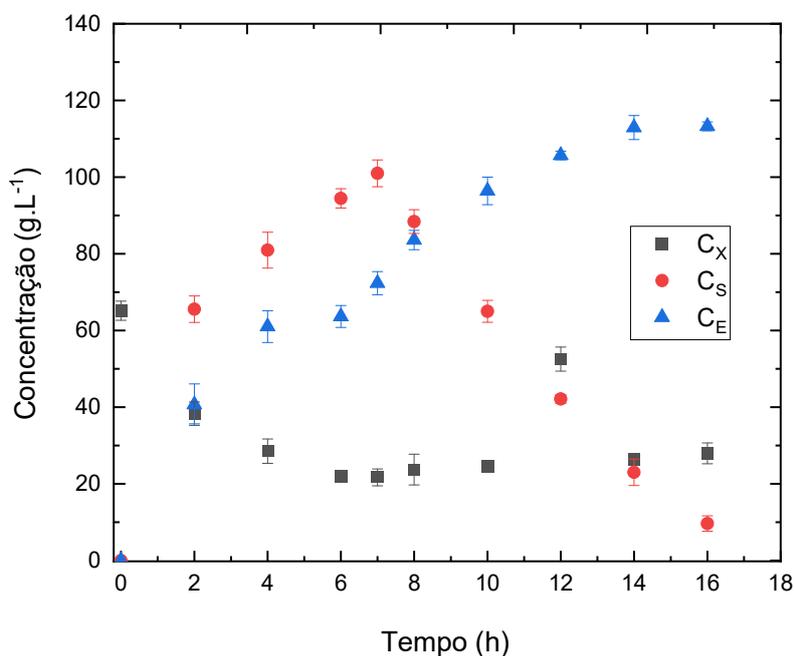
Nesta etapa, a temperatura de cada fermentação foi mantida constante. Foram avaliadas as temperaturas de 28, 30, 32, 34 e 36 °C. As Figuras 5.1, 5.2, 5.3, 5.4 e 5.5, apresentam as curvas de consumo de substrato, crescimento celular e formação de produto das fermentações nas respectivas temperaturas.



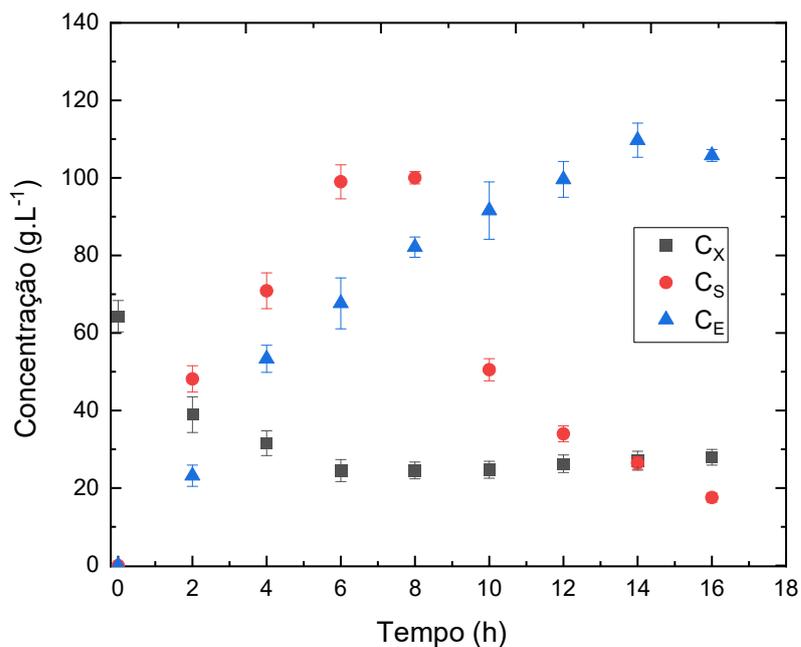
**Figura 5.1** – Valores experimentais de concentração de etanol ( $C_E$ ), concentração de substrato ( $C_S$ ) e concentração de células ( $C_X$ ) ao longo do tempo da fermentação VHG em batelada alimentada com  $C_{S0}$  de  $264,86 \pm 1,57 \text{ g.L}^{-1}$  e temperatura de 28 °C. Fonte: elaborado pela autora (2024).



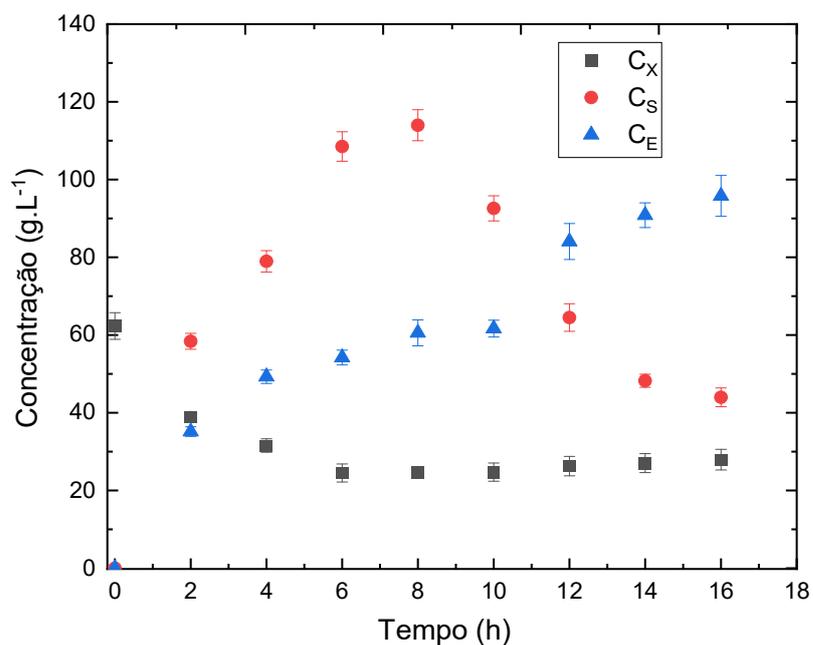
**Figura 5.2** – Valores experimentais de concentração de etanol ( $C_E$ ), concentração de substrato ( $C_S$ ) e concentração de células ( $C_X$ ) ao longo do tempo em fermentação VHG em batelada alimentada com  $C_{S0}$  de  $260,35 \pm 2,92$  g.L<sup>-1</sup> e temperatura de 30 °C. Fonte: elaborado pela autora (2024).



**Figura 5.3** – Valores experimentais de concentração de etanol ( $C_E$ ), concentração de substrato ( $C_S$ ) e concentração de células ( $C_X$ ) ao longo do tempo em fermentação VHG em batelada alimentada com  $C_{S0}$  de  $269,74 \pm 3,53$  g.L<sup>-1</sup> e temperatura de 32 °C. Fonte: elaborado pela autora (2024).



**Figura 5.4** – Valores experimentais de concentração de etanol ( $C_E$ ), concentração de substrato ( $C_S$ ) e concentração de células ( $C_X$ ) ao longo do tempo em fermentação VHG em batelada alimentada com  $C_{S0}$  de  $263,97 \pm 2,04$  g.L<sup>-1</sup> e temperatura de 34 °C. Fonte: elaborado pela autora (2024).



**Figura 5.5** – Valores experimentais de concentração de etanol ( $C_E$ ), concentração de substrato ( $C_S$ ) e concentração de células ( $C_X$ ) ao longo do tempo em fermentação VHG em batelada alimentada com  $C_{S0}$  de  $276,97 \pm 3,81$  g.L<sup>-1</sup> e temperatura de 36 °C. Fonte: elaborado pela autora (2024).

Analisando os gráficos apresentados, podemos notar que ao término da alimentação nas fermentações, no tempo de  $t_e = 7$  horas, é observada a maior concentração de açúcares no meio. Esse tempo de alimentação foi importante para manter a concentração de açúcares no meio abaixo de  $125 \text{ g.L}^{-1}$  (Figuras 5.1 a 5.5), uma vez que, para *Saccharomyces. Cerevisiae*, concentrações de substrato superiores a  $150 \text{ g.L}^{-1}$  causam ação inibitória sobre as células de levedura (THATIPAMALA, ROHANI e HILL, 1992; ALVES, 1996, SONEGO *et al*, 2016). O tempo de enchimento da dorna de 7 horas, foi capaz de manter a concentração de substrato no caldo de fermentação em valores inferiores a  $150 \text{ g.L}^{-1}$ , mesmo em condição de VHG. Assim, a condução das fermentações em batelada alimentada auxiliou na viabilização do processo fermentativo, pois reduziu a inibição das células causada pela alta concentração de substrato no meio em condições de altíssima concentração de substrato no mosto. Esse resultado já era esperado por ser característico da batelada alimentada, que por sua vez minimiza os efeitos de inibição pela alta concentração do substrato das fermentações (LIMA, 2004; CARVALHO *et al.* 2001; BASSO *et al.* 2021). Para os ensaios de fermentação VHG conduzidas neste trabalho, esse foi um ponto muito importante para evitar que as células ficassem sujeitas a elevadas concentrações de substrato ( $\sim 250 \text{ g.L}^{-1}$ ). Tal estratégia pode ser observada em trabalhos de fermentação alcoólica conduzidos em batelada alimentada, como o de Gomes (2020) que para concentrações totais de substrato alimentado na dorna maiores que  $240 \text{ g.L}^{-1}$ , variou o tempo de enchimento da dorna entre 5 e 10 horas conforme a concentração do substrato na alimentação, a fim de diminuir o seu acúmulo durante a fermentação.

As fermentações foram conduzidas até o tempo de 16 horas, a fim de observar o comportamento da concentração de células ( $C_X$ ), substrato ( $C_S$ ) e etanol ( $C_E$ ) ao longo do tempo para cada temperatura avaliada. A Tabela 5.1 apresenta os valores de  $C_X$ ,  $C_S$  e  $C_E$  referentes ao tempo final de fermentação (16 h), onde é possível observar que o substrato foi consumido por completo na fermentação à  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ . Contudo, as fermentações conduzidas a 30, 32, 34 e  $36 \text{ }^\circ\text{C}$  apresentaram  $1,37 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $9,65 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $17,53 \text{ g.L}^{-1}$  e  $32,07 \text{ g.L}^{-1}$  de  $C_{Sf}$  residual

respectivamente, notando que conforme houve o aumento da temperatura os valores de açúcares residuais foram maiores ao final de 16 horas de fermentação. No trabalho de fermentação VHG com redução de estresse oxidativo de Burphan *et al.* (2018), avaliou-se o desempenho da cepa selvagem de levedura BY4742 em meio YPD30 com concentração de 300 g.L<sup>-1</sup> de glicose. As fermentações foram conduzidas até 48 horas às temperaturas de 30 e 40 °C, resultando em aproximadamente 125 g.L<sup>-1</sup> e 225 g.L<sup>-1</sup> de açúcar residual, respectivamente. Podemos observar que em ambas as fermentações tiveram um alto valor de açúcar residual, sendo ainda mais expressivo quando submetida a temperatura de 40°C.

Para a fermentação conduzida na temperatura de 28 °C, ocorreu o consumo total de substrato (Tabela 5.1) ao final de 16 h de processo, com produção total de 114,48 g.L<sup>-1</sup> de etanol. A fermentação realizada à 30 °C no mesmo intervalo de tempo (16 h) apresentou 1,37 g.L<sup>-1</sup> de substrato e concentração de etanol de 113,49 g.L<sup>-1</sup> de etanol. No experimento conduzido à 32 °C, foi possível obter 110,26 g.L<sup>-1</sup> de etanol e consumo de substrato  $C_{sf}=9,65$  g.L<sup>-1</sup> em 16 horas de fermentação. A fermentação à 34 °C resultou em uma concentração de etanol de 105,78 g.L<sup>-1</sup> de etanol, não havendo o consumo total do substrato,  $C_{sf}=17,53$  g.L<sup>-1</sup>, ao final de 16 horas de cultivo. Por último a fermentação à 36 °C nos tempos de 16 horas apresentou 32,07 g.L<sup>-1</sup> de substrato, obtendo 95,46 g.L<sup>-1</sup> de etanol.

A comparação direta entre as fermentações apresentadas nas Figuras 5.1 e 5.5 mostra uma diferença entre os perfis de  $C_x$ ,  $C_s$  e  $C_e$ , evidenciando a influência da temperatura no decorrer das fermentações. Este fato ocorreu devido a inibição causada pela alta concentração do produto formado, o etanol, e sua influência em temperaturas mais elevadas. Com o aumento da temperatura, a célula fica mais suscetível a entrada de compostos tóxicos (etanol) para dentro da célula, pois ocorre o aumento na fluidez da membrana, deixando assim o nível tóxico do etanol mais pronunciado em temperaturas maiores (D'MORE *et al.* 1987; PHISALAPHONG *et al.* 2006; FERNANDES 2008; MONTEIRO 2016).

**Tabela 5.1** – Comparativo entre os valores finais de  $C_{Sf}$ ,  $C_{Ef}$  e  $C_{Xf}$  para as fermentações VHG em batelada alimentada em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Tempo de fermentação (h)	$C_{Sf}$ (g.L <sup>-1</sup> )	$C_{Ef}$ (g.L <sup>-1</sup> )	$C_{Xf}$ (g.L <sup>-1</sup> )
28		0,44 ± 1,45	114,48 ± 3,99	27,84 ± 3,45
30		1,37 ± 4,15	113,59 ± 2,82	31,74 ± 1,45
32	16	9,65 ± 2,00	110,26 ± 1,14	27,96 ± 2,73
34		17,53 ± 2,03	105,78 ± 1,52	27,94 ± 2,03
36		32,07 ± 2,41	95,81 ± 5,26	26,24 ± 2,49

Fonte: elaborado pela autora (2024).

Para as fermentações realizadas nas diferentes temperaturas (Figuras 5.1 até 5.5), foram obtidos os valores de produtividade volumétrica de etanol, os quais foram 7,15; 7,09; 6,89; 6,61 e 5,98 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> para as temperaturas de 28, 30, 32, 34 e 36 °C, respectivamente, em que observamos maiores os valores de produtividade para as fermentações conduzidas à menores temperaturas. Veloso *et al.* (2019) realizaram fermentações com a cepa industrial de *Saccharomyces cerevisiae* Y-904 em batelada alimentada utilizando temperaturas constantes de 28, 30, 32 e 34 °C, com as respectivas concentrações de substrato de 305,40; 262,60; 234,20 e 207,40 g.L<sup>-1</sup>. No trabalho, foram alcançados valores de 7,94; 6,79; 8,19 e 8,93 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> de produtividade volumétrica de etanol. Podemos observar que as fermentações conduzidas a temperaturas mais baixas apresentaram concentração de substrato maiores. Realizando a comparação da fermentação conduzida à 30 °C e concentração de substrato equivalente à deste estudo ( $C_{S0}$ = 260,35 g.L<sup>-1</sup>),

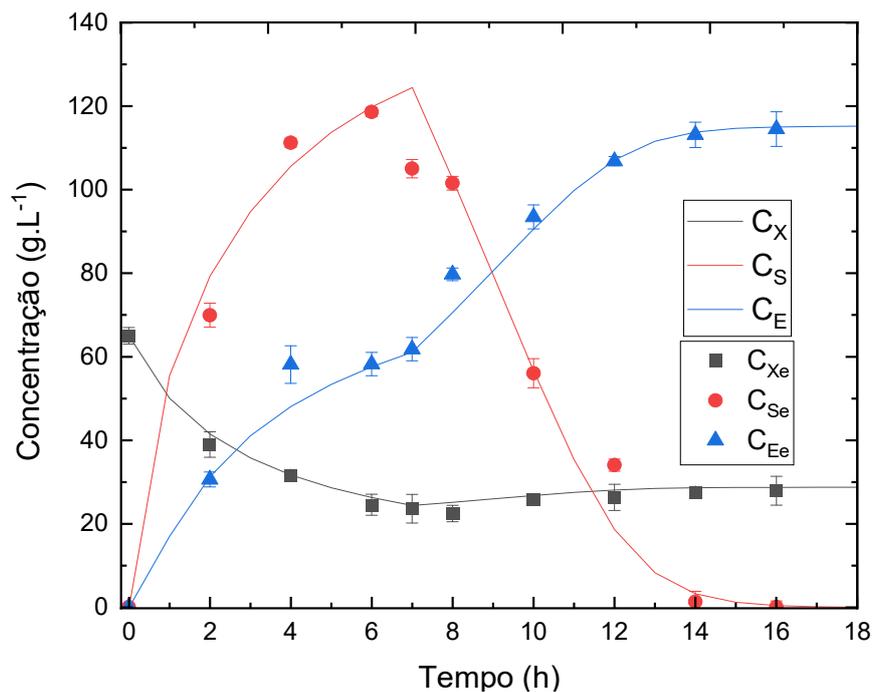
notamos valor de produtividade similares tendo em vista as diferentes cepas de leveduras utilizadas nos trabalhos, demonstrando que a fermentação apresentada condiz com o apresentado na literatura.

Em vista desses resultados, considerando a levedura (*Saccharomyces cerevisiae* - Fleischmann) utilizada e condições experimentais adotadas, fica evidente que a temperatura do cultivo apresentou uma influência no consumo total do substrato e, conseqüentemente, a formação de produto. Foi possível observar que conforme as fermentações foram realizadas em temperaturas mais baixas, o efeito de inibição pelo etanol foi minimizado e, conseqüentemente, ocorreu o consumo total dos açúcares em um menor tempo de fermentação.

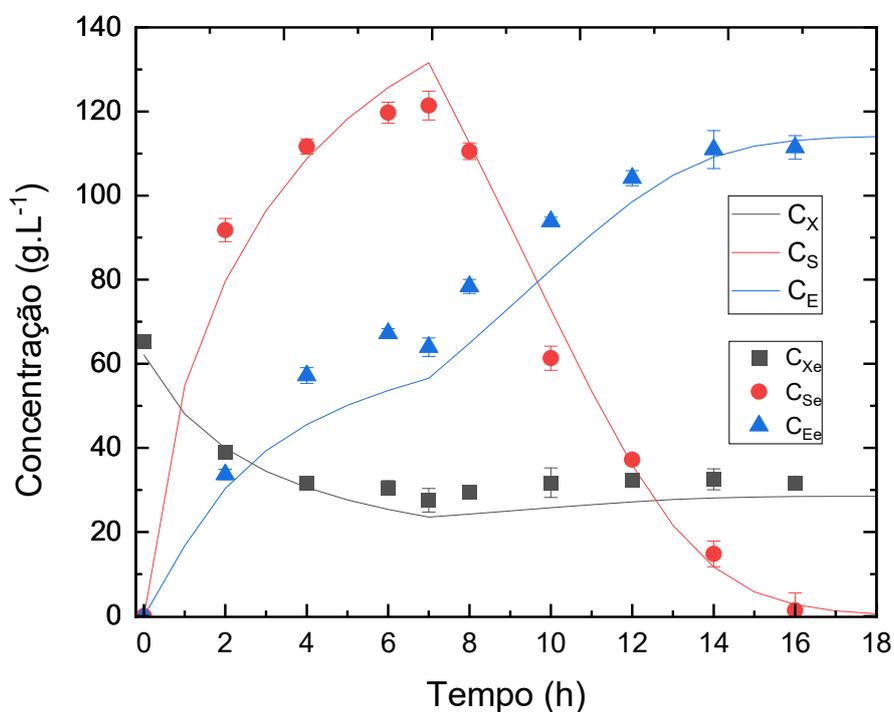
## 5.2 Ajuste de Modelo e Estimativa de Parâmetros Cinéticos

Para determinar os parâmetros do modelo cinético híbrido, primeiramente, os coeficientes de rendimento em células e etanol ( $Y_{X/S}$  e  $Y_{E/S}$ ) foram calculados. Na sequência, os parâmetros cinéticos  $\mu_{max}$ ,  $K_S$ ,  $K_{IS}$ ,  $C_{Emax}$  e  $n$  foram estimados utilizando o algoritmo de Nelder e Mead (1965) para otimização e o método de Runge-Kutta para a resolução numérica do sistema de equações diferenciais. Valores dos parâmetros cinéticos foram obtidos com base nos melhores ajustes entre os valores calculados e experimentais de  $C_X$ ,  $C_S$  e  $C_E$  das fermentações em batelada alimentada nas diferentes temperaturas.

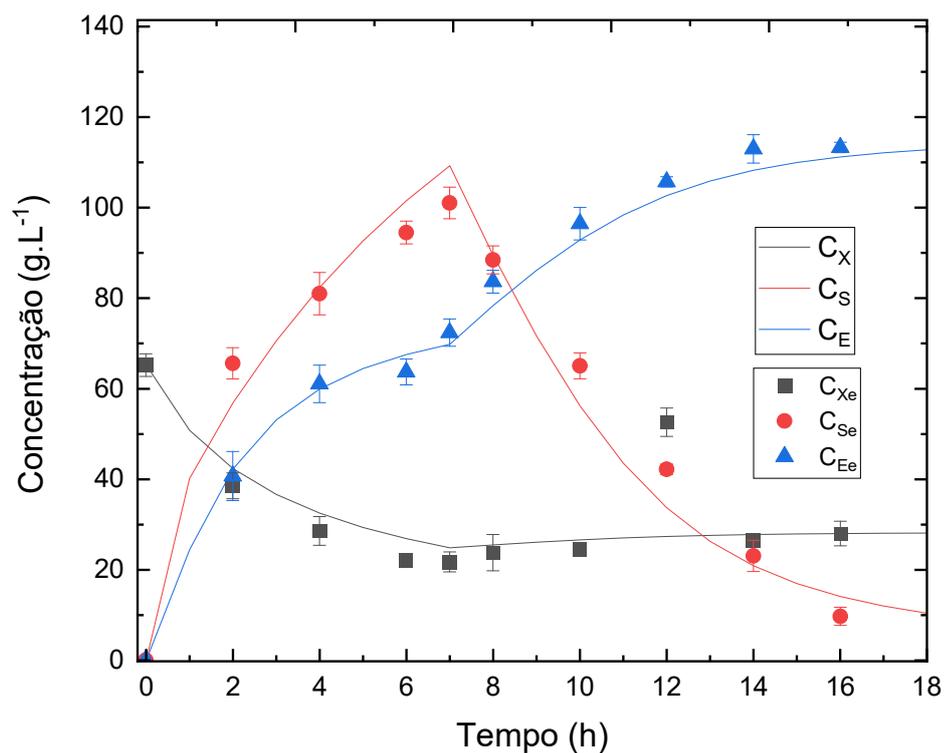
Conforme apresentado nas Figuras 5.6, 5.7, 5.8, 5.9 e 5.10, pode-se observar o excelente ajuste dos dados calculados aos dados experimentais, indicando que o modelo cinético adotado foi adequado para descrever o comportamento cinético das fermentações em diferentes temperaturas (28°C, 30°C, 32°C, 34°C e 36°C).



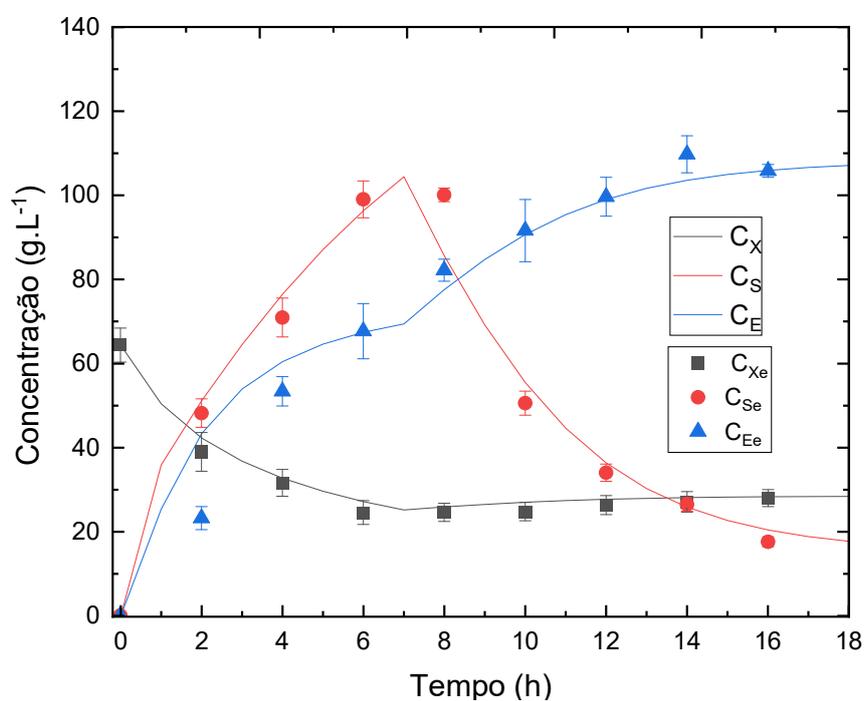
**Figura 5.6** – Comparação entre os valores simulados (linhas) e experimentais (símbolos) para a fermentação VHG em batelada alimentada com  $C_{S0} = 264,86 \pm 1,57 \text{ g.L}^{-1}$  e temperatura de 28 °C. Fonte: elaborado pela autora (2024).



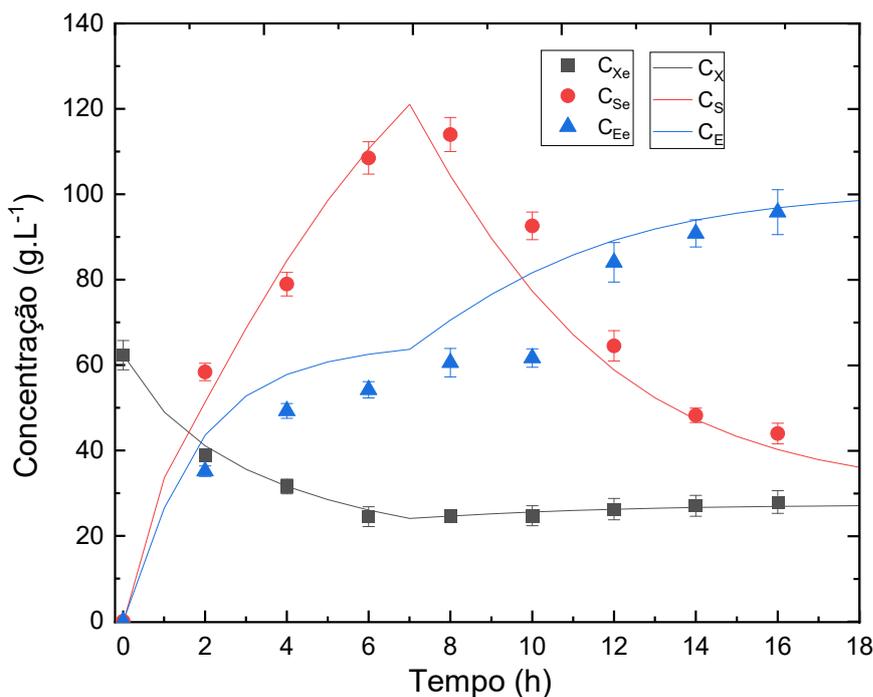
**Figura 5.7** – Comparação entre os valores simulados (linhas) e experimentais (símbolos) para a fermentação VHG em batelada alimentada com  $C_{S0} = 260,35 \pm 2,92 \text{ g.L}^{-1}$  e temperatura de 30 °C. Fonte: elaborado pela autora (2024).



**Figura 5.8** – Comparação entre os valores simulados (linhas) e experimentais (símbolos) para a fermentação VHG em batelada alimentada com  $C_{S0} = 269,74 \pm 3,53 \text{ g.L}^{-1}$  e temperatura de 32 °C. Fonte: elaborado pela autora (2024).



**Figura 5.9** – Comparação entre os valores simulados (linhas) e experimentais (símbolos) para a fermentação VHG em batelada alimentada com  $C_{S0} = 263,97 \pm 2,04 \text{ g.L}^{-1}$  e temperatura de 34 °C. Fonte: elaborado pela autora (2024).



**Figura 5.10** – Comparação entre os valores simulados (linhas) e experimentais (símbolos) para a fermentação VHG em batelada alimentada com  $C_{S0} = 276,97 \pm 3,81$  g.L<sup>-1</sup> e temperatura de 36 °C. Fonte: elaborado pela autora (2024).

Na Tabela 5.2 são mostrados os valores estimados dos parâmetros cinéticos relativos às fermentações VHG em batelada alimentada nas diferentes temperaturas avaliadas (28 – 36 °C).

Observando a Tabela 5.2, pode-se verificar o comportamento dos parâmetros cinéticos de  $\mu_{max}$ ,  $K_s$ ,  $K_{is}$ ,  $C_{E_{max}}$ ,  $n$ ,  $Y_{xs}$  e  $Y_{ps}$  obtidos para cada temperatura de fermentação. Os valores para o  $K_{is}$ ,  $Y_{xs}$  e  $Y_{ps}$  apresentam mínimas variações à medida em que se alterou a temperatura. Contudo, é nítida a variação dos valores do  $\mu_{max}$ ,  $K_s$ ,  $n$ , e  $C_{E_{max}}$ . Pode ser observado que para os parâmetros de  $\mu_{max}$  e  $n$  ocorreu um aumento dos seus respectivos valores conforme a elevação da temperatura, e o contrário ocorreu quando observados os valores de  $C_{E_{max}}$  e  $K_s$ . Essas variações nos parâmetros também foram relatadas por Veloso *et al.* (2019), em um trabalho que utilizou a linhagem industrial da levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y-904 para estimativa de

parâmetros em diferentes temperaturas, em fermentações em batelada com concentração de substrato de 180 g.L<sup>-1</sup>.

Tabela 5.2 – Parâmetros cinéticos para as fermentações conduzidas a 28, 30, 32, 34 e 36°C.

Parâmetros	Temperatura (° C)				
	28	30	32	34	36
$\mu_{\text{máx}} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0,0840	0,090	0,119	0,140	0,152
$K_s \text{ (g.L}^{-1}\text{)}$	49,47	44,62	39,88	34,60	30,96
$K_{IS} \text{ (g.L}^{-1}\text{)}$	117,71	116,95	117,12	118,04	117,58
$C_{E\text{máx}} \text{ (g.L}^{-1}\text{)}$	147,42	136,28	115,10	108,31	101,23
$n \text{ (-)}$	0,20	0,35	0,69	0,75	0,95
$Y_{x/s} \text{ (g} \times \text{g}^{-1}\text{)}$	0,032	0,035	0,035	0,038	0,035
$Y_{E/S} \text{ (gEG}^{-1}\text{)}$	0,440	0,439	0,435	0,435	0,410

Fonte: elaborado pela autora (2024).

É importante destacar que, quando se trata de crescimento celular admite-se que as células (X) e o substrato limitante (S) são as espécies envolvidas, uma vez que a velocidade de crescimento é função das concentrações dos reagentes e da temperatura. Logo, a velocidade específica de crescimento celular ( $\mu$ )

também é função de  $C_S$  e da temperatura. Os modelos cinéticos de crescimentos celular consideram que as variações  $C_S$  influenciam  $\mu$ , assim tais modelos são função de  $C_S$ . O  $\mu_{max}$  contido nos modelos cinéticos depende da temperatura do cultivo. A partir disso é possível compreender a relação da dependência da velocidade de crescimento com  $C_X$ ,  $C_S$  e temperatura. (HISS, 2001; BADINO JR *et al.* 2012).

A partir dos resultados apresentados na Tabela 5.2, os parâmetros que variaram com a temperatura,  $\mu_{max}$ ,  $n$ ,  $K_S$ , e  $C_{Emax}$ , foram escritos em função da temperatura, assim como nos trabalhos de Rivera *et al.* (2006), Rivera *et al.* (2007) e Veloso *et al.* (2019), aos quais fizeram uso de modelagem matemática para descrever a cinética dos processos dependentes da temperatura. No presente estudo, também foi possível realizar essa mesma abordagem, com o auxílio do software *OriginPro graphing & analysis*, em que foram obtidos os parâmetros para as Equações 11 e 12, conforme apresentado na Tabela 5.3. Os parâmetros escritos em função da temperatura foram utilizados na simulação das fermentações em VHG aplicando a estratégia de redução da temperatura por degrau ao longo do processo, conforme demonstrado na sessão 5.3. Podemos observar na Tabela 5.3 que a equação ajustada para cada parâmetro apresentou elevado valor para o coeficiente de correlação ( $R^2$ ).

$$ae^{\frac{(-b)}{T(^{\circ}C)}} \quad (11)$$

$$e^{(a+bT(^{\circ}C)+cT(^{\circ}C)^2)} \quad (12)$$

Tabela 5.3 – Equações para  $\mu_{\max}$ ,  $K_s$ ,  $n$  e  $C_{E\max}$  ajustadas em função da temperatura.

Parâmetros	Equações	R <sup>2</sup>
$\mu_{\max} =$	$(1,52 \pm 0,42)e^{\frac{(-82,40 \pm 9,17)}{T(^{\circ}C)}}$	0,97
$K_s =$	$(6,35 \pm 0,84)e^{\frac{(57,9 \pm 4,09)}{T(^{\circ}C)}}$	0,98
$C_{E\max} =$	$(25,05 \pm 3,67)e^{\frac{(49,85 \pm 4,54)}{T(^{\circ}C)}}$	0,98
$n =$	$e^{(-27,22 \pm 12,46) + (1,48 \pm 0,75)T(^{\circ}C) + (-0,020 \pm 0,011)T(^{\circ}C)^2}$	0,97

Fonte: elaborado pela autora (2024).

### 5.3 Avaliação da estratégia de redução da temperatura por degrau durante a fermentação VHG

Os valores dos parâmetros  $\mu_{\max}$ ,  $K_s$ ,  $K_{is}$ ,  $C_{E\max}$ ,  $n$ ,  $Y_{xs}$  e  $Y_{ps}$  (Tabela 5.2), os parâmetros escritos em função da temperatura  $\mu_{\max}$ ,  $K_s$ ,  $n$ , e  $C_{E\max}$ . (Tabela 5.3) e o modelo descrito para representar a fermentação VHG em batelada alimentada (Sessão 4.5), foram utilizados em conjunto para avaliar o efeito da redução da temperatura sobre a dinâmica da fermentação alcoólica em batelada alimentada.

Foram avaliados os efeitos da redução da temperatura nas concentrações de substrato e de etanol em fermentações em batelada alimentada realizados com concentrações de substrato de 250 e 270 g.L<sup>-1</sup>, (valores de ART equivalentes a 263,50 e 284,58 g.L<sup>-1</sup> respectivamente). Foi investigada a

aplicação de 1, 2 e 3 degraus de redução de temperatura, obedecendo o intervalo entre 28 °C e 36 °C, conforme é apresentado na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 – Simulações de fermentação VHG com aplicação de 1, 2 e 3 degraus de temperatura para  $C_{S0}$  de 263,50 e 284,58 g.L<sup>-1</sup>

	$C_{S0}=263,50 \text{ g.L}^{-1}$			$C_{S0}=284,58 \text{ g.L}^{-1}$	
	$C_{Ed}$ (g.L <sup>-1</sup> )	Tempo (h)	$C_{Sf}$ (g.L <sup>-1</sup> )	Tempo (h)	$C_{Sf}$ (g.L <sup>-1</sup> )
<b>1 degrau (°C)</b>					
36 - 28	60	17	0,41	22	0,55
	70	17	0,51	25	0,65
	80	17	0,92	30	2,87
36-30	60	16	0,94	30	7,95
	70	17	0,54	30	8,45
34-28	60	17	0,43	22	0,55
	70	17	0,46	23	0,65
34-30	60	16	0,98	30	7,89
	70	17	0,49	30	7,99
<b>2 degraus (°C)</b>					
36-34-32	60;80	20	0,59	32	37,52
36-34-30	60;80	17	0,66	24	0,61
36-32-30	60;80	17	0,46	32	7,88
36-32-28	60;80	16	0,97	24	0,60
34-32-30	60;80	17	0,48	32	7,87
34-32-28	60;80	17	0,42	23	0,67
<b>3 degraus (°C)</b>					
34-32-30-28	40;60;80	16	0,81	21	0,62
36-34-32-30	40;60;80	16	0,99	32	7,18
36-32-30-28	40;60;80	16	0,73	21	0,60

$C_{Ed}$  - concentração de etanol para aplicação de degrau;  $C_{Sf}$  - consumo final do substrato. Fonte: elaborado pela autora (2024).

Para definir os critérios adotados na determinação do degrau simulado (concentração de etanol para aplicação de degrau –  $C_{Ed}$ ), foram realizadas simulações testes, dos quais consideram diferentes concentrações de etanol que foram avaliadas, podendo ser observados na Tabela 5.4 e discutida a seguir. É possível observar que nos momentos de aplicação dos degraus os valores de  $C_{Ed}$  aplicadas são inferiores aos valores de  $C_{Emáx}$  (Tabela 5.2) ou seja, evitando que o degrau de redução da temperatura ocorra próximo ao valor do parâmetro relacionado com a inibição do processo provocada pelo etanol. As condições para  $C_{Ed}$  foram escolhidas com base na informação de que quando a concentração de etanol atinge valores superiores a  $60 \text{ g.L}^{-1}$ , é observado maior efeito adverso do etanol sobre as células de levedura (TAYLOR *et al.* 1996; SONEGO *et al.* 2014, 2016). Dessa forma, optou-se por realizar as simulações com o início da aplicação do degrau de redução da temperatura quando a concentração de etanol no caldo atingisse o valor de  $60 \text{ g.L}^{-1}$ .

Nas simulações com 1 degrau, foram aplicados degraus quando  $C_{Ed}$  atingiu valores de  $60, 70$  e  $80 \text{ g.L}^{-1}$  de etanol. Para definir o tempo final das fermentações, foram considerados o consumo total do substrato  $C_{Sf}$  de cada simulação. Para as concentrações de  $C_{S0}$  de  $263,50 \text{ g.L}^{-1}$  houve o esgotamento do substrato em 16 ou 17 horas de fermentação, dependendo da condição de  $C_{Ed}$ . No entanto, para valores de  $C_{S0}$  de  $284,58 \text{ g.L}^{-1}$ , houve o esgotamento de substrato em 22 horas de fermentação nas simulações com degraus  $36\text{-}28^\circ\text{C}$  e  $34\text{-}28^\circ\text{C}$ , enquanto as demais simulações apresentadas, não foi observado o esgotamento de substrato. Isso mostra que para fermentações com maiores concentrações de substrato, é necessário reduzir mais a temperatura a fim de contornar os efeitos inibitórios causados pelo etanol.

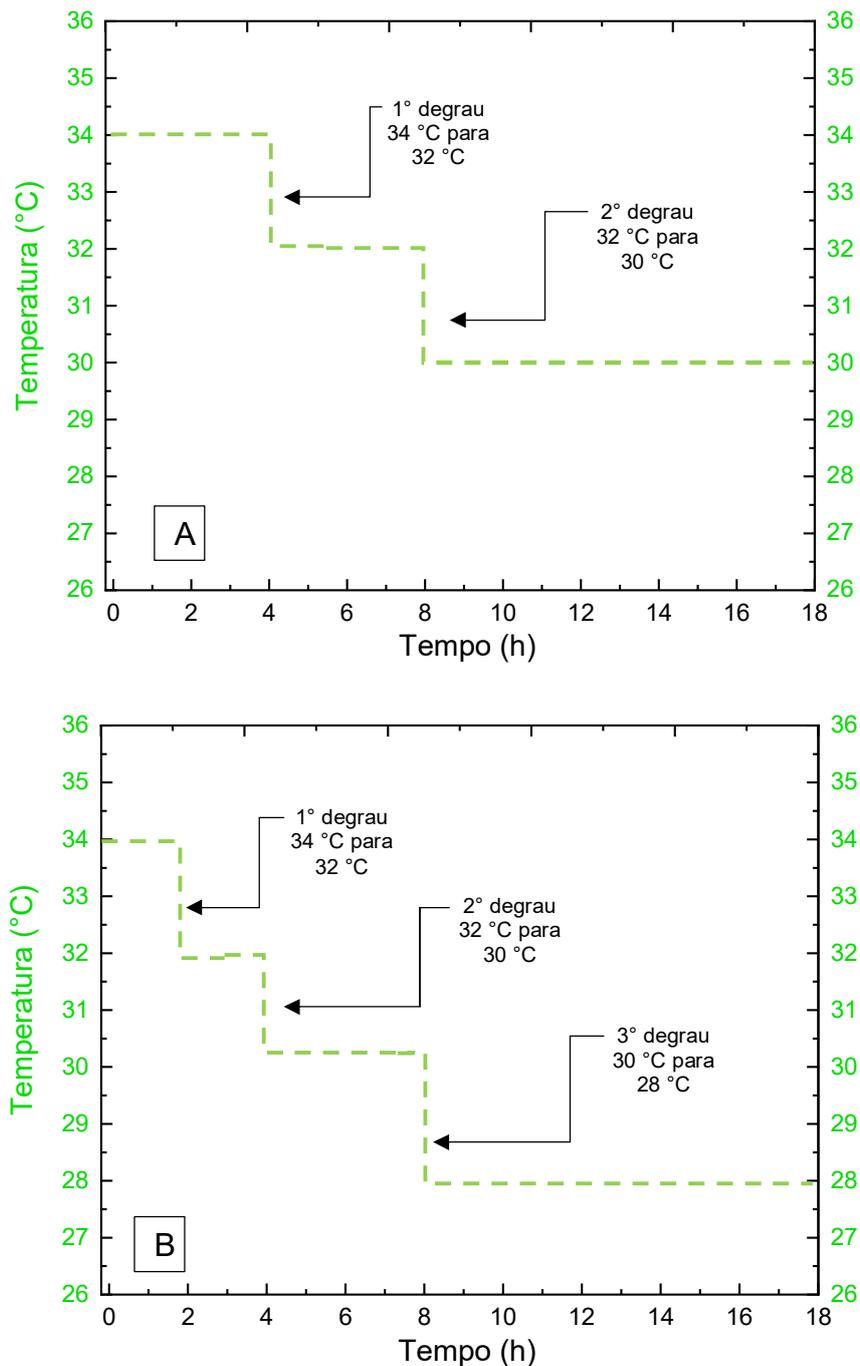
Com a aplicação de 2 degraus, fixando  $C_{Ed}$   $60 \text{ g.L}^{-1}$  para o primeiro degrau e  $80 \text{ g.L}^{-1}$  para o segundo degrau, aplicou-se diferentes estratégias de queda de temperatura. Nas fermentações com  $C_{S0}$  de  $263,50 \text{ g.L}^{-1}$  para cada degrau de temperatura simulado foi possível observar que houve o consumo total do substrato em 16, 17 e 20 horas de fermentação. Para  $C_{S0}$  de  $284,58 \text{ g.L}^{-1}$ , houve o esgotamento do substrato em 23 e 24 horas de fermentação, para simulações

nas temperaturas com degraus em 34-32-28 °C e 36-34-30 °C; 36-32-28 °C respectivamente.

Por fim, as simulações com 3 degraus com  $C_{S0}$  de 263,50 g.L<sup>-1</sup> em 16 horas de fermentação o consumo chegou a próximo de zero. Para  $C_{S0}$  de 284,58 g.L<sup>-1</sup>, observou-se o consumo total de substrato em 21 horas de fermentação quando os degraus foram aplicados em 36-32-30-28 °C e 34-32-30-28 °C.

Diante dos resultados apresentados na Tabela 5.4, optou-se por avaliar os perfis de  $C_S$ ,  $C_E$  e  $C_X$  das melhores condições com 2 e 3 degraus e compará-las com a fermentação conduzida à temperatura de 34°C, adotada como controle. Como as simulações de 1 degrau apresentaram tempos de consumo semelhantes as simulações de 2 degraus, optou-se por não utilizar 1 degrau nesta etapa, considerando que mudanças bruscas de temperatura poderiam causar danos à levedura em situações reais, sendo preferidas as menores diferenças de temperatura entre os degraus (2 °C). Esse critério também foi considerado para a escolha das simulações de 2 e 3 degraus validadas.

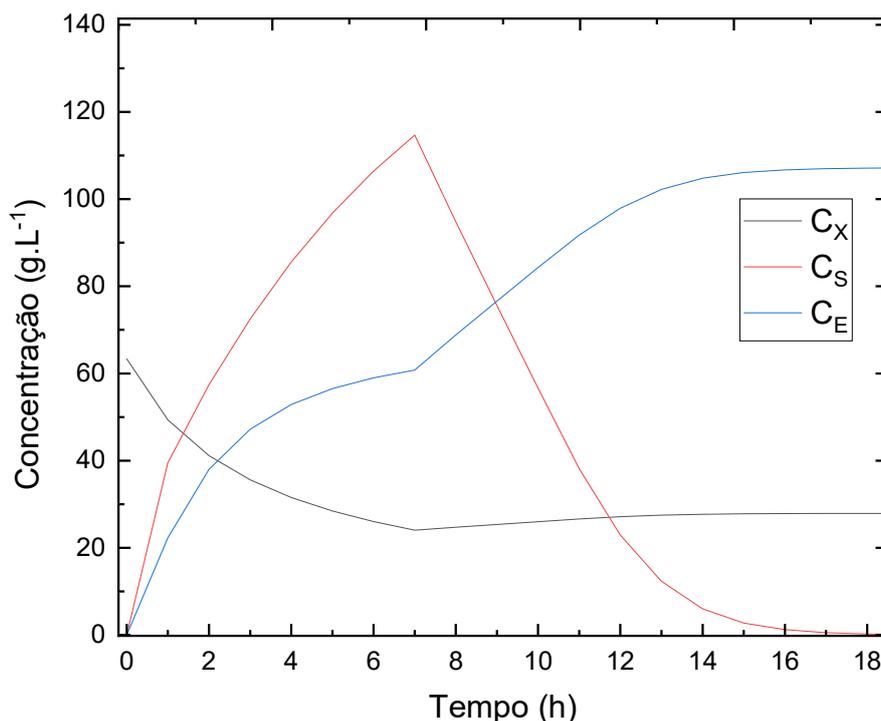
Para dois degraus, foi escolhida a condição de degrau 34-32-30 °C (degraus ilustrados na Figura 5.11-A) para realizar a validação com  $C_{S0}$  263,50 g.L<sup>-1</sup>, por apresentar consumo total do substrato e diferença de temperatura de 2 °C entre os degraus, sendo uma diferença razoável quando comparada as demais fermentações simuladas. A fermentação deu-se início com a temperatura de 34 °C e mantido por 4 horas até a concentração de etanol de 60 g.L<sup>-1</sup>, sendo esse o momento de aplicação do primeiro degrau de temperatura, que passou a ser 32°C e conduzida por 4 horas até que a concentração de etanol no meio fermentativo atingisse 80 g.L<sup>-1</sup>, condição em que foi aplicado o segundo degrau e a temperatura do meio foi reduzida para 30°C e mantida até o consumo total de  $C_S$ , que foi em aproximadamente 16 horas de fermentação.



**Figura 5.11** – Apresentação dos degraus de temperatura em fermentação VHG em batelada alimentada. (A)  $C_{S0} = 263,50 \text{ g.L}^{-1}$  com 2 degraus de temperatura: 1°- 34 °C para 32 °C e 2°- 32 °C para 30 °C. (B)  $C_{S0} = 284,58 \text{ g.L}^{-1}$  com 3 degraus de temperatura: 1°- 34 °C para 32 °C, 2°-32 °C para 30 °C e 3°-30 °C para 28 °C. Fonte: elaborado pela autora (2024).

Para realizar a validação das simulações com  $C_{S0}$  284,58 g.L<sup>-1</sup>, optou-se adotar uso de 3 degraus de temperatura com condição de degrau 34-32-30-28 °C (degraus ilustrados na Figura 5.11-B), por apresentar consumo total do substrato e diferença de temperatura de 2 °C entre os degraus, sendo uma diferença razoável quando comparada as demais fermentações simuladas. A fermentação deu-se início com a temperatura de 34 °C e foi mantida por 2 horas até a concentração de etanol de 40 g.L<sup>-1</sup>, sendo esse o momento de aplicação do primeiro degrau de temperatura, que passou a ser 32°C e conduzida por 2 horas até que a concentração de etanol no meio fermentativo atingisse 60 g.L<sup>-1</sup>. Em seguida, foi aplicado o segundo degrau e a temperatura foi reduzida à 30°C e mantida por 4 horas até a concentração de etanol atingir 80 g.L<sup>-1</sup>, para então ser aplicado o terceiro degrau de temperatura, reduzindo a temperatura para 28 °C e mantendo até o consumo total de  $C_S$ , que foi em aproximadamente em 20 horas de fermentação.

Os gráficos apresentados nas Figuras 5.12 e 5.13, apresentam as simulações realizadas para  $C_{S0}$  263,50 e 284,58 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Conforme ocorre a alteração da temperatura do meio, resultaram em um comportamento característico do perfil simulado para cada concentração de substrato testada.



**Figura 5.12** – Simulação de dois degraus de temperatura em fermentação VHG em batelada alimentada.  $C_{S0} = 263,50 \text{ g.L}^{-1}$  com 2 degraus de temperatura:  $1^\circ - 34^\circ \text{C}$  para  $32^\circ \text{C}$  e  $2^\circ - 32^\circ \text{C}$  para  $30^\circ \text{C}$  ( $C_{Ed} = 60 \text{ g.L}^{-1}; 80 \text{ g.L}^{-1}$ ). Fonte: elaborado pela autora (2024).

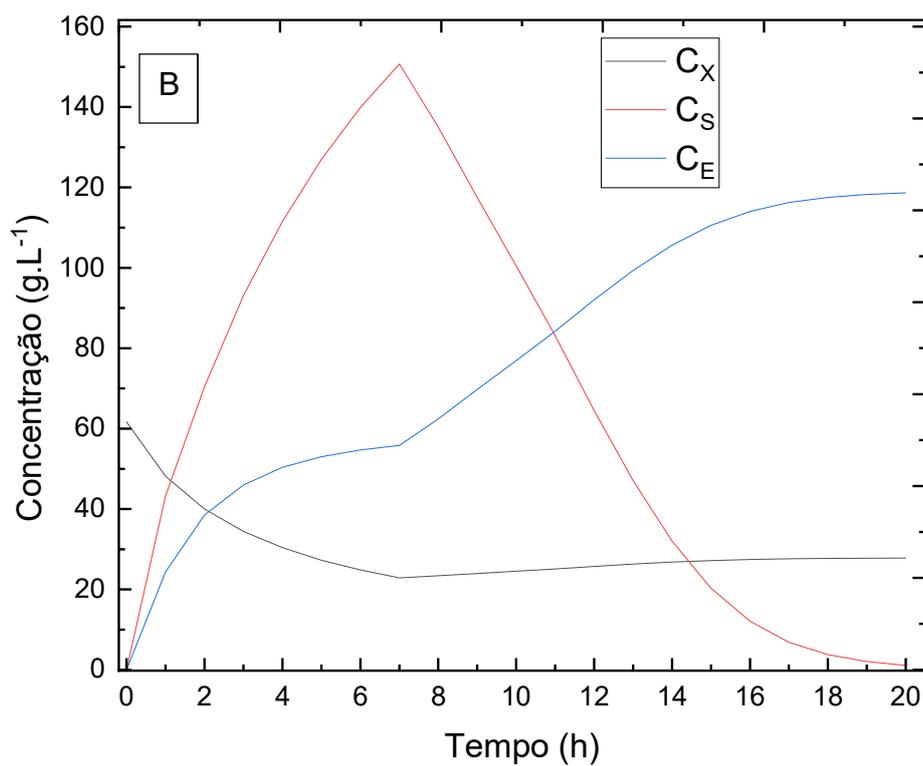
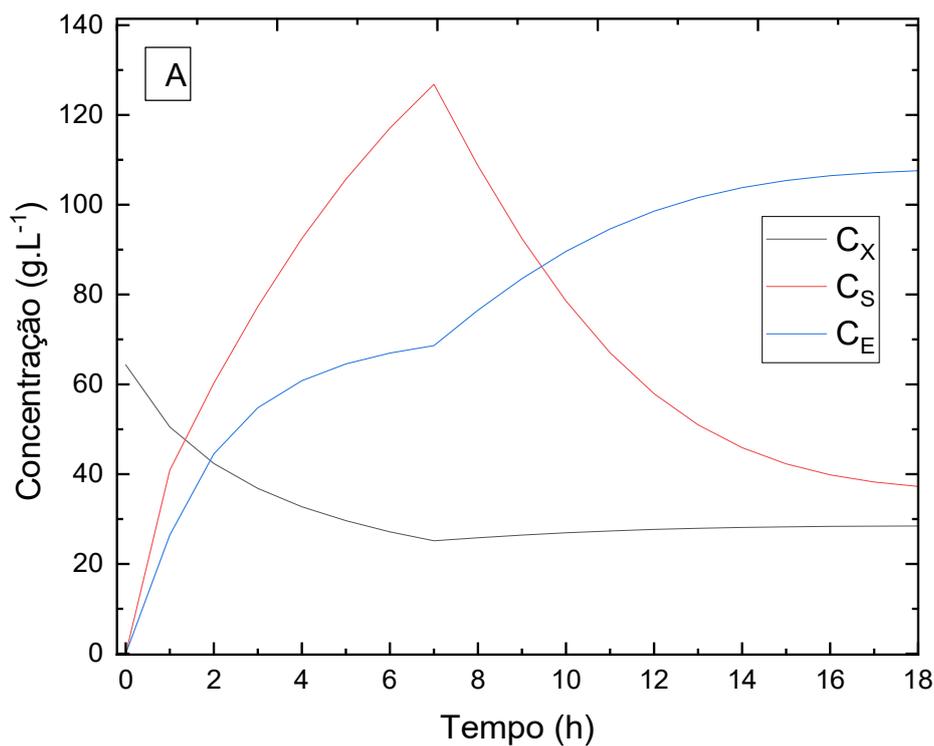
Fazendo uso da redução de temperatura por degraus (Figura 5.12), sendo este a adoção de 2 degraus, onde o primeiro degrau sendo aplicado de  $34^\circ \text{C}$  para  $32^\circ \text{C}$  quando o etanol formado atingiu  $60 \text{ g.L}^{-1}$ , e o segundo degrau a redução de temperatura de  $32^\circ \text{C}$  para  $30^\circ \text{C}$  foi aplicado quando o etanol do meio atingiu  $80 \text{ g.L}^{-1}$ , foi possível observar o consumo total do substrato em aproximadamente 17 horas de fermentação e a formação de  $113,45 \text{ g.L}^{-1}$  de etanol. Quando comparamos com a fermentação conduzida a temperatura constante de  $34^\circ \text{C}$  (Figura 5.4), observamos que não há o consumo total dos açúcares presentes no meio, no qual restou  $17,53 \text{ g.L}^{-1}$  ao final de 16 horas de fermentação e formação de  $105,78 \text{ g.L}^{-1}$  de etanol.

Foi realizada uma simulação controle com  $C_{S0}$  de  $284,58 \text{ g.L}^{-1}$  à temperatura constante de  $34^\circ \text{C}$  (Figura 5.13 - B) a fim de realizar a comparação com as simulações utilizando degrau para mesma concentração de  $C_{S0}$ . Assim como nas simulações com  $C_{S0}$  de  $263,50 \text{ g.L}^{-1}$ , para a escolha do perfil das

condições de aplicação dos degraus foi considerado o tempo de consumo total do substrato, julgando a melhor simulação as que apresentaram menores tempos de consumo. As simulações de 3 degraus apresentaram menores tempos de consumo quando comparados às de 1 e 2 degraus.

Devido a maior concentração de  $C_{S0}$  desta etapa espera-se obter mais etanol no meio, a escolha do momento para aplicação do primeiro degrau foi quando a concentração de etanol atingiu o valor de  $40 \text{ g.L}^{-1}$ , uma vez que no trabalho de fermentação alcoólica de Sonogo (2016) verificou que a inibição da levedura *S. cerevisiae* por etanol passa a ocorrer em valores de concentração de etanol superiores a  $40 \text{ g.L}^{-1}$

As simulações referentes à fermentação VHG realizada com  $C_{S0} = 284,58 \text{ g.L}^{-1}$ , podem ser observadas na Figura 5.13. A Figura 5.13 - A denota que o valor máximo de concentração de substrato ao término da alimentação chegou a aproximadamente  $126,82 \text{ g.L}^{-1}$ , e que o consumo do substrato foi cessado no tempo de 17 horas de fermentação, resultando em  $38,24 \text{ g.L}^{-1}$  de substrato e formação de  $107,15 \text{ g.L}^{-1}$  de etanol.



**Figura 5.13** – Comparativo das simulações das fermentações VHG em batelada alimentada com  $C_{S0} = 284,58 \text{ g.L}^{-1}$ : (A) temperatura constante de  $34 \text{ }^\circ\text{C}$ ; (B) 3 degraus de temperatura: 1º degrau de  $34 \text{ }^\circ\text{C}$  para  $32 \text{ }^\circ\text{C}$ , 2º degrau de  $32 \text{ }^\circ\text{C}$  para  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  e 3º degrau de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  para  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $C_{Ed} = 40 \text{ g.L}^{-1}; 60 \text{ g.L}^{-1}; 80 \text{ g.L}^{-1}$ ). Fonte: elaborado pela autora (2024).

A Figura 5.13 – B mostra os resultados obtidos realizando a aplicação de três degraus de temperatura, sendo o primeiro degrau aplicado de 34 °C para 32 °C quando o etanol formado atingiu 40 g.L<sup>-1</sup>, o segundo degrau a redução de temperatura de 32 °C para 30 °C foi aplicado quando o etanol do meio atingiu 60 g.L<sup>-1</sup> e o terceiro degrau aplicado de 30 °C para 28 °C quando o etanol formado atingiu 80 g.L<sup>-1</sup>. A simulação mostrou que o esgotamento do substrato ocorreu quando a fermentação atingiu cerca de 21 horas de fermentação, resultando na produção de etanol de 122,67 g.L<sup>-1</sup>.

Na Figura 5.13 - A o consumo do substrato foi cessado quando o valor da concentração de etanol atingiu o valor máximo ( $C_{E_{máx}} = 111,96 \text{ g.L}^{-1}$ ) suportado nas fermentações realizadas na temperatura de 34 °C. Conforme houve o aumento na concentração de substrato, também houve consequente aumento nas concentrações de substrato residual ao final do processo fermentativo.

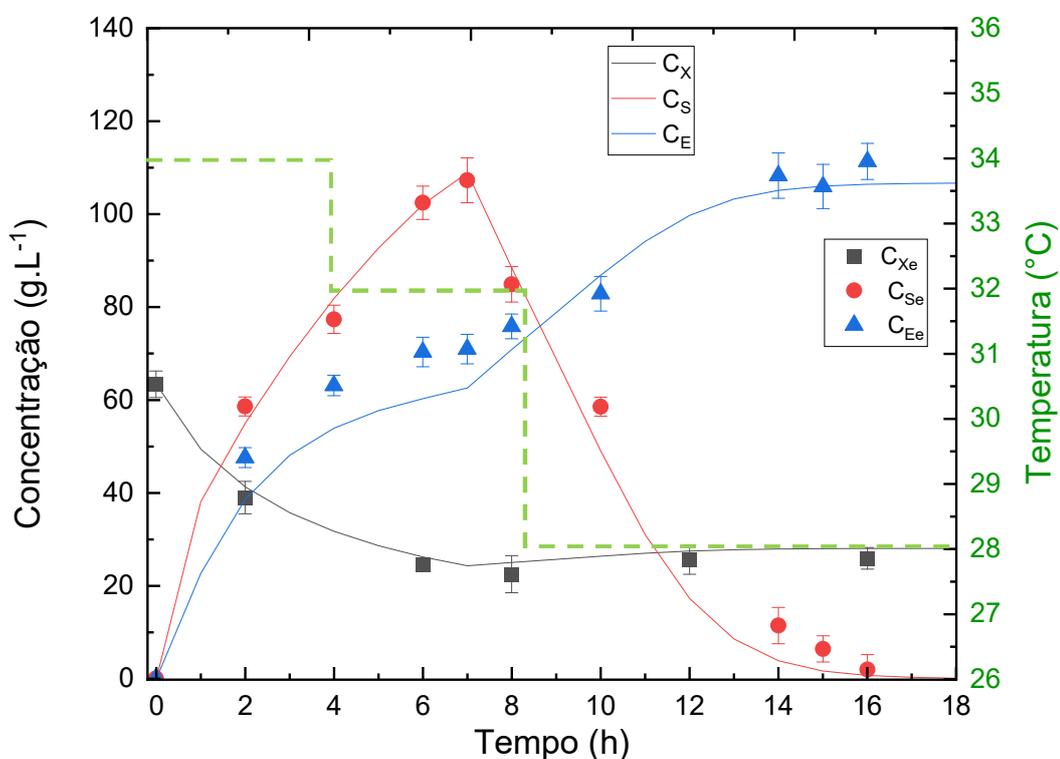
As Figuras 5.12 e 5.13 - B exibem as simulações do comportamento das fermentações ao aplicar os degraus de temperatura. Onde, foi possível obter a previsão do comportamento de consumo de  $C_S$ , formação de  $C_E$  e crescimento de  $C_X$  característico a cada temperatura submetida. Ao realizar a comparação dessas simulações com as conduzidas a temperatura constante fica evidente que, quando a condição de degraus é imposta, a redução da temperatura resultou em um consumo total do substrato, mesmo que em diferentes tempos de fermentação, provocado pela diferença de concentração de  $C_{S0}$ .

#### **5.4 Produção de etanol por fermentação VHG em batelada alimentada com redução da temperatura por degrau: Validação experimental**

Baseado nos critérios mencionados na sessão 5.3, as simulações apresentadas nas figuras 5.12 e 5.13- B foram submetidas a validação experimental. As Figuras 5.12 e 5.13 apresentam as validações das simulações referente as fermentações VHG com  $C_{S0}$  265,12 e 283,62 g.L<sup>-1</sup> respectivamente. As condições de concentração inicial de células  $C_{X0}$  para ambas as fermentações foram mantidas conforme as fermentações a temperatura

constante de  $20 \text{ g.L}^{-1}$ . Quanto as concentrações do meio de cultivo, para  $C_{S0}$   $265,12 \text{ g.L}^{-1}$  foi mantida as mesmas concentrações utilizadas à temperatura constante (Sessão 4.1), mas para a fermentação de  $C_{S0}$   $283,62 \text{ g.L}^{-1}$  as concentrações dos componentes do meio de fermentação foram aumentadas proporcionalmente.

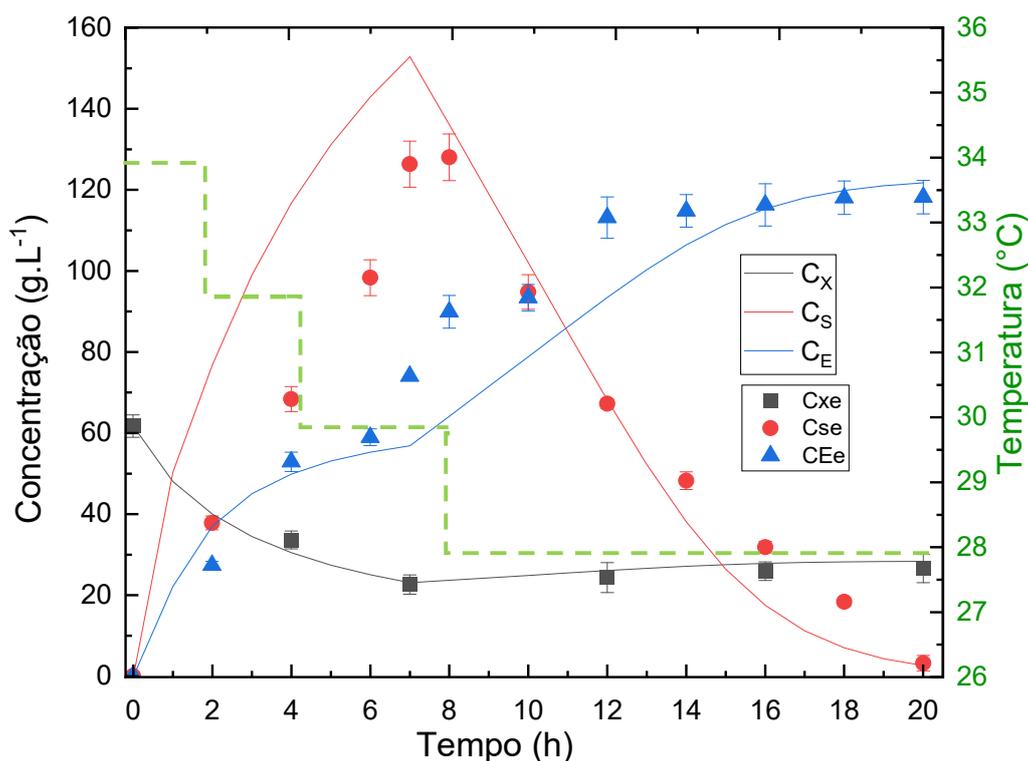
Podemos observar a proximidade das linhas (valores simulados) com os pontos experimentais (Figura 5.14 e Figura 5.15), indicando que o modelo foi adequado para prever a tendência do comportamento das fermentações em VHG com redução de temperatura por degrau.



**Figura 5.14** – Fermentação VHG em batelada alimentada com  $C_{S0} = 265,12 \pm 1,88 \text{ g.L}^{-1}$ , aplicados 2 degraus de temperatura:  $1^\circ - 34 \text{ }^\circ\text{C}$  para  $32 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $2^\circ - 32 \text{ }^\circ\text{C}$  para  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $C_{Ed}$ :  $60 \text{ g.L}^{-1}$ ;  $80 \text{ g.L}^{-1}$ ). Fonte: elaborado pela autora (2024).

Após a validação experimental podemos verificar (Figura 5.14) que a tendência de consumo de substrato e formação de produto experimental foi fiel a previsão simulada, com produtividade volumétrica de etanol de  $6,95 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ .

Tal valor não se mostrou melhor quando comparado com as produtividades obtidas a temperatura constante de 28 °C e 30 °C (Figuras 5.1 e 5.2). Entretanto, quando comparado com as fermentações realizadas a temperatura constante de 32 °C, 34 °C e 36 °C (Figuras 5.3, 5.4 e 5.5), a fermentação aplicando 2 degraus de temperatura revelou-se promissora, uma vez que apresentou uma produtividade volumétrica em etanol superior.



**Figura 5.15** – Fermentação VHG em batelada alimentada com  $C_{S0} = 283,62 \pm 1,64$  g.L<sup>-1</sup>, aplicados 3 degraus de temperatura: 1º- 34 °C para 32 °C, 2º- 32 °C para 30 °C e o 3º- 30°C para 28°C ( $C_{Ed}$ : 40 g.L<sup>-1</sup>; 60 g.L<sup>-1</sup>; 80 g.L<sup>-1</sup>). Fonte: elaborado pela autora (2024).

Observando os dados calculados pelo modelo (linhas) na Figura 5.15, pode-se verificar a variável concentração de substrato ( $C_s$ ) nas primeiras 7 horas de fermentação foi superestimada, apresentando concentração máxima de  $C_s$  ao término da etapa de alimentação de substrato de 145 g.L<sup>-1</sup>. No entanto, é notável que foi possível validar a simulação pois o modelo proposto para a fermentação VHG com redução de temperatura foi capaz de prever adequadamente o comportamento do processo, resultando no tempo de 20

horas o consumo total de substrato e  $118,14 \text{ g.L}^{-1}$  de etanol produzido, com produtividade volumétrica de etanol de  $5,91 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Comparando-a com a fermentação de  $C_{S0} 265,12 \text{ g.L}^{-1}$ , podemos observar que foi possível obter maior concentração de etanol devido a maior concentração de açúcares no substrato alimentado.

Ao realizar as validações da redução de temperatura por degrau na fermentação VHG em batelada alimentada, podemos constatar a importância de realizarmos as avaliações da estratégia de redução de temperatura por simulações, na Tabela 5.4 foram apresentadas 36 simulações com variados perfis de degraus para duas concentrações de  $C_{S0}$ , que sucederam numa melhor estratégia para execução deste trabalho, ocasionando na economia de insumos, instrumentos, equipamentos e tempo de bancada laboratorial para tais fermentações e respectivas análises.

Um ponto importante que merece destaque é em relação à efetividade do modelo proposto. Uma vez que apresentou previsão de como foi a resposta em relação aos perfis de consumo de  $C_S$  e formação de  $C_E$  ao se aplicar os degraus de temperatura das fermentações VHG, sendo aplicável para as duas concentrações de  $C_S$  validadas. Cada condição de fermentação validada neste trabalho apresenta distintos tempos de fermentação devido a concentração de  $C_{S0}$  e condição de degrau escolhida, ou seja, quanto maior o ART maior o tempo de fermentação até o consumo total do substrato ( $C_{Sf}=0$ ).

A partir dos resultados obtidos para os ensaios de validação deste trabalho (Figura 5.14 e 5.15), podemos constatar que os degraus de temperatura aplicados na fermentação VHG em batelada alimentada revelou ser uma alternativa interessante, dado que pôde-se verificar que essa estratégia possibilitou maior consumo de ART em relação a uma fermentação VHG conduzida as temperaturas constantes de  $36$  e  $34 \text{ }^\circ\text{C}$ , além de apresentarem tempos de fermentação menores quando comparados a outros trabalhos da literatura sobre fermentação alcoólica VHG.

Burphan *et al.* (2018) ao estudar produção de etanol por fermentação em meio YPD30 e cepa selvagem de levedura - BY4742 obteve apenas 69,3 e 44,0 g.L<sup>-1</sup> de etanol em fermentações conduzidas à 30 e 40 °C respectivamente em 48 horas de cultivo. O trabalho de Arshad *et al.* (2017), relacionado à produção de etanol em escala comercial usando fermentação VHG com um mutante de *S. cerevisiae* teve como objetivo avaliar a produção de etanol aplicando diferentes taxas de fluxo de ar. O trabalho apresentou como um de seus resultados 8,2 % de etanol em fermentação em batelada alimentada com 32 °Brix com e 0,02 vvm de taxa de fluxo de ar, tendo duração 60 horas. Expressivos tempos de fermentação também foram obtidos por Kłosowski e Mikulski (2018) em fermentações VHG conduzidas em batelada, que duraram 24, 48 e 72 horas até que os açúcares fossem consumidos. Cruz *et al* (2021) obteve produtividade de 4,42 g.L<sup>-1</sup> após 30 horas de fermentação VHG em batelada alimentada.

**Tabela 5.5** – Variáveis ao longo da fermentação VHG em batelada alimentada com redução de temperatura por degraus

Variáveis	Unidade	Fermentações	
C <sub>S0</sub>	g.L <sup>-1</sup>	265,12 ± 1,88	283,62 ± 1,64
C <sub>S</sub> no final da fase de enchimento	g.L <sup>-1</sup>	107,25 ± 4,82	126,30 ± 5,68
C <sub>E</sub> no 1° degrau de temperatura	g.L <sup>-1</sup>	63,67 ± 2,21	27,32 ± 0,96
C <sub>E</sub> no 2° degrau de temperatura	g.L <sup>-1</sup>	75,80 ± 2,65	52,85 ± 2,38
C <sub>E</sub> no 3° degrau de temperatura	g.L <sup>-1</sup>	–	89,84 ± 4,04
C <sub>E</sub> total no processo	g.L <sup>-1</sup>	111,32 ± 3,89	118,14 ± 4,13
Produtividade volumétrica em etanol	g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>	6,95	5,91
Concentração total de etanol	°GL	14,11	14,97

Fonte: A autora (2024).

Ao final da fase de enchimento de 7 horas a concentração máxima de C<sub>S</sub> foi de 107,25 e 126,30 g.L<sup>-1</sup> para as fermentações com C<sub>S0</sub>= 265,12 e 283,62 g.L<sup>-1</sup> respectivamente, demonstrando a efetividade ao se empregar batelada alimentada em não expor as células de levedura a altíssima concentração de C<sub>S</sub>, evitando a ocorrência de inibição da mesma (CARVALHO *et al.*, 2001; LIMA, 2004; TONSO *et al.*, 2021). Essas informações podem ser observadas na Tabela

5.5, em que também contém valores experimentais das concentrações de  $C_E$  em momentos de aplicação dos degraus e ao término do processo.

Realizar o processo fermentativo a uma temperatura inicial em torno de 34 °C e realizar a redução gradual da temperatura por meio de degraus ao longo do processo, mostrou-se vantajoso não só em relação à condução do processo em temperaturas constantes, mas também no que diz respeito a uma possível redução no consumo de água para resfriamento da dorna de fermentação. Visto que é um ponto de grande preocupação do setor sucroenergético por se tratar de um recurso natural vital de oferta limitada, a utilização da água no processo de resfriamento das dornas varia entre 3.500 – 5.000 Kg de água por tonelada de cana em uma usina, dependendo de fatores como temperatura que se deseja atingir na fermentação, temperatura da água de entrada do sistema de refrigeração, coeficiente de troca térmica do trocador de calor e temperatura ambiente (ANA, 2009; SILVA *et al.* 2011).

Assim, uma fermentação conduzida a temperatura constante de 28 °C gastaria muito mais água de resfriamento que uma fermentação que começou a 34°C e teve a temperatura reduzida para 28 °C, embora no fim do processo ambas produziram a mesma quantidade de etanol. Este, certamente é um fator crucial para viabilizar fermentações VHG. Este resultado pode ser relacionado aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Organização das Nações Unidas (ONU), em que o objetivo 15°, Vida terrestre, valoriza dentre outros o uso sustentável de água, além de também estar relacionado ao 12° Objetivo que se trata de Consumo e produção responsáveis (ONU, 2024).

Com o uso do processo fermentativo VHG em batelada alimentada com redução da temperatura por degrau foi possível realizar simulação e respectiva validação experimental do processo empregando um valor de substrato de até 283,62 g.L<sup>-1</sup>, o qual foi totalmente consumido e que permitiu o alcance de 11,69 % e 23,31% a mais de etanol em relação as fermentações com ~263,50 g.L<sup>-1</sup> à temperatura constante de 34 °C e 36 °C respectivamente. Ainda, para a fermentação VHG em batelada alimentada com  $C_{S0}$  283,62 g.L<sup>-1</sup> aplicando a

redução de temperatura por degraus, foi possível verificar o valor de 56,93% de viabilidade ao término da fermentação no tempo de 20 horas. No trabalho de Sonogo *et al.* (2016) utilizando a mesma levedura deste trabalho, obteve viabilidade média de 59% em fermentações extrativas com concentrações de substrato entre 200 e 240 g.L<sup>-1</sup>, no entanto o meio fermentativo continha menos etanol por se tratar de fermentações que realizavam a extração de etanol por arraste gasoso (*stripping*). Tais valores de viabilidade são justificados pelo fato de que as concentrações de etanol elevadas (<80 g.L<sup>-1</sup>) apresentam efeito negativo às células de levedura (SONEGO *et al.* 2016).

Os estudos relacionados a produção de etanol são de grande importância, por se tratar de um produto de baixo valor agregado (Silva *et al.* 2020), a tecnologia de fermentação VHG se mostra como uma alternativa promissora pois tem como principal objetivo o aumento do teor alcoólico do vinho fermentado (D'AMORE *et al.*, 1987; PHISALAPHONG *et al.*, 2006). Que por sua vez, corresponde a uma economia de energia na fase de destilação (Sonogo *et al.* 2018), além de também ocasionar a redução de volume de vinhaça devido ao maior teor alcoólico do vinho (Veloso *et al.* 2019).

Ainda, é importante destacar que os resultados obtidos neste trabalho indicam o potencial de utilização dos degraus de temperatura nas fermentações VHG em batelada alimentada. A possibilidade de aplicação desses resultados em fermentações em larga escala ainda é precipitada. Pois ainda existem fatores a serem avaliados em escala laboratorial, como a influência da suplementação e oxigenação do meio, análise de outras cepas de leveduras, além de testar outros valores de concentrações de C<sub>S0</sub> na fermentação VHG em batelada alimentada com redução de temperatura por degraus.

## 6. CONCLUSÕES

Os experimentos realizados neste trabalho foram de grande importância para a consolidação dos elementos teóricos relacionados ao efeito da temperatura na fermentação alcoólica, principalmente relacionados a fermentação VHG. Foi possível obter dados característicos referentes às fermentações VHG com concentração de açúcares redutores de  $\sim 263,50 \text{ g.L}^{-1}$  em modo batelada alimentada conduzidas à temperaturas de  $28^\circ\text{C}$ ,  $30^\circ\text{C}$ ,  $32^\circ\text{C}$ ,  $34^\circ\text{C}$ , e  $36^\circ\text{C}$ , que acarretaram no êxito da estimativa dos parâmetros cinéticos do modelo adotado. Ainda, por meio de simulações computacionais utilizando os parâmetros  $\mu_{\text{max}}$ ,  $K_s$ ,  $n$ , e  $C_{\text{Emax}}$  escritos em função da temperatura foi possível aplicar estratégias de redução por degraus de temperatura durante o processo fermentativo em VHG. Foi possível escolher dois ( $34\text{-}32\text{-}30^\circ\text{C}$ ) e três ( $34\text{-}32\text{-}30\text{-}28^\circ\text{C}$ ) degraus de temperatura como melhores condições definidas na etapa de simulações do processo. Para finalizar, foram realizadas as validações experimentais para as concentrações de  $C_{s0}$  de 265,12 e  $283,62 \text{ g.L}^{-1}$  respectivamente, resultando em um aumento de 11,69 % e 23,31% a mais de etanol em relação as fermentações com  $\sim 263,50 \text{ g.L}^{-1}$  à temperatura constante de  $34^\circ\text{C}$  e  $36^\circ\text{C}$ .

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, L. F. **Análise das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* expostas ao estresse por etanol**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu. - Botucatu, 2017.

ALVES, J. G. L. F. **Estudo da influência da temperatura na cinética de crescimento anaeróbico de *Saccharomyces cerevisiae*** 1996. 69 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; ALVES, D.G. **Processos de produção de álcool – controle e monitoramento**. Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP, 1996, 93p.

AMORIM, Henrique V *et al.* **Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. Applied microbiology and biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1267–1275, 2011.

ANP - GÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (Brasil). **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis: 2022** / Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. - Rio de Janeiro: ANP, 2006.

ANTONINI, S. R. C. **Microbiologia da fermentação alcoólica: A importância do monitoramento microbiológico em destilarias**. Coleção UAB-UFSCar: Tecnologia das fermentações. São Carlos, EdUFSCAR, 2012.

ARSHAD, M.; HUSSAIN, T; IQBAL, M. ABBAS, M. **Enhanced ethanol production at commercial scale from molasses using high gravity technology by mutant *S. cerevisiae***. Brazilian Journal of Microbiology, v. 48, p. 403-409, 2017.

BADINO JR. A. C.; TONSO, A.; SCHIMIDELL, W. **Análise de biorreatores**. In: Schmidell, Willibaldo Coleção Biotecnologia Industrial, Volume 2 - Engenharia bioquímica / organização de Willibaldo Schmidell. – 2. ed. – São Paulo: Blucher, 2021.

BADINO JUNIOR, A. C.; CRUZ, AJG. **Reatores químicos e bioquímicos**. Coleção UAB-UFSCar, São Carlos, 2012.

BAI, F.W.; ANDERSON, W.A.; MOO-YOUNG, M. **Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks**. Biotechnology Advances, v. 26, n. 1, p. 89–105, 2008.

BASSO, C. L.; BASSO, T. P; BASSO, T. O. **Aspectos fisiológicos e bioquímicos da fermentação etanólica nas destilarias brasileiras**. In: Schmidell, Willibaldo Coleção Biotecnologia Industrial, Volume 1 – Fundamentos / organização de Flávio Alterthum. – 2. ed. – São Paulo: Blucher, 2021.

BASSO, L. C; BASSO, T. O; ROCHA, S. N. **Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation**. Biofuel production - Recent Developments and Prospects, v. 530, p. 85–100, 2011.

BASTOS, R. G. **Tecnologia das Fermentações**: Fundamentos de Bioprocessos. São Carlos: EdUFSCar, 2010, 162 p.

BNDES. **Bioetanol de cana-de-açúcar**: energia para o desenvolvimento sustentável. 1ª Edição. Organização BNDES e CGEE. – Rio de Janeiro: BNDES, 2008.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. **Biocombustíveis**: CNPE passa a ter competência para fixar teor de etanol anidro na gasolina. [S./,]: Ministério de Minas e Energia, 14 jan. 2022. Atualizado em 18 jan. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/mme/pt-br/assuntos/noticias/cnpe-passa-a-ter-competencia-para-fixar-teor-de-etanol-anidro-na-gasolina#:~:text=O%20etanol%20anidro%20%C3%A9%20misturado,%25%20e%2027%2C5%25>. Acesso em: 27 abr. 2023.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. **Fermentação Descontínua Alimentada**. In: Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgar Blücher, v. 2 p. 205-222, 2001.

CERQUEIRA, D. P. **Fermentação alcoólica de mosto com alta concentração de açúcar**. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. ESALQ/USP - Piracicaba, 2013. 66 p: il.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acomp. safra brasileira de cana-de-açúcar**, Brasília, v11 – Safra 2023/24, n. 1 - Primeiro levantamento, p. 1-55, abril 2023.

CONAB. **País confirma recorde na produção de etanol**: 35,6 bilhões de litros na safra 2019/20. Conab, 2020. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/3342-pais-confirma-recorde-historico-na-producao-de-etanol-35-6-bilhoes-de-litros-na-safra-2019-20> >. Acesso em: 11 de novembro de 2021.

CORTEZ, L; MAGALHÃES, P; HAPPI, J. **Principais subprodutos da agroindústria canavieira e sua valorização**. Revista Brasileira de Energia, v. 2, n. 2, p. 111, 1992.

COSTA, G.H.G.; MUTTON, M.J.R.; MISSIMA, J.O.D.; SILVANO, N.; SANTOS, R.F.P. **Qualidade tecnológica do melaço produzido com cana-de-açúcar**

**bisada**. V Semana tecnológica – Biocombustível - FCAV/UNESP, 4p., Jaboticabal, SP, Brasil, 2012.

Cruz, M. L. **Avaliação de condições operacionais na fermentação alcoólica VHG empregando diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*** [recurso eletrônico]. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia, 2019.

CRUZ, M. L.; RESENDE, M. M.; RIBEIRO, E. J. **Improvement of ethanol production in fed-batch fermentation using a mixture of sugarcane juice and molasse under very high-gravity conditions**. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 44, p. 617-625, 2021.

CRUZ, M. L. **Avaliação das condições de processo na resistência da levedura ao teor final de etanol na fermentação alcoólica**. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia, 2015. 86 f.:il.

D'AMORE, T.; STEWART, G. G. **Ethanol tolerance of yeast**. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 9, n. 6, p. 322–330, 1987.

EZEJI, T C; QURESHI, N; BLASCHEK, H P. **Production of acetone, butanol and ethanol**. by *Clostridium beijerinckii* BA101 and in situ recovery by gas stripping. p. 595–603, 2003.

GASPARINI, N. R. **Estudo da fermentação alcoólica por leveduras mutantes deficientes respiratórias de *Saccharomyces cerevisiae* IZ-270 e *Saccharomyces uvarum* IZ-1904**. 1986. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

GODOY, A.; AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; OLIVEIRA, A. J. I. **Continuous and batch fermentation processes**: Advantages and disadvantages of these processes in the Brazilian ethanol production. *International sugar journal*, v. 110, p. 175–181, 2008.

GOMES, B. C. **Análise térmica da fermentação alcoólica convencional e extrativa com arraste por dióxido de carbono**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, 2020.

HISS, H. **Cinética de processos fermentativos**. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Coord.). *Biotecnologia Industrial: Engenharia bioquímica*, v.2, cap. 6, São Paulo, SP, Editora Edgard Blucher, 2001.

HORII, J.; BLUMER, S. A. G.; RIBEIRO, C. A. F. **Fundamentos de tecnologia sucroalcooleira**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. São Paulo, 1999.

- Jones, R. P. Biological principles for the effects of ethanol. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 11, n. 3, p. 130-153, 1989.
- KANAKARAJU, Y. *et al.* **Evaluation of ethanol fermentation efficiency of sweet sorghum syrups produced by integrated dual membrane system.** *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 43, n. 7, p. 1185–1194, 2020.
- KECHKAR, M. *et al.* **Isolation and identification of yeast strains from sugarcane molasses, dates and figs for ethanol production under conditions simulating algal hydrolysate.** *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 36, n. 01, p. 5, 2019.
- KŁOSOWSKI, G.; MIKULSKI, D. **Complementarity of the raw material composition of Very High Gravity (VHG) mashes as a method to improve efficiency of the alcoholic fermentation process.** *Process biochemistry*, v. 74, p. 1-9, 2018.
- Laluce, C., Tognolli, J. O., De Oliveira, K. F., *et al.* **Optimization of temperature, sugar concentration, and inoculum size to maximize ethanol production without significant decrease in yeast cell viability.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 83, p. 627-637, 2009.
- LANDRY, C. R.; TOWNSEND, J. P.; HARTL, D. L.; CAVALIERI, D. **Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Mol. Ecol.* v. 15, p. 575-591, 2006.
- LAOPAIBOON, L. *et al.* **Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology: Effects of carbon and nitrogen supplementations.** *Bioresource Technology*, v. 100, n. 18, p. 4176–4182, 2009.
- LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. **Rapid determination of east viability.** *Biotechnology Bioengineering Symposium*, v. 11, p. 641–649, 1981.
- LIMA, L. R.; MARCONDES, A A. **Álcool Carburante – uma estratégia brasileira.** Editora UFPR. Curitiba – Paraná. Brasil, 2002.
- LIMA, U. A.; BASSO, L.C.; AMORIM, H. V. **Produção de etanol.** In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Coord.). *Biotechnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*, v.3, cap. 6, São Paulo, SP, Editora Edgard Blucher, 2001.
- LIMA, W. J. N. **Produção de proteínas recombinantes utilizando *Escherichia coli* em cultivos em alta densidade celular.** Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, 2004.
- LUZ, P.H.C. (2005). **Novas tecnologias no uso da vinhaça e alguns aspectos legais.** In: SIMPÓSIO DE TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO DE CANA-DEAÇÚCAR, 2., 2005, Piracicaba. Anais... [S.l.:s.n] p.311-338.

MAIORELLA, B.; BLANCH, H. W.; WILKE, C R. **By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae***. *Biotechnology and bioengineering*, v. 25, n. 1, p. 103–121, 1983.

MILANEZ, A. Y.; FILHO, P. S. C. F.; ROSA, S. E. S. **Energia: Perspectivas para o Etanol Brasileiro**. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n. 27, p. 21-38, mar. 2008.

MIRANDA, R. A. de. **Custo de produção e viabilidade econômica de etanol a partir do sorgo sacarino plantado na entressafra da cana-de-açúcar**. In: MAY, A.; DURÃES, F. O. M.; PEREIRA FILHO, I. A.; SCHAFFERT, R. E.; PARRELLA, R. A. da C. (Ed.). *Sistema Embrapa de produção agroindustrial de sorgo sacarino para bioetanol: Sistema BRS1G-Tecnologia Qualidade Embrapa*. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2012. p. 106-112.

MOHANA, S.; ACHARYA, B. K.; MADAMWAR, D. **Distillery spent wash: treatment technologies and potential applications**. *Journal of hazardous materials*, v. 163, n. 1, p. 12–25, 2009.

MONTEIRO, B. M. D. S. **Produção de etanol combustível: efeito da suplementação nitrogenada na fermentação de mosto de caldo de cana com alta concentração de açúcar**. Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Piracicaba, 2016.

MORANDIN, M. *et al.* **Synthesis and parameter optimization of a combined sugar and ethanol production process integrated with a CHP system**. *Energy*, v. 36, n. 6, p. 3675–3690, 2011.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; GUIMARÃES, P. M. R.; *et al.* **Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production**. *Biotechnology Advances*, 28:817–830. 2010.

NELSON, DAVID L. **Princípios de bioquímica de Lehninger** [recurso eletrônico] / David L. Nelson, Michael M. Cox ; [tradução: Ana Beatriz Gorini da Veiga ... *et al.*] ; revisão técnica: Carlos Termignoni ... [*et al.*]. – 6. ed. – Dados eletrônicos. – Porto Alegre: Artmed, 2014.

NUANPENG, Sunan *et al.* **Biotechnology and Industrial Microbiology Ethanol production from sweet sorghum by *Saccharomyces cerevisiae* DBKKUY-53 immobilized on alginate-loofah matrices**. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 49, p. 140–150, 2018.

ONU – Organização das Nações Unidas. Brasil. **Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) no Brasil**. Disponível em: <<https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>>. Acesso em: 08 de abril de 2024.

PACHECO, T. F. **Produção de Etanol: Primeira ou Segunda Geração?**. Circular Técnica 04. Embrapa. Brasília, DF Abril, 2011.

PHISALAPHONG, M.; SRIRATTANA, N.; TANTHAPANICHAKOON, W. **Mathematical modeling to investigate temperature effect on kinetic parameters of ethanol fermentation.** Biochemical Engineering Journal, v. 28, n. 1, p. 36–43, 2006.

QI, B., LUO, J., & WAN, Y. **Chemical Conversion of Molasses for Production of Levulinic Acid and Hydroxymethylfurfural.** Research and Advances: Environmental Sciences, 1, 22-26. (2018).

RIVERA, E. C.; COSTA, A. C.; ATALA, D. I. P. *et al.* **Evaluation of optimization techniques for parameter estimation: Application to ethanol fermentation considering the effect of temperature.** Process Biochemistry, v. 41, n. 7, p. 1682-1687, 2006.

RIVERA, E. C.; COSTA, A. C.; ANDRADE R. R. *et al.* **Development of adaptive modeling techniques to describe the temperature-dependent kinetics of biotechnological processes.** Biochemical Engineering Journal 36 (2007) 157–166.

RODRIGUES, J. A. S.; MAGALHÃES, P. C.; SOUZA, T. C. **Cultivo do Sorgo: Ecofisiologia.** Embrapa Milho e Sorgo – Sistema de produção. 8ª edição. 2012.

RODRIGUES, K. C. S. **Fermentação extrativa extrativa com remoção de etanol por extração com CO<sub>2</sub> e recuperação por exaustão.** 2019. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química – PPGEQ, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/11128>.

SANTOS, F. C. Métodos de Monitoramento de Fermentação Alcoólica. Trabalho de Graduação, DEQ/UFSCar. São Carlos, 2022.

SÃO PAULO. Secretaria de Meio Ambiente. **Etanol e Biodiesel.** Cadernos de Educação Ambiental. 2 Ed. São Paulo, 2014.

SASAKI, Kengo *et al.* **Bioresource Technology Increased ethanol production from sweet sorghum juice concentrated by a membrane separation process.** Bioresource Technology, v. 169, p. 821–825, 2014.

SAYED, Walaa *et al.* **Enhancement of ethanol production from synthetic medium model of hydrolysate of macroalgae.** Renewable. Energy, 2017.

SCHMIDELL, W. **Engenharia bioquímica** / organização de Willibaldo Schmidell. – 2. ed. – São Paulo: Blucher, 2021.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. **Biorreatores e processos fermentativos.** In: Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgar Blücher, v.2 p. 179-192, 2001.

- SILVA, F. C.; CESAR, M.A.A; MORAES, J; VILELA, M.; MENDES, C. **Diagnóstico hídrico em destilarias de álcool em São Paulo**. Bioenergia em Revista: Diálogos (ISSN: 2236-9171), v. 1, n. 1, p. 93-117, 2011.
- SILVA, G. A. **Avaliação das tecnologias de disposição de vinhaça de cana de açúcar quanto ao aspecto de desenvolvimento ambiental e econômico**. Tese- Programa de Pós-graduação em Eng. Mercânica e Area de Concentração em Rermica e Fluidos. Universidade de São Paulo, 2012.
- SONEGO, J.L.S.; LEMOS, D.A.; PINTO, .E.M; CRUZ, A.J.G.; BADINO, A.C. **Extractive fed-batch ethanol fermentation with CO<sub>2</sub> stripping in a bubble column bioreactor: experiment and modeling**, Energy Fuels 30 (2016) 748–757.
- SONEGO, Jorge L S *et al.* **Extractive Batch Fermentation with CO<sub>2</sub> Stripping for Ethanol Production in a Bubble Column Bioreactor: Experimental and Modeling**. Energy & Fuels, v. 28, n. 12, p. 7552–7559, 2014.
- SONEGO, Jorge L S *et al.* **Extractive Fed-Batch Ethanol Fermentation with CO<sub>2</sub> Stripping in a Bubble Column Bioreactor: Experiment and Modeling**. Energy & Fuels, v. 30, n. 1, p. 748–757, 2016.
- TAYLOR, F *et al.* **Continuous fermentation and stripping of ethanol**. Biotechnology progress, v. 11, n. 6, p. 693–698, 1995.
- TECLU, D.; TIVCHEV, G.; LAING, M.; WALLIS, M. **Determination of the elemental composition of molasses and its suitability as carbon source for growth of sulfate-reducing bacteria**. Journal of Hazardous Materials. v. 161, p. 1157 – 1165, 2009.
- THATIPAMALA, R.; ROHANI, S.; HILL, G. A. **Effects of high product and substrate inhibitions on the kinetics and biomass and product yields during ethanol batch fermentation**. Biotechnology and Bioengineering, v. 40, n. 2, p. 289–297, 20 jun. 1992.
- TONSO, A.; BADINO JR, A. C.; SCHIMIDELL, W. Tipos de biorreatores e formas de operação. In: Schmidell, Willibaldo **Coleção Biotecnologia Industrial, Volume 2 - Engenharia bioquímica** / organização de Willibaldo Schmidell. – 2. ed. – São Paulo: Blucher, 2021.
- TOSETTO, G M. **Influência da matéria-prima no comportamento cinético de levedura na produção de etanol**. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas –UNICAMP, 2002.
- UNICA - União da Agroindústria Canavieira de São Paulo. **Produção e uso do etanol combustível no Brasil: respostas às questões mais freqüentes**. São Paulo: UNICA, 2007. p. 68.

VELOSO, I. I. K.; RODRIGUES, K. C. S.; SONEGO, J. L. S. I. *et al.* **Fed-batch ethanol fermentation at low temperature as a way to obtain highly concentrated alcoholic wines: Modeling and optimization.** *Biochemical Engineering Journal* 141 (2019) 60–70.

VIDAL, M. F. **Agroindústria – Etanol. Caderno Setorial.**– Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste – ETENE. Caderno Setorial ETENE Ano 7 |Nº 237, setembro 2022.

VIDAL, M. F. **Agroindústria – Etanol. Caderno Setorial** – Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste – ETENE. Caderno Setorial ETENE Ano 9 |Nº 237, janeiro 2024.

VIDAL, M. F. **Produção e Uso de Biocombustíveis no Brasil.**– Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste – ETENE. Caderno Setorial ETENE Ano 6 |Nº 184, agosto 2021.

WHEALS, A. E. *et al.* **Fuel ethanol after 25 years.** *Trends in Biotechnology*, v. 17, n. 12, p. 482–487, 1999.

YAMAKAWA, C. K.; ATALA, D. I. P.; AMBROSIO, W. B.; NOLASCO JUNIOR, J.; ROSSELL, C. E. V. *et al.* **Assessment of VHG (very high gravity) ethanol fermentation in continuous multistage with cell recovery, reactivation and recycling using a blend of juice and molasses from sugarcane as raw material.** *Sugar Industry*, v. 142, n. 4, p. 212-6, 2017.