

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**AVALIAÇÃO DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA EXTRATIVA EM
DIFERENTES TEMPERATURAS COM REMOÇÃO DE ETANOL POR
ARRASTE COM CO₂**

Ivan Ilich Kerbauy Veloso

Orientador: Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior

Coorientador: Prof. Dr. Antonio José Gonçalves da Cruz

São Carlos – SP

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Ivan Ilich Kerbauy Veloso

**AVALIAÇÃO DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA EXTRATIVA EM
DIFERENTES TEMPERATURAS COM REMOÇÃO DE ETANOL POR
ARRASTE COM CO₂**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientador: Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior
Coorientador: Prof. Dr. Antonio José Gonçalves da Cruz

São Carlos – SP
2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Ivan Ilich Kerbauy Veloso, realizada em 23/02/2023.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior (UFSCar)

Prof. Dr. Thiago Olitta Basso (USP)

Profa. Dra. Miriam Maria de Resende (UFU)

Prof. Dr. Felipe Fernando Furlan (UFSCar)

Prof. Dr. Antonio Jose Gonçalves da Cruz (UFSCar)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado a todos aqueles que se empenham em melhorar-se, esforçar-se, instruir-se, contribuindo assim para o desenvolvimento individual e coletivo.

AGRADECIMENTOS

Ao longo dos últimos anos foram despendidos muito esforço, empenho e dedicação para o êxito do presente trabalho. Com sorte, tive a oportunidade de contar com excelentes pessoas ao meu lado, que tornaram tudo mais fácil. Como em qualquer outro momento da vida, a alegria, o bom ânimo, a amizade sincera e a disposição em ajudar uns aos outros sem esperar nada em troca são indispensáveis para manter uma boa relação entre os seres humanos. Foi dessa forma que todas as pessoas citadas a seguir contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Quaisquer palavras para agradecer aos professores Alberto Badino e Antonio Cruz serão poucas diante de tantos conhecimentos e oportunidades que ambos me proporcionaram. Aos queridos orientadores, meus eternos agradecimentos que se estendem à professora Rosineide Cruz por amadrinhar essa relação profissional.

Naqueles momentos em que a pesquisa parece não dar certo, tive a satisfação de contar com a ajuda de um grande amigo: Kaio Rodrigues, a personificação da tranquilidade. Com tamanha sabedoria e experiência, foram estabelecidas parcerias que se estendem além do campo profissional. Outra personalidade que contribuiu de maneira ímpar, traz a esperança não só no nome: Mateus Esperança. Discutindo, incentivando e propondo ideias novas, sempre regadas a doses extras de café. Da mesma forma, foi indispensável a amizade do Gustavo, que muito contribuiu com seus conhecimentos e com momentos hilários nas viagens em congressos e eventos. De maneira direta ou indireta, num simples gesto de amizade, ao fazer um café, ao trocarmos experiências, enfim, todos a seguir são importantes para mim: Ana, Brenda, Camila Velloso, Eric, Emanuela, Letícia, Marina, Mariane, Mayara, Rauber, Ricardo e Taise. Meus sinceros agradecimentos!

A tranquilidade no ambiente familiar, o encorajamento, incentivo e apoio de todos os entes queridos a seguir foram imprescindíveis para a conclusão desse ciclo: Alan, Dimitri, Elaine (mãe), Fernando, Heloisa, Sandra e Winnie. Em especial ao querido amigo e pai, Nenê, meu eterno agradecimento pelos conselhos, orientações e oportunidades. À Camila, querida amiga e parceira, meus agradecimentos pela cumplicidade, entendimento, conselhos, paciência e perseverança nesses longos anos de união.

No cunho profissional, ficam os agradecimentos aos técnicos do Departamento de Engenharia Química da UFSCar: Amadeus, Natália, Taís, Aline e Eudoro. Por fim, agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq – processo nº 141300/2019-1) e à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES – código financeiro 001) pelos suportes financeiros desta pesquisa.

“Quando se é instruído, compreende-se que a natureza, tendo gravado a sua imagem e a do seu autor em todas as coisas, estas têm quase a sua dupla infinidade. (...) é assim que vemos que todas as ciências são infinitas na extensão das suas pesquisas; Elas são também infinitas na multidão e delicadeza dos seus princípios...”

(Blaise Pascal)

RESUMO

VELOSO, I. I. K. **Avaliação da fermentação alcoólica extrativa em diferentes temperaturas com remoção de etanol por arraste com CO₂**. 2023. 155 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2023.

Reduzindo-se a temperatura de fermentação, reduz-se também o efeito inibitório do etanol, obtendo-se vinhos com maiores teores alcoólicos, porém, com a diminuição significativa da produtividade em etanol, devido ao efeito negativo da temperatura sobre a cinética da fermentação. Outra alternativa para contornar a inibição pelo produto é remover parte do etanol do caldo à medida que o mesmo é produzido, utilizando CO₂ como gás de arraste (CO₂ *stripping*), o que aumenta a produtividade em etanol e permite a alimentação de mostos mais concentrados em açúcar. Unindo-se as duas estratégias de processo, o presente trabalho avaliou a fermentação alcoólica extrativa em batelada alimentada, com remoção de etanol por arraste gasoso com CO₂ nas temperaturas de 28, 30, 32 e 34 °C. Inicialmente, foi realizado um estudo sobre a influência da temperatura no monitoramento da fermentação alcoólica utilizando espectroscopia de infravermelho médio (FT-MIR). Na sequência, foi aplicado o balanço de massa na fermentação alcoólica em batelada alimentada com alta densidade celular (HCD, do inglês *high cell density*) considerando o volume de células (modelagem intrínseca). Utilizando um modelo cinético misto de crescimento celular, que considera as inibições por substrato, produto e células, foram avaliados os efeitos de diferentes concentrações celulares na cinética da fermentação alcoólica em diferentes temperaturas e com elevada concentração de substrato no mosto (VHG, do inglês *very high gravity*). Posteriormente, realizou-se a análise térmica da fermentação extrativa em diferentes temperaturas, obtendo através de simulações a vazão de CO₂ que resultou na economia de água utilizada no controle de temperatura. Por fim, a fermentação extrativa em diferentes temperaturas foi otimizada em termos de produtividade em etanol. O monitoramento da fermentação alcoólica por FT-MIR apresentou excelente desempenho, uma vez que minimizou a interferência da temperatura nas bandas espectrais ao serem utilizados modelos de calibração com espectros adquiridos em diferentes temperaturas. A técnica FT-MIR foi imprescindível para tomadas de decisão nas fermentações extrativas, como o momento exato do início do *stripping* e no cálculo de produtividade em etanol. A modelagem intrínseca desenvolvida melhorou a previsão da concentração de substrato, principalmente sob condições VHG. Fermentações sob diferentes concentrações celulares foram modeladas e o parâmetro que pondera a inibição celular foi correlacionando com a concentração celular do inóculo e com a temperatura. A validação experimental da condição ótima para redução do consumo de água para controle de temperatura resultou em uma economia de água de 61,9% e um teor total de etanol de 15,2 °GL na fermentação extrativa HCD e VHG a 28 °C. Com relação à otimização do processo em termos de produtividade em etanol, na fermentação extrativa a 28 °C foram obtidos 142,1 g L⁻¹ (18 °GL) de etanol e alta produtividade volumétrica de 9,6 g L⁻¹ h⁻¹. Além disso, a concentração de etanol no vinho foi elevada (14 °GL), uma vez que a remoção de etanol por arraste gasoso com CO₂ é menor em temperaturas mais baixas. Portanto, a estratégia de utilizar o *stripping* em fermentações a baixa temperatura mostrou-se ecologicamente amigável no que diz respeito à economia de água e promissora, resultando em elevada produtividade em etanol e proporcionando benefícios econômicos resultantes da obtenção de vinhos com elevado teor alcoólico, como reduções de vapor na destilação e do volume de vinhaça gerado, além de outras economias com insumos como antibióticos e ácido sulfúrico relacionados com a contaminação bacteriana, contribuindo para redução de custos globais do processo de produção de etanol.

Palavras-chave: fermentação alcoólica, baixa temperatura, batelada alimentada, fermentação extrativa, arraste gasoso, modelagem, VHG, HCD.

ABSTRACT

VELOSO, I. I. K. **Evaluation of extractive ethanol fermentation at different temperatures with ethanol removal by CO₂ stripping**, 2023. 155 p. Thesis (Doctorate in Chemical Engineering). Federal University of São Carlos, São Carlos, 2023.

By reducing the fermentation temperature, the inhibitory effect of ethanol is also reduced, resulting in wines with higher ethanol contents, but with a significant decrease in ethanol productivity, due to the negative effect of temperature on fermentation kinetics. Another option for overcoming product inhibition is to remove part of the ethanol from the fermentation broth as it is produced, using CO₂ stripping, which increases ethanol productivity and allows the feeding of more concentrated musts. Combining the two process strategies, the present work evaluated extractive fed-batch ethanol fermentation with the removal of ethanol by CO₂ at temperatures of 28, 30, 32, and 34 °C. Firstly, a study was carried out to determine the influence of temperature on ethanol fermentation, using monitoring by mid-infrared spectroscopy (FT-MIR). Next, a mass balance of fed-batch ethanol fermentation with high cell density (HCD) was performed, considering the volume of cells (intrinsic modeling). Using a mixed kinetic model of cell growth, considering the inhibitions by substrate, product, and cells, evaluation was made of the effects of different cell concentrations on the kinetics of ethanol fermentation at different temperatures and with high substrate concentration in the must (VHG). Subsequently, a thermal analysis of the extractive fermentation was conducted at different temperatures, using simulations to find the gas flow rate that resulted in the best saving of water used for temperature control. Finally, extractive fermentation at different temperatures was optimized in terms of ethanol productivity. The monitoring of ethanol fermentation by FT-MIR showed excellent performance since it minimized the interference of temperature in the spectral bands when using calibration models with spectra acquired at different temperatures. The FT-MIR technique was essential for decision-making in extractive fermentations, including determination of the exact moment to start stripping, and productivity calculations. The developed intrinsic modeling improved substrate prediction, especially under VHG conditions. Fermentations at different cell concentrations were modeled and the parameter that reflected cell inhibition was correlated with the cell concentration in the inoculum and with temperature. The experimental validation of the optimal condition for water reduction by temperature control resulted in 61.9% water saving and a total ethanol content of 15.2 °GL for HCD and VHG extractive fermentation at 28 °C. Regarding the optimization of the process in terms of ethanol production, the extractive fermentation at 28 °C resulted in 142.1 g L⁻¹ (18 °GL) of ethanol and high volumetric ethanol productivity of 9.6 g L⁻¹ h⁻¹. Furthermore, a high concentration of ethanol in the wine (14 °GL) was obtained, since less ethanol was removed by CO₂ at lower temperatures. Therefore, the strategy of using stripping in ethanol fermentations at low temperatures proved to be promising, resulting in high ethanol productivity and providing environmental and economic advantages including water savings and other benefits from obtaining wines with high ethanol content, such as reduction of steam in distillation, reduction in the volume of vinasse generated, and other savings for inputs such as antibiotics and sulfuric acid related to bacterial contamination, contributing to cost reduction in the ethanol production process.

Keywords: Ethanol fermentation, low temperature, fed-batch, extractive fermentation, gas stripping, modeling, VHG, HCD.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Evolução da produção de etanol no Brasil desde a criação do Proálcool.....	18
Figura 2.2 – Simplificação esquemática do processo industrial de produção de etanol a partir da cana-de-açúcar.	20
Figura 2.3 – Fermentação alcoólica em batelada alimentada para produção de etanol a partir da cana-de-açúcar.	21
Figura 2.4 – Hidrólise da sacarose em meio aquoso pela enzima invertase.....	22
Figura 2.5 – Esquema simplificado da via metabólica da fermentação alcoólica pela levedura <i>S. cerevisiae</i>	24
Figura 3.1 – Ilustração esquemática do aparato experimental usado nas fermentações em batelada alimentada.	41
Figura 3.2 – Espectro no infravermelho médio da água destilada em diferentes temperaturas na região de absorção dos compostos fermentativos (8.470 a 10.990 nm): (a) SPD (sem pré-tratamento dos dados); (b) SMM+1 ^ª D.	46
Figura 3.3 – Espectros FT-MIR do sobrenadante da fermentação alcoólica adquiridos em diferentes temperaturas na região de 3500–13500 nm. O quadrado destaca a região utilizada para calibração (8000–11000 nm).	47
Figura 3.4 – Valores preditos versus valores de referência para as concentrações de (a) sacarose, (b) glicose, (c) frutose, (d) etanol e (e) glicerol, para validação cruzada (símbolos vazios) e validação externa (símbolos fechados). As linhas representam correlações perfeitas.	52
Figura 3.5 – Dados de concentrações obtidos pela técnica FT-MIR/PLS (linhas sólidas) e por CLAE (símbolos), durante a fermentação alcoólica em batelada alimentada com flutuações de temperatura: (a) sacarose, glicose e frutose; (b) etanol e glicerol. As linhas pontilhadas representam os valores de RMSECV (desvios-padrões dos modelos). O perfil de temperatura do caldo também é mostrado.	54
Figura 3.6 – Relação entre concentrações de substrato (ART) e etanol nas fermentações utilizadas para calibração (temperaturas de 26 a 36 °C, linhas tracejadas) e validação (FV, linha contínua).	55
Figura 4.1 – Perfis de concentrações simulados (linhas) e experimentais (símbolos) para fermentação em batelada (B): (a) substrato (círculos) e etanol (triângulos); (b) células totais (losangos) e células viáveis (quadrados). As linhas sólidas e tracejadas representam os resultados dos modelos intrínsecos e não intrínsecos, respectivamente. As barras verticais representam os desvios padrão para cada ponto.	67

Figura 4.2 – Perfis de concentrações simulados (linhas) e experimentais (pontos) na fermentação em batelada alimentada (BA): (a) substrato (círculos) e etanol (triângulos) e (b) células totais (losangos) e células viáveis (quadrados). As linhas sólidas e tracejadas representam os resultados dos modelos intrínsecos e não intrínsecos, respectivamente. As barras verticais representam os desvios padrão para cada ponto. 69

Figura 4.3 – Perfis de concentração simulados (linhas) e experimentais (pontos) para a fermentação VHG em batelada alimentada (BA-VHG): (a) substrato (círculos) e etanol (triângulos); (b) células totais (losangos) e células viáveis (quadrados). As linhas sólidas e tracejadas representam os resultados dos modelos intrínsecos e não intrínsecos, respectivamente. As barras verticais representam os desvios padrão para cada ponto. 71

Figura 5.1 – Ilustração esquemática das duas etapas da fermentação alcoólica em batelada alimentada realizadas no presente estudo. 77

Figura 5.2 – Fluxograma descrevendo o procedimento de estimativa de parâmetros e a simulação da fermentação alcoólica em batelada alimentada sob condições de VHG e HCD. 80

Figura 5.3 – Perfis de concentração simulados (linhas) e experimentais (símbolos) de etanol (triângulos), substrato (círculos), células totais (quadrados) e células viáveis (losangos) para tamanhos de inóculo de 50, 75, 100 e 125 g L⁻¹, a temperaturas de (a) 28 °C, (b) 30 °C, (c) 32 °C e (d) 34 °C. 83

Figura 5.4 – Perfis simulados (linhas completas) e experimentais (símbolos), das concentrações de etanol (triângulos), substrato (círculos), células totais (quadrados) e células viáveis (losangos) nas fermentações em batelada alimentada com alta concentração de substrato e alta densidade celular: (a) FV1 (T=28 °C, C_{Sm}=436 g L⁻¹ e C_{X0}=112 g L⁻¹); (b) FV2 (T=30 °C, C_{Sm}=384 g L⁻¹ e C_{X0}=105 g L⁻¹); (c) FV3 (T=32 °C, C_{Sm}=337 g L⁻¹ e C_{X0}=100 g L⁻¹); e (d) FV4 (T=34 °C, C_{Sm}=296 g L⁻¹ e C_{X0}=85 g L⁻¹). 89

Figura 5.5 – Valores de RSD obtidos para previsões do modelo nas fermentações em batelada alimentada em diferentes temperaturas, sob condições de alta concentração de substrato no mosto (VHG) e alta densidade celular (fermentações FV1-FV4). 90

Figura 6.1 – Ilustração esquemática do aparato experimental usado nas fermentações extrativas por arraste gasoso com CO₂ em batelada alimentada. 95

Figura 6.2 – Bancada de trabalho dos experimentos de análise térmica da fermentação extrativa por arraste gasoso com CO₂ em batelada alimentada em diferentes temperaturas. 95

Figura 6.3 – Contribuição de cada termo do balanço de energia das fermentações convencionais em batelada alimentada com C_{X0}=100 g L⁻¹ e C_{Sm}=300 g L⁻¹ a 28, 30, 32 e 34 °C. 104

Figura 6.4 – Taxa de geração de calor metabólico experimental (símbolos) e simulada (linha) durante a fermentação convencional em batelada alimentada a (a) 28 °C (CF₂₈) e (b) 34 °C (CF₃₄). As barras verticais representam o desvio padrão da média para cada ponto. 106

- Figura 6.5** – Contribuição de cada termo do balanço de energia em fermentações convencionais em batelada alimentada CF₂₈ e CF₃₄, com base em dados experimentais. As barras verticais representam o desvio padrão da média. 107
- Figura 6.6** – Perfis simulados (linhas) e experimentais (símbolos) das concentrações de substrato (círculos), etanol (triângulos), células viáveis (quadrados) e células totais (losangos): (a) 28 °C (CF₂₈) e (b) 34 °C (CF₃₄). As barras verticais representam o desvio padrão da média para cada ponto. 108
- Figura 6.7** – Simulações de diferentes vazões específicas de CO₂ com stripping começando em 0 h (círculo), 1 h (quadrado) e 2 h (triângulo) nas fermentações a 28 °C (EF₂₈, símbolos cheios) e 34 °C (EF₃₄, símbolos vazios). As linhas pontilhadas foram usadas apenas para destacar a tendência da curva. 110
- Figura 6.8** – Volume de água em função do tempo de parada do stripping (t_{parada}) para as simulações EF₂₈ ($F_{CO_2}=900 \text{ L h}^{-1}$) e EF₃₄ ($F_{CO_2}=540 \text{ L h}^{-1}$) com $t_{início}=0 \text{ h}$. As linhas pontilhadas foram usadas apenas para destacar a tendência da curva. 111
- Figura 6.9** – Contribuição de cada termo do balanço de energia para fermentações extrativas (EF₂₈ e EF₃₄). As barras verticais representam o desvio padrão da média. 112
- Figura 6.10** – Contribuição de cada termo do balanço de energia para a fermentação EF_{28VHG}. As barras verticais representam o desvio padrão da média. 113
- Figura 7.1** – (a) Dimensões do biorreator e (b) Dimensões do aspensor e perspectiva 2D. Medidas em milímetros. 119
- Figura 7.2** – Produtividade em etanol em função da concentração de etanol a partir da qual tem início o stripping (C_{Es}), resultante do processo de otimização das fermentações extrativas a 28 (quadrados), 30 (círculos), 32 (triângulos) e 34 °C (losangos). As setas indicam a maior C_{Es} que maximiza a produtividade em cada condição. 125
- Figura 7.3** – Perfis simulados (linhas) e experimentais (símbolos) das concentrações de substrato (círculos), etanol (triângulos), células viáveis (quadrados) e células totais (losangos) das fermentações extrativas por arraste gasoso com CO₂: (a) 28 °C, (b) 30 °C, (c) 32 °C e (d) 34 °C. As barras verticais representam o desvio padrão da média para cada ponto. 126

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Análise de desempenho dos modelos FT-MIR/PLS para o sobrenadante de fermentação alcoólica (modelos FS). A fermentação foi realizada a 36 °C e as leituras foram adquiridas a 22 °C.	48
Tabela 3.2 – Efeitos da temperatura na quantificação dos compostos presentes no sobrenadante de fermentação usando os modelos de FS obtidos a 22 °C (temperatura de referência).....	49
Tabela 3.3 – Análise de desempenho dos modelos FT-MIR/PLS para monitoramento em tempo real (modelos RM) da fermentação alcoólica.	51
Tabela 4.1 – Condições experimentais para as fermentações em batelada (B), batelada alimentada (BA) e batelada alimentada VHG (BA-VHG).	60
Tabela 4.2 – Parâmetros cinéticos e de rendimentos obtidos para os processos em batelada (B) e batelada alimentada (BA), utilizando os modelos intrínseco e não intrínseco.	66
Tabela 4.3 – Parâmetros cinéticos e de rendimentos obtidos para a fermentação VHG em batelada alimentada (BA-VHG), usando os modelos intrínseco e não intrínseco.....	70
Tabela 4.4 – Índices estatísticos para o substrato utilizado para avaliar os modelos intrínseco e não intrínseco nas fermentações em batelada alimentada (BA) e em batelada alimentada VHG (BA-VHG).	72
Tabela 5.1 – Parâmetros utilizados na modelagem cinética da fermentação alcoólica em batelada alimentada com diferentes tamanhos de inóculo.....	80
Tabela 5.2 – Principais resultados encontrados para cada condição avaliada.	82
Tabela 5.3 – Parâmetros estimados para modelagem da fermentação alcoólica em batelada alimentada em diferentes temperaturas e com diferentes concentrações de substrato no mosto.	86
Tabela 5.4 – Condições experimentais para validação do modelo e valores dos parâmetros m e $Y_{X/S}$ obtidos a partir das correlações propostas (Equações 5.9 e 5.10, respectivamente).	89
Tabela 6.1 – Condições experimentais e principais resultados das fermentações convencionais (CF) e extrativas (EF).	105
Tabela 7.1 – Parâmetros do algoritmo genético empregados na otimização.....	124
Tabela 7.2 – Condições e principais resultados das fermentações convencionais e extrativas.	127

LISTA DE QUADROS

- Quadro 2.1** – Principais modelos de crescimento celular com diferentes tipos de inibições..30
- Quadro 5.1** – Compilação de alguns estudos analisando diferentes condições de fermentação alcoólica e principais resultados obtidos. 88
- Quadro 6.1** – Parâmetros utilizados no balanço de energia, parâmetros cinéticos e coeficientes de rendimento utilizados na modelagem e simulação da fermentação alcoólica em diferentes temperaturas..... 102
- Quadro 7 1** – Parâmetros cinéticos e coeficientes de rendimento utilizados na otimização da fermentação alcoólica em diferentes temperaturas..... 123

SUMÁRIO

RESUMO.....	I
ABSTRACT	II
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE TABELAS	VI
LISTA DE QUADROS.....	VII
CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	12
1.1. INTRODUÇÃO	13
1.2. OBJETIVOS	15
1.3. ESTRUTURA DA TESE.....	16
CAPÍTULO II: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. PRODUÇÃO DE ETANOL NO BRASIL	18
2.1.1. SÍNTESE HISTÓRICA	18
2.1.2. PROCESSO DE PRODUÇÃO	19
2.2. BIOQUÍMICA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	22
2.3. CALOR GERADO NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	24
2.4. FATORES QUE INFLUENCIAM NA FERMENTAÇÃO	25
2.4.1. TEMPERATURA.....	25
2.4.2. ETANOL.....	25
2.4.3. SUBSTRATO.....	26
2.4.4. CÉLULAS	27
2.5. CINÉTICA E MODELAGEM DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	27
2.6. FERMENTAÇÃO EXTRATIVA.....	31
2.6.1. ARRASTE GASOSO	31
2.6.1.1. Remoção de etanol.....	31
2.6.1.2. Remoção de calor.....	34
2.7. FERMENTAÇÃO VHG	36
2.8. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO MÉDIO.....	37

CAPÍTULO III: INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO MONITORAMENTO DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO MÉDIO	39
3.1. INTRODUÇÃO	40
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.2.1. FERMENTAÇÃO EM BATELADA ALIMENTADA	40
3.2.1.1. <i>Microrganismo e meio de cultura</i>	40
3.2.1.2. <i>Procedimento experimental</i>	40
3.2.2. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÉRMICOS	42
3.2.3. ANÁLISE DE REFERÊNCIA	43
3.2.4. ESPECTROSCOPIA FT-MIR.....	43
3.2.5. PROCESSAMENTO DE DADOS E ANÁLISES MULTIVARIADAS	43
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
3.3.1. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DA FERMENTAÇÃO.....	45
3.3.2. PROCESSAMENTO DE DADOS DE FERMENTAÇÕES EM BATELADA ALIMENTADA	49
3.4. CONCLUSÕES	56
CAPÍTULO IV: MODELAGEM MATEMÁTICA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM BATELADA ALIMENTADA CONSIDERANDO O VOLUME OCUPADO PELAS CÉLULAS	57
4.1. INTRODUÇÃO	58
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS	59
4.2.1. ENSAIOS EXPERIMENTAIS	59
4.2.2. METODOLOGIA ANALÍTICA.....	60
4.2.3. DESENVOLVIMENTO DOS MODELOS.....	61
4.2.4. ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS E VALIDAÇÃO DO MODELO.....	64
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.3.1. ESTIMATIVA DE PARÂMETROS CINÉTICOS NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	66
4.3.2. SIMULAÇÃO DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM BATELADA ALIMENTADA	68
4.3.3. MODELAGEM DA FERMENTAÇÃO VHG EM BATELADA ALIMENTADA.....	70
4.3.4. COMPARAÇÕES DE ÍNDICES ESTATÍSTICOS.....	72
4.4. CONCLUSÕES	73

CAPÍTULO V: MODELAGEM DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM BATELADA ALIMENTADA COM ELEVADAS CONCENTRAÇÕES CELULAR E DE SUBSTRATO EM DIFERENTES TEMPERATURAS74

5.1. INTRODUÇÃO	75
5.2. MATERIAIS E MÉTODOS	76
5.2.1. MICRORGANISMO E MEIO DE CULTURA	76
5.2.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	76
5.2.3. METODOLOGIA ANALÍTICA.....	77
5.2.4. MODELAGEM MATEMÁTICA	78
5.2.5. ESTIMATIVA DE PARÂMETROS E VALIDAÇÃO DO MODELO	79
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
5.3.1. ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS m E $Y_{X/S}$	82
5.3.2. VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL	88
5.4. CONCLUSÕES	91

CAPÍTULO VI: ANÁLISE TÉRMICA DAS FERMENTAÇÕES ALCOÓLICAS CONVENCIONAL E EXTRATIVA EM DIFERENTES TEMPERATURAS.....92

6.1. INTRODUÇÃO	93
6.2. MATERIAIS E MÉTODOS	94
6.2.1. MICRORGANISMO E MEIO DE CULTURA	94
6.2.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	94
6.2.3. MODELAGEM DAS FERMENTAÇÕES CONVENCIONAL E EXTRATIVA.....	97
6.2.3.1. <i>Balanço de massa</i>	97
6.2.3.2. <i>Balanço de energia</i>	99
6.2.4. SIMULAÇÕES DAS FERMENTAÇÕES CONVENCIONAIS E EXTRATIVAS	101
6.2.5. MÉTODOS ANALÍTICOS	103
6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	103
6.3.1. EFEITO DA TEMPERATURA NOS CALORES ENVOLVIDOS NA FERMENTAÇÃO CONVENCIONAL	103
6.3.2. TERMOS ENERGÉTICOS DA FERMENTAÇÃO EXTRATIVA POR ARRASTE GASOSO COM CO ₂	109
6.3.3. TERMOS ENERGÉTICOS DA FERMENTAÇÃO VHG EXTRATIVA POR ARRASTE GASOSO COM CO ₂	112
6.4. CONCLUSÕES	115

CAPÍTULO VII: OTIMIZAÇÃO DA FERMENTAÇÃO EXTRATIVA POR ARRASTE GASOSO COM CO₂ EM DIFERENTES TEMPERATURAS	116
7.1. INTRODUÇÃO	117
7.2. MATERIAIS E MÉTODOS	118
7.2.1. MICRORGANISMO E MEIO DE CULTURA	118
7.2.2. BIORREATOR PNEUMÁTICO.....	118
7.2.3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	119
7.2.4. MÉTODOS ANALÍTICOS	120
7.2.5. MODELAGEM MATEMÁTICA	121
7.2.6. OTIMIZAÇÃO DO INÍCIO DO ARRASTE GASOSO	122
7.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	124
7.3.1. OTIMIZAÇÃO DA FERMENTAÇÃO EXTRATIVA EM DIFERENTES TEMPERATURAS	124
7.4. CONCLUSÕES	130
CAPÍTULO VIII: CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	131
8.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	132
8.2. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	133
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134

Capítulo I

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1. INTRODUÇÃO

A preocupação ambiental com o aumento das emissões de gases de efeito estufa somada à futura escassez de combustíveis fósseis têm incentivado a produção de biocombustíveis líquidos (DIAS *et al.*, 2013). Dentre estes, destaca-se o etanol ou bioetanol obtido pelo processo de fermentação. O Brasil é o maior produtor de etanol de cana-de-açúcar e o segundo maior produtor do mundo, atrás apenas dos Estados Unidos da América, que obtêm etanol a partir do milho. Na safra de 2022/2023, foram produzidos 106,6 bilhões de litros de etanol em todo o mundo, dos quais 27% foram produzidos no Brasil (CONAB, 2023). Os incentivos para a produção de etanol no Brasil iniciaram na década de 1970 com o Programa Nacional do Álcool (Proálcool). Atualmente novas iniciativas foram implementadas para a expansão da produção de etanol, como a Política Nacional de Biocombustíveis (RenovaBio) que visa ampliar a produção e o uso de biocombustíveis, fundamentada na sustentabilidade ambiental, econômica e social (ANP, 2020).

A produção de etanol no Brasil se dá a partir da fermentação de hexoses (glicose e frutose) pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Esse processo é conduzido em modo batelada alimentada ou contínuo, com temperaturas na faixa de 32 a 35 °C (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011). O mosto, que contém os nutrientes necessários para o crescimento celular, é composto de caldo de cana-de-açúcar concentrado ou melaço diluído com caldo de cana-de-açúcar ou água, a fim de obter concentrações de substrato suficientes para produzir vinhos com teor de etanol em torno de 11 °GL ($v v^{-1}$ a 20 °C) (PEREIRA *et al.*, 2018). Este baixo teor alcoólico é devido à inibição da levedura pelo etanol e, como consequência, resulta em elevado volume de vinhaça na etapa de destilação, implicando em altos custos com transporte, armazenamento e tratamento (LOPES *et al.*, 2016). Além disso, uma grande demanda energética é requerida na etapa de destilação para purificação do etanol, em que o consumo de vapor é de aproximadamente 2,6 quilogramas de vapor por litro de etanol produzido (MORANDIN *et al.*, 2011).

Uma forma de diminuir a inibição da levedura pelo etanol é reduzir a temperatura do caldo, pois em temperaturas menores a levedura é mais resistente ao etanol (DEED; DEED; GARDNER, 2015). Dessa forma é possível realizar a fermentação com elevada concentração de substrato no mosto (fermentação VHG, do inglês *very high gravity*) e obter vinhos com elevado teor alcoólico (>15 °GL), resultando em diversos benefícios econômicos

(PULIGUNDLA *et al.*, 2011; YAMAKAWA *et al.*, 2019). No entanto, a redução da temperatura de fermentação diminui a produtividade volumétrica em etanol, devido à cinética mais lenta do processo (CRUZ; RESENDE; RIBEIRO, 2021, 2018; VELOSO *et al.*, 2019). Cruz (2015) realizou fermentações em batelada alimentada à temperatura de 26 °C com elevada concentração de substrato no mosto (343 g L⁻¹) e obteve um vinho com teor alcoólico elevado de 14,4 °GL (113,6 g L⁻¹). No entanto, nessa condição experimental a produtividade volumétrica em etanol foi de 6,0 g L⁻¹ h⁻¹, valor este muito abaixo da produtividade do processo convencional, em torno de 9,0 g L⁻¹ h⁻¹, em virtude das 19 horas de processo necessárias para consumo total de substrato. Para reestabelecer altos valores de produtividade do processo, podem ser empregadas maiores concentrações celulares, processo conhecido como HCD (do inglês *high cell density*).

Uma outra abordagem que vem sendo estudada para contornar o efeito de inibição do etanol sobre a levedura é empregar a fermentação extrativa utilizando CO₂ como gás de arraste, na qual parte do etanol formado é removido à medida em que ele é produzido. Em estudos de fermentação extrativa em batelada alimentada com arraste de etanol com CO₂ a 34 °C e concentração de sacarose no mosto de 240 g L⁻¹, Sonego (2016) obteve produtividade de 9,2 g L⁻¹ h⁻¹ em razão da diminuição da inibição, porém a concentração de etanol no vinho foi de 9,8 °GL (77,3 g L⁻¹) devido à baixa resistência da levedura ao etanol nessa temperatura. Além disso, essa técnica tem se mostrado eficiente na remoção de calor do caldo de fermentação, resultando na redução de até 63% do volume de água necessário para controle de temperatura (ALMEIDA *et al.*, 2021; CAMPOS *et al.*, 2022).

Nesse contexto, ao reduzir a temperatura da fermentação e aumentar a concentração de substrato no mosto alimentado, obtém-se um vinho com elevado teor alcoólico (superior à 12 °GL). Associando ao processo a técnica de fermentação extrativa com remoção do etanol por arraste com CO₂, pode-se reduzir o tempo total do processo fermentativo. Assim, a fermentação alcoólica extrativa realizada a baixa temperatura, utilizando CO₂ como gás de arraste, pode implicar no aumento da produção de etanol e nas reduções tanto do volume de vinhaça gerado quanto do gasto energético na etapa de destilação, devido à obtenção de um vinho com alta concentração de etanol, e ainda reduzir a quantidade de água utilizada no resfriamento do caldo.

1.2. OBJETIVOS

Diante do exposto, a presente tese de doutorado teve como objetivo geral avaliar os efeitos da redução da temperatura na fermentação alcoólica extrativa em batelada alimentada com remoção de etanol empregando dióxido de carbono como gás de arraste. O objetivo proposto foi alcançado a partir do cumprimento das seguintes etapas:

- Desenvolvimento de uma metodologia analítica para monitoramento da fermentação alcoólica por espectroscopia de infravermelho médio, considerando os efeitos da temperatura.
- Realização do balanço de massa na fermentação em batelada alimentada considerando o volume ocupado pelas células.
- Avaliação dos efeitos da elevada concentração celular na cinética da fermentação alcoólica.
- Modelagem da fermentação alcoólica com diferentes concentrações de células no inóculo.
- Análise térmica da fermentação em diferentes temperaturas a partir do balanço de massa e energia.
- Otimização da vazão de gás em fermentações extrativas para redução do volume de água utilizada no controle de temperatura.
- Otimização da fermentação alcoólica extrativa com altas concentrações de substrato (*very high gravity*: VHG) em diferentes temperaturas para alcançar elevada produtividade volumétrica em etanol.

1.3. ESTRUTURA DA TESE

A presente tese de doutorado está dividida em 8 capítulos e encontra-se estruturada da seguinte forma:

- **Capítulo I:** Introdução e objetivos
- **Capítulo II:** Revisão bibliográfica
- **Capítulo III:** Influência da temperatura no monitoramento da fermentação alcoólica por espectroscopia de infravermelho médio.
- **Capítulo IV:** Modelagem matemática da fermentação alcoólica em batelada alimentada considerando o volume ocupado pelas células.
- **Capítulo V:** Modelagem da fermentação alcoólica em batelada alimentada com elevadas concentrações celular (*high cell density*: HCD) e de substrato (*very high gravity*: VHG) em diferentes temperaturas.
- **Capítulo VI:** Análise térmica das fermentações alcoólicas convencional e extrativa em diferentes temperaturas.
- **Capítulo VII:** Otimização da fermentação extrativa por arraste gasoso com CO₂ em diferentes temperaturas.
- **Capítulo VIII:** Considerações finais e sugestões para trabalhos futuros.
- **Referências bibliográficas**

Os resultados das etapas executadas no desenvolvimento do presente trabalho encontram-se nos capítulos III, IV, V, VI e VII. Em cada um são apresentados uma breve introdução, materiais e métodos, resultados e discussão e conclusões.

Capítulo II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

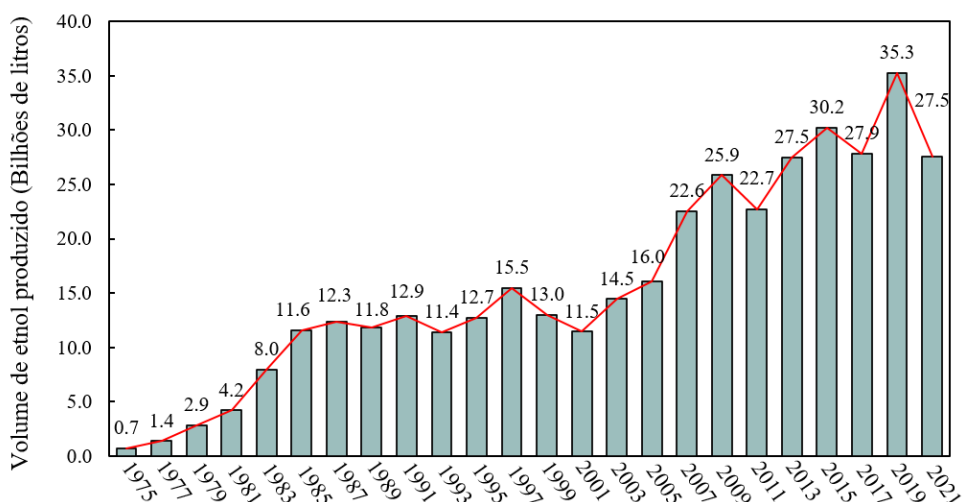
2.1. PRODUÇÃO DE ETANOL NO BRASIL

2.1.1. Síntese histórica

A produção de etanol no Brasil começou a ser estimulada em 1975 com a criação do Programa Nacional do Álcool (Proálcool), desenvolvido para evitar o aumento da dependência de importação de petróleo devido ao primeiro choque do petróleo em 1973. De acordo com o decreto nº 76.593 de 14 de novembro de 1975, o Proálcool buscou incentivar a produção de etanol por meio da expansão da oferta de matérias-primas, da modernização e ampliação das destilarias existentes e da instalação de novas unidades produtoras e de unidades armazenadoras.

A implementação do Proálcool possibilitou o desenvolvimento do mercado brasileiro, alcançando grande escala na produção de etanol. Desde a criação do Proálcool a produção de etanol no Brasil vem aumentando, conforme mostra a **Figura 2.1**. No Brasil o etanol é utilizado principalmente como combustível automotivo, tanto como etanol hidratado, quanto misturado à gasolina (etanol anidro) a fim de baratear o combustível, aumentar sua octanagem e reduzir a emissão de gases de efeito estufa. A partir de 2003, o desenvolvimento de veículos *flex-fuel* incentivou o consumo de etanol, refletindo no aumento de sua produção. Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor mundial de etanol, responsável por 27% da produção global (safra 2022/2023), o que corresponde a 28,6 bilhões de litros de etanol total, considerando o etanol hidratado (18,1 bilhões de litros) e o etanol anidro (10,5 bilhões de litros) (CONAB, 2023).

Figura 2.1 – Evolução da produção de etanol no Brasil desde a criação do Proálcool.

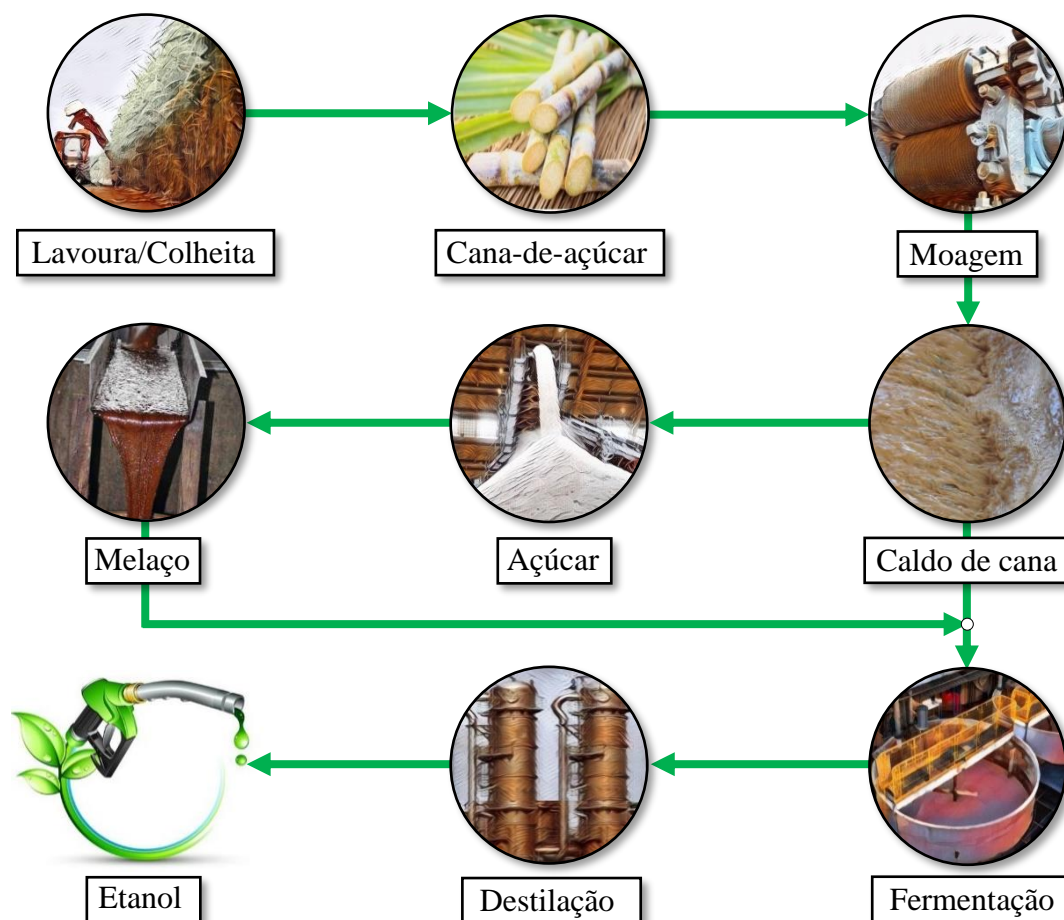


Fonte: Arquivo pessoal do autor a partir de dados da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP, 2021).

2.1.2. Processo de produção

As matérias-primas utilizadas para produção de etanol podem ser classificadas em diretamente fermentescíveis e indiretamente fermentescíveis (MENEZES, 1980). O etanol obtido a partir de fontes alimentícias, como cana-de-açúcar, milho, beterraba, batata, sorgo, entre outros, é conhecido como etanol de primeira geração (1G). Quando proveniente de fontes não alimentícias, como por exemplo a biomassa lignocelulósica, é chamado etanol de segunda geração (2G) (LASER *et al.*, 2002). O etanol produzido no Brasil é majoritariamente de primeira geração, resultante do processo de fermentação de açúcares diretamente fermentescíveis pela levedura *S. cerevisiae*. A principal matéria prima utilizada para obtenção do etanol no Brasil é a cana-de-açúcar, a partir da qual foram obtidos 87% do etanol na safra de 2022/2023, sendo os outros 13% obtidos a partir do milho (CONAB, 2023). Quando comparada com outras fontes de açúcares, a cana se destaca por possuir maior produtividade anual em etanol por área colhida, apresentar um menor impacto no custo de produção do etanol, além de possuir elevada concentração de açúcares em sua composição (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

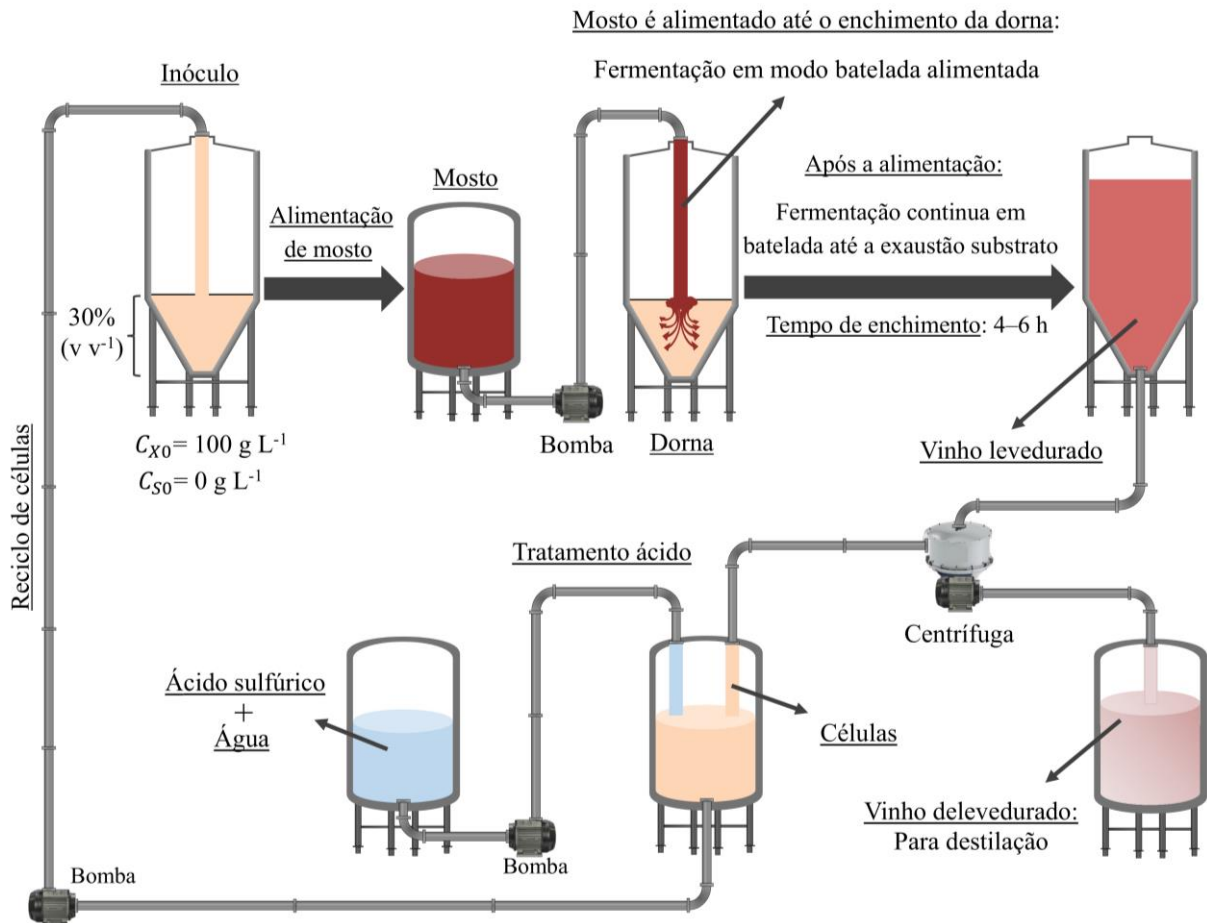
Após a colheita, a cana-de-açúcar passa por diversos processos como lavagem, corte e moagem, obtendo-se o caldo de cana e o bagaço. A maioria das destilarias brasileiras são unidades anexas às instalações industriais produtoras de açúcar (cerca de 70%). Por isso, muitas vezes o melaço pode ser utilizado como única fonte de açúcar fermentescível. O melaço, subproduto da produção de açúcar, é composto por água, sacarose (cerca de 45-60%), glicose e frutose (5-20%), além de aminoácidos, vitaminas, proteínas e minerais (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011). A solução que contém nutrientes necessários para que a levedura cresça e produza o etanol é chamada de mosto, que é composto por caldo de cana concentrado, melaço diluído em caldo de cana ou melaço diluído em água. Após o preparo, o mosto é adicionado à suspensão de levedura dando início ao processo fermentativo, que pode ocorrer em diferentes modos de operação, sendo os mais comuns, batelada, batelada alimentada e contínuo (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001). Após a fermentação, o vinho fermentado é separado da levedura por centrifugação e destilado para obtenção do etanol. Um esquema simplificado do processo de produção de etanol a partir da cana-de-açúcar é mostrado na **Figura 2.2**.

Figura 2.2 – Simplificação esquemática do processo industrial de produção de etanol a partir da cana-de-açúcar.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Na fermentação alcoólica industrial a partir de sacarose, o modo de operação predominante é a batelada alimentada (cerca de 85% das destilarias). O processo inicia com o creme de levedura (inóculo) ocupando de 25 a 30% do volume da dorna (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011). O mosto é então adicionado até completar o volume útil da dorna. Os nutrientes necessários para o crescimento celular e produção de etanol estão presentes no mosto, o qual é preparado para se obter concentração de substrato (açúcares redutores totais, ART: glicose + frutose livres e potenciais resultantes da hidrólise da sacarose) entre 150 e 250 g L⁻¹ (PEREIRA *et al.*, 2018). O inóculo tem concentração celular (C_{X0}) na faixa de 60 a 100 g L⁻¹, sem substrato (PEREIRA *et al.*, 2018; WHEALS *et al.*, 1999). A duração da alimentação é geralmente entre 4 e 6 h (tempo de enchimento da dorna). Após essa etapa, inicia-se a fase em batelada, com duração entre 2 e 4 h, apresentando um perfil de concentração de substrato descendente, que continua até o final do processo (exaustão do substrato). Uma representação esquemática da fermentação alcoólica em batelada alimentada é mostrada na **Figura 2.3**.

Figura 2.3 – Fermentação alcoólica em batelada alimentada para produção de etanol a partir da cana-de-açúcar.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

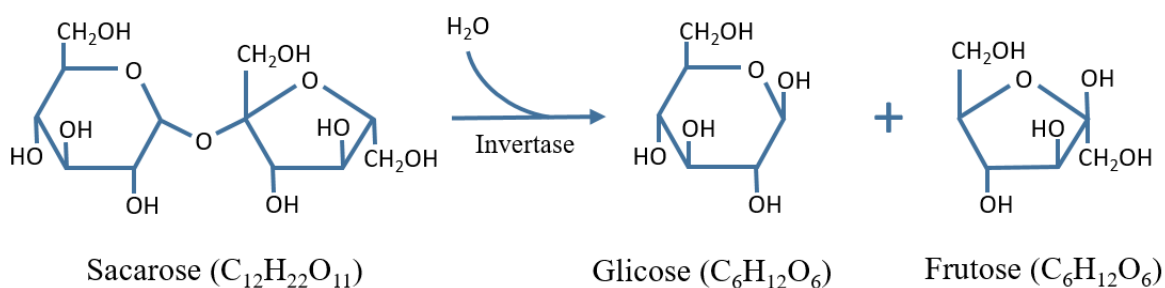
A temperatura do caldo é mantida na faixa de 32–35 °C, podendo chegar a 40 °C em dias quentes (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011). Por ser um processo exotérmico, o calor produzido durante a fermentação é removido por um sistema de resfriamento composto por trocadores de calor que utilizam água de rios e lagos. O sistema de trocadores de calor também garante a homogeneização do caldo, que é bombeado da parte inferior da dorna, passando pelo sistema de troca térmica e retornando à dorna na parte superior. Após a retirada do calor da dorna, a água é direcionada para torres de resfriamento, podendo retornar aos trocadores de calor (circuito fechado) ou retornar à natureza (circuito aberto). Durante este processo de resfriamento da água, ocorrem perdas no transporte ou por vaporização, sendo necessária a reposição de água dos sistemas de captação.

Ao término do consumo de substrato, o caldo fermentado, denominado de vinho, contém um teor alcoólico de 8 a 12 °GL ($v v^{-1}$ a 20 °C). O vinho passa por centrifugação, separando as células do sobrenadante (vinho delevedurado). A suspensão de fermento passa por tratamento com ácido sulfúrico para controle da contaminação. Em seguida é realizada uma diluição e o creme de levedura retorna à dorna, iniciando um novo ciclo. Esse processo de reciclo celular, conhecido como Melle-Boinot, é vantajoso pois possibilita o início do ciclo fermentativo com alta concentração celular. O vinho delevedurado é direcionado às colunas de destilação, onde é obtido etanol hidratado. O etanol anidro é obtido a partir de processos como destilação azeotrópica com ciclohexano, destilação extrativa com monoetilenoglicol ou adsorção com peneiras moleculares (MORANDIN *et al.*, 2011; WHEALS *et al.*, 1999). Na etapa de destilação é gerada a vinhaça, principal resíduo da fermentação alcoólica, caracterizada como uma suspensão aquosa contendo sólidos orgânicos e minerais, formada majoritariamente por água, matéria orgânica e substâncias minerais, rica em fósforo, nitrogênio, potássio, óxidos e sulfatos (ANA, 2009; CETESB, 1986). Devido à composição, a vinhaça tem sido utilizada como alternativa aos fertilizantes mineiras nas lavouras de cana-de-açúcar. No entanto, existem limitações ambientais para sua aplicação, pois as aplicações podem exceder a capacidade do solo de reter íons, resultando na contaminação de lençóis freáticos (AMORIM *et al.*, 2011; MOHANA; ACHARYA; MADAMWAR, 2009).

2.2. BIOQUÍMICA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

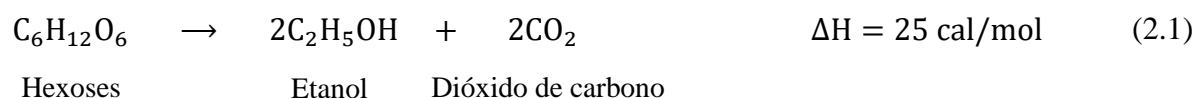
Na fermentação alcoólica a partir da cana-de-açúcar, o mosto é composto majoritariamente por sacarose (dissacarídeo), a qual é decomposta em glicose e frutose (hexoses), de acordo com a reação de hidrólise apresentada na **Figura 2.4**, devido à ação da enzima invertase presente na levedura *S. cerevisiae*.

Figura 2.4 – Hidrólise da sacarose em meio aquoso pela enzima invertase.



Fonte: Veloso (2019).

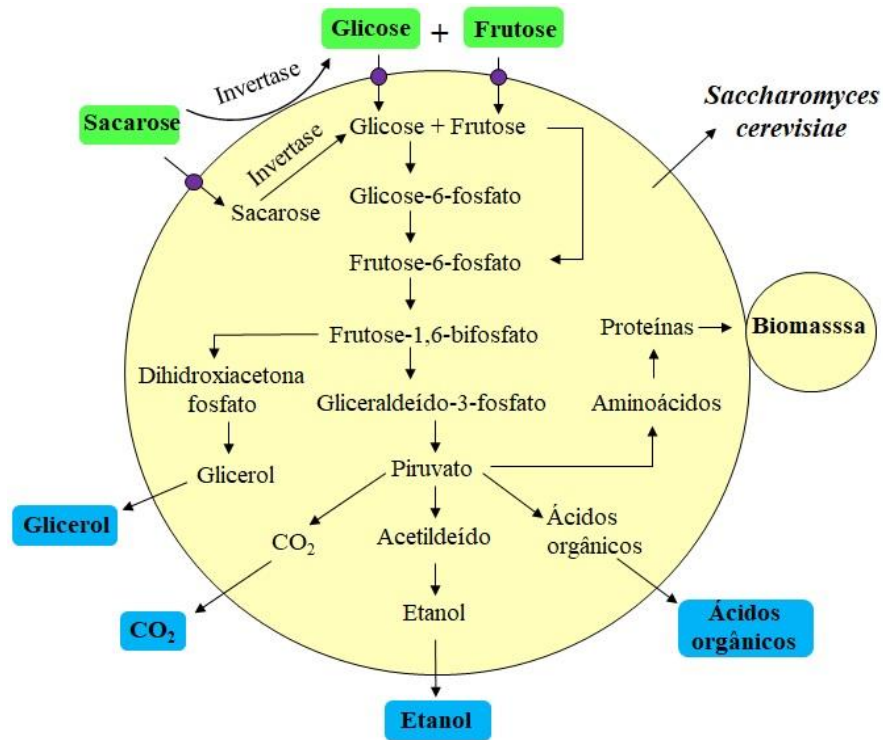
A reação de conversão de hexoses em etanol, CO₂ e energia, ocorre na ausência de oxigênio e está representada abaixo:



A partir da estequiometria da reação e da massa molar das hexoses (180 g mol⁻¹), etanol (46 g mol⁻¹) e dióxido de carbono (44 g mol⁻¹), pode-se calcular o rendimento teórico da reação. Cada mol de hexose, correspondente a 180 g, é convertido em 2 mols de etanol, ou seja, 92 g, e 2 mols de CO₂, equivalente à 88 g. Dessa forma o coeficiente de rendimento teórico de substrato a etanol é obtido pela razão entre a massa de etanol gerado e substrato consumido, resultando em 0,511 g_E g_S⁻¹. Da mesma forma o coeficiente teórico de substrato a CO₂ é 0,489 g_{CO₂} g_S⁻¹. Na prática esses valores não são obtidos, uma vez que o direcionamento do substrato não é apenas para formação de etanol e CO₂, mas também para manutenção e crescimento celular e formação de outros subprodutos como glicerol e ácidos orgânicos, além da parcela consumida por bactérias contaminantes normalmente presentes no caldo. Por isso, a eficiência da fermentação alcoólica, obtida pela razão entre o coeficiente de rendimento real e teórico, situa-se na faixa de 92-93%.

A conversão dos açúcares fermentescíveis em etanol envolve uma sequência de reações no interior da célula, conforme ilustrado no esquema simplificado da via metabólica da fermentação alcoólica na **Figura 2.5**. No citoplasma celular ocorrem as conversões de glicose e frutose em piruvato. Por meio da ação da enzima piruvato descarboxilase, o piruvato é descarboxilado, gerando acetaldeído que é reduzido a etanol e CO₂. O objetivo do microrganismo ao metabolizar os açúcares é a produção de energia (ATP) utilizada na multiplicação e na manutenção celular. Portanto, os produtos obtidos nesse processo são apenas excreção, não possuindo nenhum valor energético para a célula (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

Figura 2.5 – Esquema simplificado da via metabólica da fermentação alcoólica pela levedura *S. cerevisiae*.



Fonte: Rodrigues (2019).

2.3. CALOR GERADO NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Parte da energia produzida durante as reações metabólicas da fermentação alcoólica é liberada na forma de calor, caracterizando esse processo como exotérmico. Essa energia está relacionada com o catabolismo de moléculas nutrientes e também com a biossíntese dos componentes celulares para o crescimento microbiano (LUONG; YERUSHALMI; VOLESKY, 1983). Portanto, o calor gerado durante o crescimento celular pode ser calculado a partir do calor de combustão do substrato e do material celular. Sabendo-se que o calor de combustão é igual à soma do calor metabólico e o calor de combustão do material celular, tem-se:

$$\frac{\Delta H_S}{Y_{X/S}} = \Delta H_C + \frac{1}{Y_H} \quad (2.2)$$

em que ΔH_S é a entalpia de combustão do substrato (kJ gs^{-1}), ΔH_C é a entalpia de combustão celular (kJ gx^{-1}) e $1/Y_H$ é o calor metabólico por grama produzido de célula (kJ gx^{-1}).

De acordo com Shuler e Kargi (2002), o calor gerado durante o crescimento celular em uma fermentação é definido pela Equação 2.3.

$$\dot{Q}_G = \mu \cdot C_X \cdot V \cdot \frac{1}{Y_H} \quad (2.3)$$

em que \dot{Q}_G é a taxa de geração de calor da fermentação (kJ h^{-1}), μ é a velocidade específica de crescimento celular (h^{-1}), C_X é a concentração celular (g L^{-1}) e V é o volume do caldo (L)

2.4. FATORES QUE INFLUENCIAM NA FERMENTAÇÃO

2.4.1. Temperatura

A faixa de temperatura ótima para a produção de etanol encontra-se entre 26 e 35 °C (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001), porém com o aumento da temperatura a contaminação bacteriana é favorecida e os efeitos tóxicos do etanol aumentam. Acima da faixa de temperatura ótima, a viabilidade celular é afetada e a taxa de crescimento diminui, podendo ocorrer morte celular (SHULER; KARGI, 2002; TORIJA *et al.*, 2003). Em temperaturas mais baixas obtêm-se maiores rendimentos alcoólicos. No entanto, a produtividade diminui devido ao elevado tempo de fermentação (TORIJA *et al.*, 2003). No processo realizado a baixa temperatura há um aumento da resistência da levedura ao teor final de etanol, bem como redução de subprodutos do metabolismo celular, em consequência do menor estresse sofrido pelas células (LORA; VENTURINI, 2012). Com o aumento da temperatura, a levedura muda a composição de ácidos graxos da membrana celular, aumentando sua fluidez e facilitando o transporte de substâncias tóxicas para o interior da célula (FERNANDES, 2008; PHISALAPHONG; SRIRATTANA; TANTHAPANICHAKOON, 2006; WANDERLEY, 1994). Quando a temperatura é reduzida, a membrana torna-se mais enrijecida, dificultando o transporte de substâncias tóxicas para dentro da célula e minimizando os efeitos de fluidez causados pelo etanol (YOU; ROSENFELD; KNIPPLE, 2003). De acordo com Amorim *et al.* (1996), na faixa de temperatura de 12 a 28 °C, o efeito tóxico do etanol sobre a levedura *S. cerevisiae* é constante e se intensifica em temperaturas acima dessa faixa.

2.4.2. Etanol

O etanol é principal inibidor que afeta o metabolismo celular (CHEN; XU, 2014). A sensibilidade da levedura ao etanol é influenciada por alguns fatores, como composição e temperatura. Esse efeito inibitório é a principal limitação da fermentação alcoólica, resultando na lentidão do processo e conversões incompletas de substrato (ANSANAY-GALEOTE *et al.*, 2001). Em altas concentrações, o etanol afeta a atividade celular de maneira direta e indireta,

interferindo no transporte de soluto e na ação de enzimas (ALVES *et al.*, 1998). Seu efeito tóxico promove a desnaturação de proteínas e modifica propriedades estruturais da bicamada lipídica, alterando a permeabilidade da membrana plasmática (ANSANAY-GALEOTE *et al.*, 2001; MOON *et al.*, 2012). O efeito inibitório do etanol pode ser acentuado quanto maior for a temperatura do cultivo e pelo excesso de acidez (AMORIM, 2005).

A inibição da fermentação alcoólica pelo etanol começa a ser mais pronunciada em concentrações superiores a 40 g L^{-1} (AIBA; SHODA; NAGATANI, 1968) e inibe completamente o crescimento celular quando a concentração atinge valores em torno de 95 g L^{-1} (MAIORELLA; BLANCH; WILKE, 1983). Isso faz com que o processo de produção de etanol apresente limitações, como a concentração de substrato no mosto, que não deve ultrapassar 250 g L^{-1} , para que haja conversão completa de substrato em um tempo razoável de processo. Como consequência do uso de mostos diluídos, maior volume de água é necessário no processo, resultando em dornas com maiores volumes, além de elevado gasto energético na etapa de destilação (2,6 kg de vapor por litro de etanol produzido) e grandes volumes de vinhaça gerados (em média 12,5 litros de vinhaça por litro de etanol produzido). O elevado volume de vinhaça resulta em custos elevados com armazenamento, transporte e aplicação na lavoura que ficam em torno de R\$ 7,80 por m^3 de vinhaça (RUIZ, 2015).

2.4.3. Substrato

Concentrações elevadas de substrato influenciam na fermentação alcoólica, devido ao aumento da pressão osmótica externa, resultando na diminuição do crescimento celular e perda de viabilidade (SOUZA, 2009). Quando elevadas concentrações de substrato são atingidas na dorna, a levedura sofre estresse levando à maior produção de glicerol e resultando em menores rendimentos em etanol. De acordo com Thatipamala *et al.* (1992), os efeitos inibitórios provocados pelo substrato são observados em concentrações acima de 150 g L^{-1} . Uma estratégia para reduzir o estresse osmótico e contornar a inibição pelo substrato é alimentar o mosto gradualmente à dorna, como é realizado no processo industrial de produção de etanol a partir da sacarose, conhecido como batelada alimentada (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

2.4.4. Células

Em elevadas concentrações celulares o crescimento microbiano é prejudicado devido à dificuldade de acesso aos nutrientes, limitações de espaço e interações celulares (JARZĘBSKI; MALINOWSKI; GOMA, 1989). Em cultivos com alta densidade celular, menor é a disponibilidade de nutrientes por célula, o que promove alterações na fisiologia celular, resultando em baixa velocidade específica de crescimento (WESTMAN; FRANZÉN, 2015). Essas mudanças no comportamento celular são estimuladas pelas próprias células que por meio de mecanismos de comunicação interagem entre si, permitindo que o microrganismo controle a densidade populacional (AVBELJ *et al.*, 2015).

2.5. CINÉTICA E MODELAGEM DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

A cinética de processos fermentativos é avaliada a partir de transformações que ocorrem ao longo da fermentação, como o consumo de substrato, crescimento celular e formação de produtos, definindo perfis característicos que permitem quantificar as velocidades de transformação e demais parâmetros relacionados (ANDRIETTA; MIGLIARI; ANDRIETTA, 1999). O estudo cinético permite a avaliação da influência de fatores operacionais no processo como pH, temperatura, concentração de inibidores, agitação, entre outros. Conhecer a cinética de um processo fermentativo é, portanto, imprescindível na correção de falhas e na elaboração de estratégias de controle e otimização do processo (BONOMI; SCHMIDELL, 2001).

Os perfis de concentrações de substrato, produto e células, que caracterizam a cinética da fermentação, podem ser modelados matematicamente para um estudo mais completo do processo. Durante o crescimento celular, as moléculas dos nutrientes são catabolizadas, gerando novas células e produtos. Dessa forma, à medida que a massa celular aumenta, as velocidades de consumo de substrato e formação de produto também aumentam, sendo propício em estudos cinéticos e de modelagem de processos fermentativos relacioná-los com a quantidade de células. Em cultivos conduzidos em batelada, a taxa de crescimento celular é relacionada com a velocidade específica de crescimento celular (μ), de acordo com a Equação 2.4. Da mesma forma, definem-se as velocidades específicas de formação de produto (μ_P) e consumo de substrato (μ_S), pelas Equações 2.5 e 2.6, respectivamente.

$$\mu = \frac{1}{m_X} \cdot \frac{dm_X}{dt} \quad (2.4)$$

$$\mu_P = \frac{1}{m_X} \cdot \frac{dm_P}{dt} \quad (2.5)$$

$$\mu_S = \frac{1}{m_X} \cdot \left(- \frac{dm_S}{dt} \right) \quad (2.6)$$

em que m_X , m_P e m_S são as massas de células, produto e substrato, respectivamente.

Em processos fermentativos a formação de produto pode ocorrer de três maneiras: associada, não associada e parcialmente associada ao crescimento celular (BASTOS, 2010). Quando o produto está associado ao crescimento celular, sua formação ocorre simultaneamente ao crescimento celular. Dessa forma μ_P é proporcional à μ , de acordo com a Equação 2.7. Quando o produto não está associado ao crescimento celular, sua formação se dá somente a partir do momento em que o crescimento celular cessa, com μ_P sendo representada pela Equação 2.8. Produtos parcialmente associados ao crescimento celular são aqueles cuja formação ocorre tanto na fase de crescimento, quanto na fase em que o crescimento cessa, com μ_P sendo representada pela Equação 2.9.

$$\mu_P = \mu \cdot \alpha \quad (2.7)$$

$$\mu_P = \beta \quad (2.8)$$

$$\mu_P = \mu \cdot \alpha + \beta \quad (2.9)$$

em que α e β são os termos associado e não associado ao crescimento celular, respectivamente.

Os modelos matemáticos que descrevem a dinâmica de processos fermentativos podem ser classificados quanto ao número de componentes usados na representação celular (estruturados e não estruturados) e quanto à heterogeneidade da população microbiana (segregados e não segregados). Modelos estruturados são aqueles em que o microrganismo é descrito com maiores detalhes, considerando componentes intracelulares ou a estrutura da célula. Nos modelos não estruturados a biomassa é caracterizada por uma variável, como por exemplo, massa celular ou número de células, não sendo considerado maiores detalhes sobre a estrutura celular. Com relação à heterogeneidade da população, os modelos segregados

consideram a população celular heterogênea com distribuição de idade, tamanho e propriedade celular, enquanto modelos não segregados consideram que todas as células apresentam o mesmo comportamento, ou seja, uma população homogênea (BONOMI; SCHMIDELL, 2001). Modelos estruturados e segregados descrevem com mais detalhes a cinética microbiana devido à sua complexidade, resultando em maior esforço computacional, quando comparados com modelos não estruturados e não segregados (BONOMI; SCHMIDELL, 2001). Modelos não estruturados e não segregados são mais utilizados para descrever a cinética da fermentação alcoólica, devido à facilidade de obtenção de um número menor de parâmetros cinéticos e ao menor número de variáveis utilizadas (ANDRIETTA, 1994).

A modelagem da fermentação alcoólica tem sido utilizada como ferramenta auxiliar para melhorar o processo. Utilizando modelos confiáveis, é possível simular e otimizar o processo, reduzindo custos e esforço experimental (CAMARGOS; MORAES; OLIVEIRA, 2020; RIVERA *et al.*, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2018). Os modelos não estruturados e não segregados que descrevem o comportamento dinâmico da fermentação alcoólica, fundamentam-se na determinação da velocidade específica de crescimento (μ). Na literatura são encontrados diversos modelos cinéticos que contemplam tanto o processo sem inibição quanto aqueles em que há limitações devido à inibição por substrato, produto e/ou células. O modelo de Monod (1949) (Equação 2.10) foi proposto para descrever processos em que não há inibição, servindo como base para outros modelos, como o de Moser (1958) (Equação 2.11) e Contois (1959) (Equação 2.12).

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S} \quad (2.10)$$

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{C_S^u}{K_S + C_S^u} \quad (2.11)$$

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{C_S}{K_S \cdot C_X + C_S} \quad (2.12)$$

em que μ_{max} é a velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1}); K_S é a constante de saturação (g L^{-1}), u é um parâmetro adimensional do modelo de Moser, C_S é a concentração de substrato limitante (g L^{-1}) e C_X é a concentração celular (g L^{-1}).

Para modelar a fermentação alcoólica em condições reais de operação, como as encontradas em usinas de cana-de-açúcar, é necessário incorporar correções ao modelo de Monod (1949) que sejam capazes de descrever a cinética de crescimento da levedura, levando em consideração os efeitos causados por excessos de substrato, produto e células. A complexidade do modelo cinético irá depender das condições de cada processo, podendo haver inibições somente por substrato, etanol ou células, bem como a combinação entre elas. No **Quadro 2.1** são apresentados os modelos cinéticos com inibição encontrados na literatura.

Quadro 2.1 – Principais modelos de crescimento celular com diferentes tipos de inibições.

Autores	Tipo de inibição	Modelo
Andrews (1968)	Substrato	$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S + \frac{C_S^2}{K_{IS}}}$
Wu <i>et al.</i> (1988)	Substrato	$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S + \frac{C_S^v}{K_{IS}}}$
Aiba, Shoda e Nagatani (1968)	Produto	$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S} \cdot e^{(-K_P \cdot C_P)}$
Levenspiel (1980)	Produto	$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S} \cdot \left(1 - \frac{C_P}{C_P^*}\right)^n$
Hoppe e Hansford (1982)	Produto	$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S} \cdot \frac{K_{IP}}{K_{IP} + C_P}$
Lee, Pollard e Coulman (1983)	Células	$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S} \cdot \left(1 - \frac{C_X}{C_X^*}\right)^m$
Andrews (1968)/Levenspiel (1980)	Substrato e produto	$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S + \frac{C_S^2}{K_{IS}}} \cdot \left(1 - \frac{C_P}{C_P^*}\right)^n$
Levenspiel (1980)/Lee, Pollard e Coulman (1983)	Produto e células	$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S} \cdot \left(1 - \frac{C_P}{C_P^*}\right)^n \cdot \left(1 - \frac{C_X}{C_X^*}\right)^m$
Andrews (1968)/Lee, Pollard e Coulman (1983)	Substrato e células	$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S + \frac{C_S^2}{K_{IS}}} \cdot \left(1 - \frac{C_X}{C_X^*}\right)^m$
Andrews (1968)/Lee, Pollard e Coulman (1983)/Levenspiel (1980)	Substrato, células e produto	$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S + \frac{C_S^2}{K_{IS}}} \cdot \left(1 - \frac{C_X}{C_X^*}\right)^m \cdot \left(1 - \frac{C_P}{C_P^*}\right)^n$

K_{IS} é a constante de inibição pelo substrato ($g L^{-1}$), v é um parâmetro adimensional, K_P é a constante de inibição pelo produto ($g L^{-1}$), n é um parâmetro adimensional, C_P^* é a concentração crítica de produto a partir da qual cessa o crescimento celular ($g L^{-1}$), K_{IP} é a constante de inibição pelo produto ($g L^{-1}$), m é um parâmetro adimensional e C_X^* é a concentração crítica de células a partir da qual cessa o crescimento celular ($g L^{-1}$).

2.6. FERMENTAÇÃO EXTRATIVA

Uma outra abordagem que vem sendo estudada para contornar o efeito de inibição do etanol sobre a levedura é empregar a fermentação extrativa, que consiste na remoção do inibidor presente no caldo fermentativo à medida em que é produzido. Diferentes técnicas podem ser aplicadas na fermentação extrativa para remoção do etanol, como por exemplo extração líquido-líquido (CHANG *et al.*, 1992), extração à vácuo (NGUYEN *et al.*, 2011), osmose reversa (GARCIA; IANNOTTI; FISCHER, 1986), pervaporação (FAN *et al.*, 2015), perstração (QURESHI; MADDOX; FRIEDL, 1992), adsorção (CARTÓN *et al.*, 1998) e arraste gasoso (GROOT; VAN DER LANS; LUYBEN, 1989).

2.6.1. Arraste gasoso

2.6.1.1. Remoção de etanol

Dentre as várias técnicas de extração do etanol durante a fermentação, destaca-se o arraste gasoso por ser simples, de baixo custo e por remover seletivamente compostos voláteis (EZEJI; QURESHI; BLASCHEK, 2003). O arraste gasoso, também denominado de esgotamento ou *stripping* (do inglês), é uma técnica em que ocorre a transferência de massa de um composto da fase líquida para a fase gasosa que não contenha esse composto ou, caso contenha, deverá possuir concentrações baixas (SOUTO; POVINELLI, 2009).

A fermentação extrativa utilizando CO₂ como gás de arraste apresenta vantagens por não necessitar da aquisição de acessórios ou insumos de elevados custos como membranas e solventes, utilizando o dióxido de carbono produzido no próprio processo fermentativo. Além disso, o CO₂ não remove os nutrientes do caldo e não prejudica as células durante o processo (SONEGO, 2016). Nas condições médias de pressão e temperatura na qual ocorre grande parte das fermentações alcoólicas industriais, ou seja 1 atm e 34 °C, para cada litro de etanol produzido são gerados cerca de 425 L de CO₂, que são descartados pelas destilarias na atmosfera. Esse excessivo volume de gás produzido durante a fermentação pode ser empregado como gás de arraste (RODRIGUES, 2019; SONEGO, 2016).

O aumento da vazão do gás de arraste no processo de *stripping* promove maior turbulência, diminuindo a película estagnada e, portanto, aumentando a velocidade de transferência de massa líquido-gás. Além disso, o aumento da vazão de gás resulta em um número maior de bolhas com diâmetro menor, aumentando a área interfacial de troca de massa

(SONEGO, 2016). Além da vazão do gás de arraste, outra variável importante que influencia o arraste do etanol é a temperatura do processo. Com o aumento da temperatura ocorre o arraste preferencial de etanol. Isso ocorre devido ao aumento da pressão de vapor, redução da tensão superficial e aumento da velocidade de vaporização (SONEGO, 2016).

Matematicamente, a remoção de compostos orgânicos voláteis de soluções aquosas por arraste gasoso pode ser descrita por um modelo de primeira ordem, descrito pela Equação 2.13 (TRUONG; BLACKBURN, 1984). Diversos processos fermentativos têm utilizado esse modelo para representar o fenômeno relacionado ao arraste gasoso (CHEN *et al.*, 2014; DE VRIJE *et al.*, 2013; SONEGO *et al.*, 2014).

$$R_j = \frac{dC_j}{dt} = k_j \cdot C_j \quad (2.13)$$

em que R_j é a velocidade de remoção do componente j ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$), C_j é a concentração do componente j (g L^{-1}) e k_j é a constante de velocidade de remoção de j (h^{-1}).

Na fermentação alcoólica a partir do milho, diversos trabalhos empregaram o arraste gasoso com CO_2 evidenciando a eficácia da técnica. No processo fermentativo realizado por Pham *et al.* (1989) foi empregada elevada vazão de CO_2 (4 L min^{-1}) em um reator coluna de bolhas (1,15 L). Alta concentração de substrato foi consumida (292 g L^{-1}) e elevadas produtividades foram alcançadas $13,2 \text{ g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ (27% maior que na fermentação convencional, sem arraste gasoso). Taylor *et al.* (1995) alcançaram altas conversões (90-100%), utilizando elevada concentração de substrato (de até 600 g L^{-1}) em fermentações extrativas com CO_2 em modo contínuo. O reator utilizado foi de 2 L e o arraste gasoso foi feito em uma coluna empacotada. Os autores observaram incrustações na coluna de extração devido ao crescimento celular, prejudicando a passagem de gás. Em outro trabalho, Taylor *et al.* (1996) utilizaram reatores com volumes maiores e propuseram a lavagem periódica da coluna empacotada para resolver o problema de incrustação, melhorando o desempenho do sistema significativamente. Os autores relataram a conversão completa de 600 g L^{-1} de substrato e elevada produtividade de $15 \text{ g L}^{-1} \text{h}^{-1}$. Avaliando os efeitos da concentração de etanol (na faixa de 46 a 60 g L^{-1}) e da temperatura ($35,1$ a $38,3 \text{ }^\circ\text{C}$) no crescimento celular durante fermentações extrativas com CO_2 , Taylor *et al.* (1997) obtiveram produtividades em etanol na faixa de 14 a $17 \text{ g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ em um reator de 14 L operando em modo contínuo.

Processos fermentativos para a produção de acetona-butanol-etanol (fermentação ABE), também avaliaram a técnica de *stripping* com diferentes gases. Ezeji *et al.* (2003) utilizaram CO₂ e H₂ como gás de arraste em fermentações ABE com *Clostridium beijerinckii* BA101 em biorreator de 2 L. Comparando os resultados da fermentação ABE extrativa com a condição de referência (sem *stripping*), os autores observaram um aumento de mais de 100% na produtividade em ABE atingido o valor de 0,60 g L⁻¹ h⁻¹. Xue *et al.* (2014) também relataram aumento na produtividade no processo de produção de ABE quando empregaram o arraste gasoso com CO₂ e H₂. Em um reator de leito fibroso e utilizando *Clostridium acetobutylicum* JB200 como microrganismo produtor de ABE, os autores obtiveram produtividade em etanol de 0,35 g L⁻¹ h⁻¹ na fermentação extrativa, um aumento de mais de 45% quando comparado com a fermentação convencional sem *stripping* (0,24 g L⁻¹ h⁻¹).

Mais recentemente, o processo de *stripping* foi empregado na produção de etanol de sacarose. Sonogo *et al.* (2014) mostraram que as fermentações extrativas em batelada utilizando arraste com dióxido de carbono com vazão de gás na faixa de 2,0 a 2,5 vvm (razão entre a vazão volumétrica de gás e o volume de líquido em min⁻¹) e temperatura a 34 °C, apresentaram resultados promissores, nas quais se obteve um aumento de 25% na produtividade em etanol em relação ao processo em batelada sem *stripping*. Aplicando o arraste gasoso com CO₂ no processo em batelada alimentada a 34 °C, Sonogo *et al.* (2016) estudaram diferentes tempos de alimentação de substrato (3 e 5 h) e diferentes tempos de início do *stripping* (3 e 5 h). Os resultados mostraram que a maior produtividade em etanol foi obtida quando o tempo de alimentação de mosto foi de 5 h com início do *stripping* na terceira hora do cultivo. Alimentando mosto com concentração de substrato de 350 g L⁻¹ foi observado um aumento de 28% de etanol obtido no processo em batelada alimentada, em comparação com condições próximas às industriais, porém a concentração final de etanol no vinho foi de 76,9 g L⁻¹, devido à baixa resistência da levedura ao etanol nessa temperatura. Em outro estudo, Sonogo *et al.* (2018) realizaram a otimização da fermentação alcoólica extrativa com CO₂ em batelada alimentada a 34 °C, com elevada concentração de substrato no mosto de 434 g L⁻¹, obtendo concentração total de etanol (arrastado pelo CO₂ + presente no caldo) de 136,9 g L⁻¹ (17,2 °GL), valor cerca de 65% maior do que o teor alcoólico obtido nas destilarias brasileiras. Rodrigues (2019) realizou fermentações extrativas em batelada alimentada com concentração de substrato no mosto de 400 g L⁻¹ e conseguiu recuperar o etanol arrastado pelo CO₂ utilizando o processo de absorção com monoetilenoglicol (MEG). Nesse processo, o próprio CO₂ gerado na

fermentação foi reutilizado, passando por absorvedores e retornando ao reator, caracterizando um sistema fechado. A concentração de etanol total obtida foi de 126,0 g L⁻¹ (16,0 °GL) e a concentração de etanol no caldo ao final da fermentação foi de 87,1 g L⁻¹. Da quantidade de etanol arrastada, 98,3% foi recuperada pelo processo de absorção em MEG.

A fim de aumentar ainda mais os ganhos da fermentação extrativa e torná-la viável economicamente para aplicação industrial, muitos estudos são dedicados a melhorias na etapa de recuperação do etanol arrastado. Martins (2021) buscou enriquecer a corrente de gás de saída em etanol. Para isso, foram utilizados eliminadores de névoas de diferentes materiais (poliácido láctico, aço inoxidável e esferas de vidro) instalados no topo de um reator pneumático do tipo coluna de bolhas. A fase gasosa da fermentação extrativa com CO₂ foi analisada por espectroscopia de infravermelho médio. Os resultados mostraram que o uso de eliminadores de névoa de esferas de vidro promoveram um maior enriquecimento em etanol da fase gasosa na saída do biorreator, em comparação com uma fermentação extrativa sem eliminador. Além disso, a autora estudou o efeito do *headspace* no processo de *stripping*. Em um reator pneumático coluna de bolhas, o processo de *stripping* foi empregado utilizando soluções hidroalcolólicas com concentrações de etanol de 80 g L⁻¹. Variando o volume da solução, alterou-se a altura do *headspace*. Dessa forma, o processo de *stripping* foi realizado com volumes de 2,5; 5,0; 7,5 e 10 L. Comparando os diferentes ensaios, verificou-se que quanto maior o *headspace*, maior foi a remoção de etanol da fase líquida, devido ao efeito de parede molhada que incrementa a transferência de massa. Em outro trabalho, Santos (2022) estudou o enriquecimento da corrente gasosa em etanol a partir da desidratação da fase gasosa por adsorção. A zeólita 3A foi utilizada como adsorvente em uma coluna de adsorção conectada na saída de gás do biorreator. Ensaios com solução hidroalcolólica mostraram que o processo de adsorção foi capaz de remover toda a água da corrente gasosa na saída do reator, enriquecendo-a em etanol. O trabalho foi concluído com a realização de uma fermentação extrativa com recuperação de etanol a partir da integração dos processos de adsorção e absorção em MEG. O enriquecimento em etanol da corrente gasosa por adsorção melhorou o processo de absorção, recuperando 100% do etanol arrastado, tornando o processo de *stripping* ainda mais atraente.

2.6.1.2. Remoção de calor

Para tentar manter a temperatura da fermentação na faixa ideal de crescimento celular, o calor gerado durante a fermentação deve ser removido. Em escala industrial, isso é feito a partir da circulação de água, proveniente de rios e lagos, em trocadores de calor, consumindo

cerca de 60 a 80 litros de água para cada litro de etanol produzido (ANA, 2009). No entanto, devido a ineficiência desses sistemas de resfriamento utilizados, a temperatura do caldo de fermentação pode chegar a 40 °C, principalmente em dias quentes, prejudicando o processo. Portanto, existem melhorias a serem consideradas na etapa de resfriamento da fermentação alcoólica, no que diz respeito à eficiência e economia de água.

A fermentação extrativa por arraste gasoso com CO₂ vem sendo estudada como uma técnica para remoção de calor da dorna. Durante a fermentação extrativa por arraste gasoso com CO₂ ocorre a vaporização dos compostos voláteis, removendo energia do sistema. Isso ocorre, pois, uma fração de moléculas da superfície do líquido adquire energia para vencer as forças moleculares, passando da fase líquida para a fase vapor. Dessa forma, as moléculas de maior energia deixam a fase líquida, permanecendo apenas as moléculas de menor energia, diminuindo a temperatura (SILVA *et al.*, 2015).

Almeida *et al.* (2021) avaliaram a eficiência da técnica de *stripping* na remoção de calor durante a fermentação alcoólica. Os autores realizaram fermentações extrativas em batelada e batelada alimentada com concentração de substrato suficiente para produzir 80 g L⁻¹ de etanol. As fermentações em batelada foram conduzidas em escala de bancada utilizando um biorreator com 10 L de volume útil e vazão de CO₂ de 10 L min⁻¹ (vazão específica de 1,0 vvm). A fermentação em batelada alimentada foi realizada em escala piloto em biorreator de 100 L de volume útil com vazão de CO₂ de 100 L min⁻¹ (vazão específica de 1,0 vvm). A partir do balanço de energia proposto e dos dados experimentais, os autores observaram uma redução de 63% na água de resfriamento, comparando com a fermentação convencional.

No trabalho de Campos *et al.* (2022) foi enfatizada a capacidade do *stripping* em remover calor. Para isso uma fermentação extrativa foi realizada utilizando a mesma vazão específica de gás (2,5 vvm) utilizada nos trabalhos de remoção de etanol por CO₂ (RODRIGUES, 2019; SONEGO, 2016). A temperatura da fermentação foi mantida em 34 °C até o início do *stripping*, após o qual, o sistema de troca térmica com recirculação de água foi desligado. Com isso os autores mostraram que o *stripping* foi capaz de remover o calor gerado durante a fermentação e ainda resfriar o caldo até 28 °C. Uma das conclusões dos autores foi que a elevada vazão específica de gás não poderia atender simultaneamente dois critérios desejados: remover o inibidor e minimizar o volume de água necessário para manter a temperatura constante em 34 °C. Isso por que, em altas vazões de CO₂, seria necessário fornecer

calor ao sistema para manter a temperatura em 34 °C, o que resultaria em grandes volumes de água. A partir dos balanços de massa e energia, os autores avaliaram diferentes concentrações de substrato no mosto, na faixa de 257 a 343 g L⁻¹ a partir de simulações. Para cada condição de substrato foram avaliadas diferentes vazões de gás, objetivando encontrar a vazão que minimizasse a quantidade de água e, ao mesmo tempo, fosse capaz de remover o inibidor, melhorando a produtividade. Com essa estratégia os autores encontraram uma vazão ótima de 1,2 vvm para ser aplicada na fermentação extrativa com concentração de substrato de 314 g L⁻¹. Nessa condição, os resultados simulados mostraram que o volume de água utilizado para manter a temperatura constante foi o mesmo da condição controle (condição utilizada na indústria). No entanto, na condição otimizada foram obtidos 12,3 °GL, enquanto na condição controle foi obtido um teor alcoólico de 10,3 °GL. Dessa forma os autores mostraram que a técnica de *stripping* pode ser otimizada para atender a dois critérios: aumento da quantidade de etanol produzido e redução de água para controle de temperatura da dorna.

2.7. FERMENTAÇÃO VHG

A fermentação alcoólica com elevada concentração de substrato no mosto é conhecida como fermentação VHG (do inglês *very high gravity*). Na fermentação VHG, devido à maior quantidade de substrato processada, elevados teores alcoólicos são obtidos (>15 °GL ou v v⁻¹ a 20 °C), resultando nas reduções do volume de vinhaça e do consumo de vapor na destilação, além da economia de insumos (ácido sulfúrico e antibióticos), água e equipamentos de processo (AMORIM *et al.*, 2011). Mostos mais diluídos, como ocorre nas destilarias brasileiras, requerem maiores equipamentos para serem processados, ao passo que mostos mais concentrados resultam em volumes de trabalho menores, podendo-se empregar dornas com volumes reduzidos e diminuir o número de centrífugas.

Visando benefícios técnicos e econômicos para o processo de produção de etanol, fermentações conduzidas com altas concentrações de substrato têm sido estudadas como forma de obter elevado teor de etanol. No entanto, essa técnica deve ser empregada em conjunto com outra estratégia de cultivo, objetivando contornar a inibição pelo etanol. Segundo Amorim *et al.* (2011), existem vários desafios científicos a serem resolvidos para a aplicação da fermentação VHG do ponto de vista industrial. Muitos estudos têm aplicado estratégias para melhorar a fermentação VHG, como a variação da temperatura do caldo de fermentação (RIVERA *et al.*, 2017), remoção do etanol (inibidor) (SONEGO *et al.*, 2018) e adaptação da levedura a baixas temperaturas (CRUZ; RESENDE; RIBEIRO, 2018).

Veloso *et al.* (2019) realizaram fermentações VHG em batelada alimentada a 28 °C, obtendo vinho com teor alcoólico de 17 °GL, com produtividade volumétrica em etanol de 5 g L⁻¹ h⁻¹. Cruz (2015) adaptou a levedura a 4 °C e realizou fermentação alcoólica VHG a 26 °C, obtendo vinhos com 14,4 °GL e produtividade de 10 g L⁻¹ h⁻¹. Rivera *et al.* (2017) estudaram a variação de temperatura durante a fermentação, além da suplementação de nutrientes e microaeração durante o tratamento celular e obtiveram vinhos com 15,2 °GL e produtividade de 10,2 g L⁻¹ h⁻¹. Com relação às fermentações extrativas, diversos trabalhos são reportados na literatura mostrando a eficácia da técnica em condições VHG para obtenção de elevados teores alcoólicos e alta produtividade volumétrica em etanol (LEMOS *et al.*, 2020; RODRIGUES, 2019; SONEGO *et al.*, 2018).

2.8. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO MÉDIO

A faixa de comprimento que abrange a região do infravermelho (*infrared* – IR, do inglês) é de 780 a 1.000.000 nm e se subdivide em: infravermelho próximo (*near-infrared* – NIR, do inglês) na faixa de 780 a 2.500 nm; infravermelho médio (*mid-infrared* – MIR, do inglês) na faixa de 2.500 a 25.000 nm; e infravermelho distante (*far-infrared* – FIR, do inglês) na faixa de 25.000 a 1.000.000 nm (TÜRKER-KAYA; HUCK, 2017). Essa técnica espectroscópica baseia-se na capacidade de cada molécula em absorver radiação em comprimentos de onda característicos. A partir da radiação absorvida em função do comprimento de onda são obtidos gráficos, conhecidos como espectros (SKOOG *et al.*, 2006). Conjuntos complexos de dados espectrais resultantes de misturas com muitos compostos, necessitam de tratamentos computacionais para converter essas informações em dados de interesse, como concentração dos compostos. Esses tratamentos, chamados de modelos de calibração, são funções matemáticas capazes de descrever quantitativamente a absorção da luz em função da concentração e do caminho óptico no qual ocorre a absorção, geralmente baseados na lei de Beer-Lambert (BRERETON, 2007; SKOOG *et al.*, 2006).

A calibração univariada fundamenta-se em um único comprimento de onda para determinar a concentração de compostos (BRERETON, 2007), enquanto que na calibração multivariada vários comprimentos de onda são utilizados. Dessa forma, modelos para a calibração multivariada são representados na forma matricial e proporcionam estimativas mais precisas. Alguns exemplos de métodos de regressão múltipla utilizados em análises de dados espectrais são: Análise de Componentes Principais (*Principal Components Analysis*, PCA, do

inglês), Regressão de Componentes Principais (*Principal Components Regression*, PCR, do inglês), Regressão Linear Múltipla (*Multiple Linear Regression*, MLR, do inglês) e Mínimos Quadrados Parciais (*Partial Least Squares*, PLS, do inglês). O método de regressão PLS é capaz de resolver a maioria dos problemas sendo, portanto, o mais utilizado em estudos da literatura (BRERETON, 2007).

Técnicas de espectroscopia de infravermelho médio (MIR) e próximo (NIR) têm sido amplamente estudadas para fins de monitoramento de bioprocessos, muitas vezes em combinação com o método de regressão PLS (FROHMAN; DE ORDUÑA HEIDINGER, 2018; NASCIMENTO *et al.*, 2017; PINTO *et al.*, 2016; RIVERA *et al.*, 2017; URTUBIA *et al.*, 2008). Este é um método rápido, minimamente invasivo, não destrutivo e barato, mas é muito sensível à variação de temperatura (LOURENÇO *et al.*, 2012; PENG *et al.*, 2016). Muitos estudos avaliaram os efeitos da temperatura nas regiões MIR e NIR, usando regressão PLS para o monitoramento de frutose, glicose, etanol e glicerol. Fayolle *et al.* (1996) estudaram o efeito da temperatura na região MIR e no método de calibração, concluindo que a temperatura afeta o espectro da amostra e pode interferir na quantificação dos compostos. Rathore *et al.* (2007) relataram a interferência da temperatura nos espectros quando a região NIR foi utilizada para monitorar os principais compostos da fermentação alcoólica a partir do milho, observando que a aplicação da primeira derivada como pré-tratamento reduziu o deslocamento da linha de base causado pela variação da temperatura. Em outro estudo, Chapanya *et al.* (2019) usaram espectros NIR obtidos em diferentes temperaturas para construir modelos de calibração combinados que foram usados para prever as concentrações de sacarose, glicose e frutose a 25, 35 e 45 °C. Os valores de referência e preditos (obtidos pelo método do modelo combinado) não foram estatisticamente diferentes, mostrando o potencial desta técnica para análise de açúcares fermentescíveis em melaço. Nos processos de fermentação alcoólica, a temperatura influencia tanto a absorção na região MIR (FAYOLLE *et al.*, 1996; URTUBIA *et al.*, 2008) quanto a cinética da levedura (RIVERA *et al.*, 2017; VELOSO *et al.*, 2019). Os efeitos da flutuação da temperatura na cinética da levedura nas primeiras horas do processo, juntamente com a diluição do caldo de fermentação pela alimentação do mosto, resultam em diferentes combinações das concentrações dos compostos de fermentação. Portanto, um monitoramento preciso do processo deve levar em conta esses efeitos.

Capítulo III

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO MONITORAMENTO DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO MÉDIO

3.1. INTRODUÇÃO

Estudos têm sido publicados sobre o monitoramento em tempo real da fermentação alcoólica em batelada alimentada, como é realizado em um processo industrial (RODRIGUES *et al.*, 2018). No entanto, esses estudos não avaliaram o efeito das flutuações de temperatura do processo. Portanto, o presente estudo teve como objetivo desenvolver uma metodologia usando espectroscopia de infravermelho médio por transformada de Fourier (FT-MIR) para monitoramento em tempo real da fermentação alcoólica em batelada alimentada, considerando um amplo domínio de relações entre os principais compostos (sacarose, glicose, frutose, etanol e glicerol) e as flutuações de temperatura do processo industrial. Primeiramente, amostras de sobrenadante do caldo de fermentação foram submetidas a temperaturas de 14 a 70 °C, a fim de estudar o efeito térmico na quantificação desses compostos por espectroscopia FT-MIR. Posteriormente, a regressão PLS com validação cruzada foi usada para obter modelos de calibração para monitoramento em tempo real do processo, empregando dados de fermentações em batelada alimentada a temperaturas constantes de 26 a 36 °C. Uma fermentação simulando as flutuações térmicas da operação industrial foi realizada para validar a aplicação da técnica no monitoramento do processo.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Fermentação em batelada alimentada

3.2.1.1. Microrganismo e meio de cultura

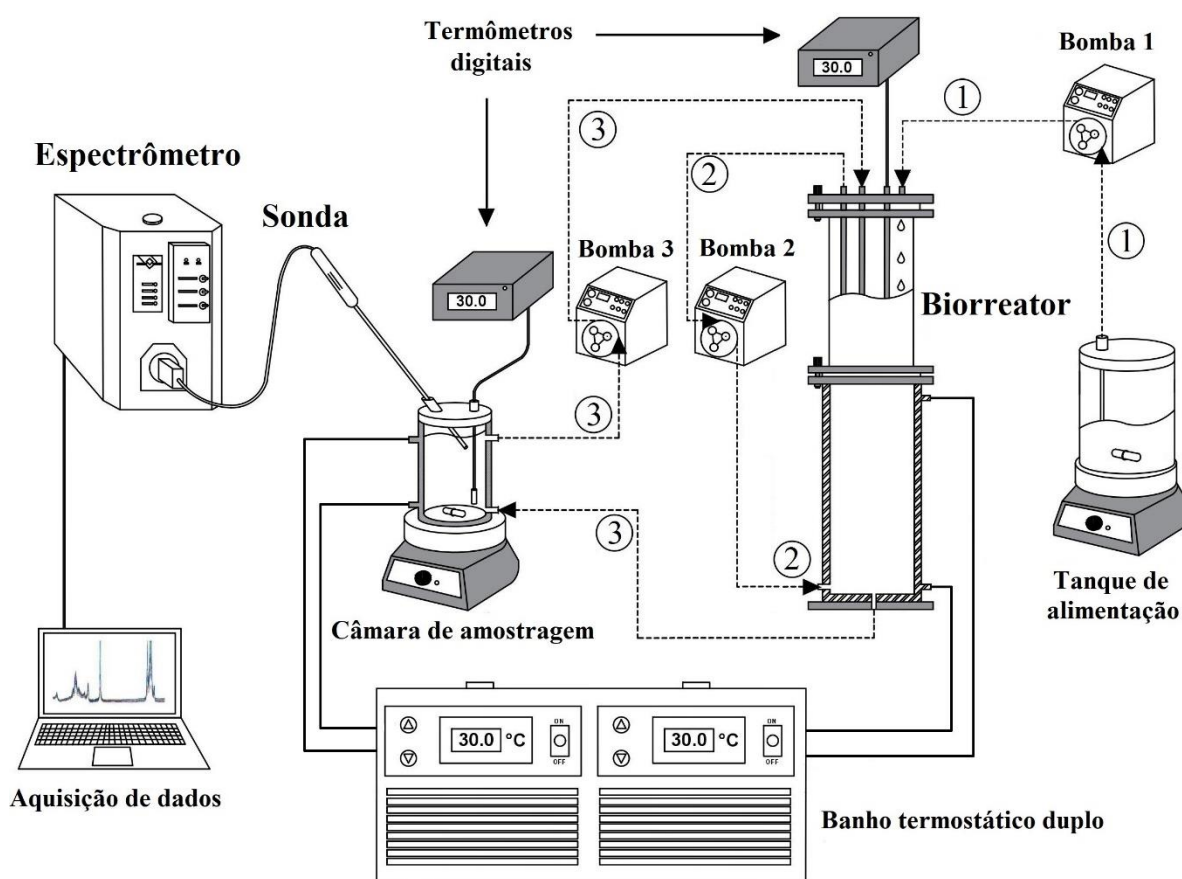
A levedura industrial liofilizada *S. cerevisiae* Y-904, gentilmente cedida pela AB Brasil Indústria e Comércio de Alimentos Ltda (Brasil), foi utilizada neste estudo como microrganismo produtor de etanol. O meio de cultura (mosto) foi preparado com reagentes analíticos, simulando o melaço de cana-de-açúcar utilizado nas destilarias brasileiras. O mosto tinha a seguinte composição: sacarose (244,0 g L⁻¹, equivalente a 257,0 g L⁻¹ de ART), MgSO₄·7H₂O (2,0 g L⁻¹), KH₂PO₄ (8,0 g L⁻¹), extrato de levedura (9,71 g L⁻¹) e ureia (7,6 g L⁻¹). O pH inicial do meio foi ajustado para 4,6 por adição de ácido clorídrico (1 M).

3.2.1.2. Procedimento experimental

A **Figura 3.1** mostra uma ilustração esquemática das fermentações em batelada alimentada realizadas em um biorreator tipo torre com um volume de trabalho de 2 L, composto

por uma base encamisada de aço inoxidável e uma parte superior transparente de vidro borossilicato (47,7 cm de altura total, 30,3 cm altura do líquido e diâmetro interno de 9,2 cm). O volume de inóculo de 0,6 L (correspondente a 30% do volume de trabalho) foi composto por levedura liofilizada (30 g, base seca) previamente hidratada em água destilada, sem substrato ou etanol. No biorreator, a suspensão de células foi aclimatada por 20 min por recirculação fornecida por uma bomba peristáltica (Modelo BVP, Ismatec – Bomba 2), com vazão de $1,0 \text{ L min}^{-1}$. Em seguida, iniciou-se a fermentação alimentando o mosto (1,4 L, correspondente a 70% do volume de trabalho) a uma vazão constante de $0,280 \text{ L min}^{-1}$ (corrente ①), utilizando uma bomba peristáltica (Modelo 120 U, Watson-Marlow – Bomba 1), completando o volume de trabalho do biorreator (2 L) em 5 h (tempo de enchimento). Durante o processo, a bomba 2 foi utilizada para homogeneizar o caldo de fermentação (corrente ②).

Figura 3.1 – Ilustração esquemática do aparato experimental usado nas fermentações em batelada alimentada.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Para a construção dos modelos de calibração foram realizadas seis fermentações a temperaturas constantes de 26, 28, 30, 32, 34 e 36 °C. A temperatura foi controlada com água de um banho termostático recirculada através da camisa do biorreator e monitorada por meio de um termômetro digital (MT 512, Full Gauge). Para validação do modelo, uma fermentação adicional (FV) foi realizada em condições de flutuação térmica semelhantes às observadas em processos industriais. Na fermentação FV, a temperatura inicial foi fixada em 26 °C, seguida de um aumento de 2 °C, a cada hora, até atingir 36 °C, simulando o aumento de temperatura do processo industrial causado pelo calor gerado na fermentação (processo exotérmico). Posteriormente, a temperatura do caldo foi reduzida em 2 °C a cada hora, até atingir 30 °C (representando a ativação de trocadores de calor no processo industrial), e então foi novamente aquecido (em 2 °C a cada hora), até atingir 36 °C.

Em todas as fermentações, um agente antiespumante comercial (Qualifoam, diluído a 30% m m⁻¹) foi adicionado quando necessário, a fim de reduzir a formação excessiva de espuma. Amostras (5 mL) foram periodicamente retiradas para determinação das concentrações de sacarose, glicose, frutose, etanol e glicerol por cromatografia líquida de alta eficiência. Os espectros foram adquiridos a cada 10 min usando uma sonda imersa em uma câmara de amostragem, na qual o caldo de fermentação foi recirculado por uma bomba peristáltica (Modelo 323 Dz, Watson-Marlow-Bomba 3), retornando ao biorreator a uma vazão de 60,0 mL min⁻¹ (corrente ③).

3.2.2. Avaliação dos efeitos térmicos

Para investigar a influência da temperatura na quantificação dos compostos da fermentação pela técnica FT-MIR, foram adquiridos espectros de água destilada e sobrenadante de fermentação nas temperaturas de 14, 22, 30, 38, 46, 54, 62 e 70 °C, usando uma câmara de amostragem de vidro encamisada de 200 mL (**Figura 3.1**). Um agitador magnético foi usado para homogeneizar a amostra durante a aquisição do espectro. A temperatura foi mantida recirculando água de um banho termostático através da camisa da câmara de amostragem. Um termômetro digital (MT 512, Full Gauge) foi usado para monitorar a temperatura. A amostra de sobrenadante foi obtida a partir de uma fermentação realizada a 36 °C, em duplicata. Após 4 h de fermentação, 200 mL de caldo foram centrifugados e o sobrenadante foi submetido ao procedimento de análise para quantificação dos compostos nas diferentes temperaturas de 14 a 70 °C.

3.2.3. Análise de referência

As amostras do caldo de fermentação foram centrifugadas a $10.414 \times g$ e $4 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 min. As concentrações de referência de sacarose, glicose, frutose, etanol e glicerol no sobrenadante foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), usando um cromatógrafo (Alliance 2695, Waters, EUA) equipado com um detector de índice de refração e uma coluna Sugar-Pak I ($300 \times 6,5 \text{ mm}$, $10 \text{ }\mu\text{m}$, Waters). A coluna foi mantida a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ e o eluente foi água ultrapura com vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Soluções de sacarose, glicose, frutose, etanol e glicerol em concentrações entre $0,1$ e $8,0 \text{ g L}^{-1}$ foram utilizadas como padrões.

3.2.4. Espectroscopia FT-MIR

Os espectros das amostras foram adquiridos usando uma sonda de fibra óptica de reflexão total atenuada (ATR, do inglês *attenuated total reflection*) acoplada a um espectrômetro infravermelho de transformada de Fourier (ReactIR 45m, Mettler-Toledo AutoChem, Inc.). O sistema foi equipado com um detector de mercúrio-cádmio-telureto (MCT) resfriado com nitrogênio líquido e um sistema de purga empregando nitrogênio gasoso para remover CO_2 e água do compartimento óptico. Os espectros foram adquiridos na faixa de 3.000 a 15.000 nm , com resolução de $4,2 \text{ nm}$, com 256 varreduras por amostra. Um espectro de referência do ar foi adquirido antes de iniciar cada experimento.

3.2.5. Processamento de dados e análises multivariadas

Para analisar o efeito da temperatura no sobrenadante, modelos de calibração foram construídos usando dados de concentração para o sobrenadante da fermentação alcoólica em batelada alimentada realizada a $36 \text{ }^\circ\text{C}$ (modelos FS), com os espectros das amostras sendo adquiridos a cada hora em temperatura ambiente ($22 \text{ }^\circ\text{C}$). Os dados foram divididos em conjuntos de calibração e teste, consistindo em 14 e 6 amostras, respectivamente. As amostras do conjunto de teste foram selecionadas aleatoriamente para validação externa dos modelos, considerando toda a faixa de dados.

Os modelos de calibração para monitoramento em tempo real (modelos RM) foram obtidos usando dados espectrais de fermentações realizadas a 26 , 28 , 30 , 32 , 34 e $36 \text{ }^\circ\text{C}$ (conjunto de calibração, composto por 77 amostras). Os dados da fermentação com variação de temperatura (FV) foram utilizados para validar os modelos (conjunto de teste, composto por 25 amostras).

Para os modelos FS e RM, a faixa espectral usada nos modelos de calibração continha a banda de absorção característica para cada composto (sacarose: 8.470-10.990 nm; glicose: 8.470-10.230 nm; frutose: 8.930-10.470 nm; etanol: 8.970-9.820 nm; glicerol: 8.670-10.200 nm).

As técnicas de pré-tratamento utilizadas neste estudo foram suavização por média móvel (SMM) e primeira derivada (1ªD). A técnica SMM é baseada na seleção de janelas de comprimento de onda de 21,0 nm (5 pontos de dados). O método dos mínimos quadrados parciais (PLS) foi utilizado para a calibração multivariada. Para escolher o número de variáveis latentes (LV) e evitar o *over-fitting*, os conjuntos de calibração foram usados no método de validação cruzada LOOCV (do inglês, *leave-one-out cross-validation*) (RODRIGUES *et al.*, 2017). O critério usado para selecionar o número ótimo de variáveis latentes (LV_{OT}) foi baseado nas curvas do erro quadrático médio de validação cruzada (RMSECV, do inglês *root-mean-square error of cross-validation*, Equação 3.1) e do erro quadrático médio de calibração (RMSEC, do inglês *root-mean-square error of calibration*, Equação 3.2) em função do LV (CERVERA *et al.*, 2009). O critério para avaliar a capacidade preditiva dos modelos em relação aos dados externos (conjuntos de teste) foi o erro quadrático médio de predição (RMSEP, do inglês *root-mean-square error of prediction*, Equação 3.3).

$$RMSECV = \sqrt{\frac{1}{n_{cal}} \cdot \sum_{k=1}^{n_{cal}} (c_k - \hat{c}_k)^2} \quad (3.1)$$

$$RMSEC = \sqrt{\frac{1}{n_{cal} - LV} \cdot \sum_{k=1}^{n_{cal}} (c_k - \hat{c}_k)^2} \quad (3.2)$$

$$RMSEP = \sqrt{\frac{1}{n_{teste}} \cdot \sum_{k=1}^{n_{teste}} (c_k - \hat{c}_k)^2} \quad (3.3)$$

em que n_{cal} e n_{teste} são os tamanhos dos conjuntos de calibração e teste, LV é o número de variáveis latentes e c_k e \hat{c}_k são as concentrações de referência e preditas da k-ésima amostra, respectivamente.

O desempenho dos modelos PLS também foi avaliado com base no coeficiente de correlação de validação cruzada (R^2), na razão entre o intervalo de dados e erro de predição (RER, do inglês *range error ratio*, Equação 3.4) e na razão entre o desvio padrão e erro de predição (RPD, do inglês *error of performance to the standard deviation*, Equação 3.5).

$$RER = \frac{Range_{teste}}{RMSEP} \quad (3.4)$$

$$RPD = \frac{SD_{teste}}{RMSEP} \quad (3.5)$$

em que $Range_{teste}$ e SD_{teste} são a faixa dos dados de concentração e o desvio padrão dos dados de concentração no conjunto de teste, respectivamente.

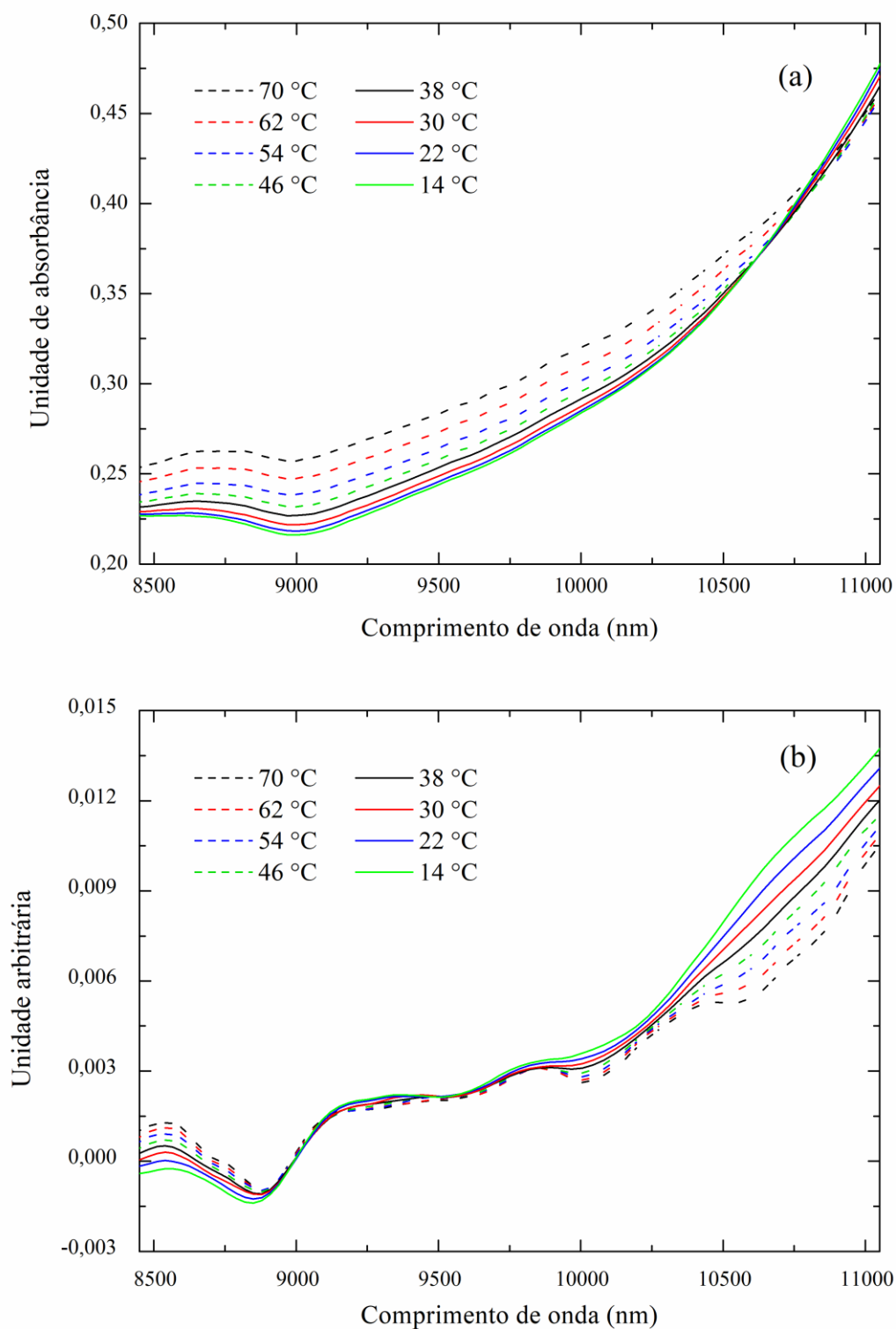
O software IC IR v. 4.3.35 SP1 (Mettler-Toledo AutoChem, Inc.) foi utilizado para aquisição e pré-processamento de dados, bem como para análise de desempenho dos modelos.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Influência da temperatura na quantificação dos compostos da fermentação

Considerando que a matriz do caldo de fermentação é água (GARCIA-JARES; MÉDINA, 1997), testes foram realizados com água destilada em temperaturas de 14 a 70 °C. A **Figura 3.2a** mostra os espectros de água sem pré-tratamento de dados (SPD), em diferentes temperaturas, na região de absorção dos compostos de fermentação (8.470 a 10.990 nm). No geral, os valores de absorbância aumentaram com o aumento da temperatura, corroborando resultados relatados na literatura (LIBNAU *et al.*, 1994). Os valores de absorbância dos espectros adquiridos a 14 e 22 °C foram muito mais próximos entre si, em comparação com os valores de absorbância dos espectros adquiridos em 62 e 70 °C. Esse comportamento provavelmente está relacionado a um deslocamento da linha de base. O pré-tratamento com primeira derivada é frequentemente usado para corrigir o deslocamento da linha de base e para melhorar a resolução espectral (RATHORE *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2017). Conforme mostrado na **Figura 3.2b**, o pré-tratamento SMM+1^aD reduziu o deslocamento da linha de base causado pela variação de temperatura. No entanto, mesmo com o uso da primeira derivada, os efeitos da temperatura sobre os espectros ainda foram observados. Rathore *et al.* (2007) relataram resultados semelhantes para espectros NIR de sobrenadantes de fermentação de milho.

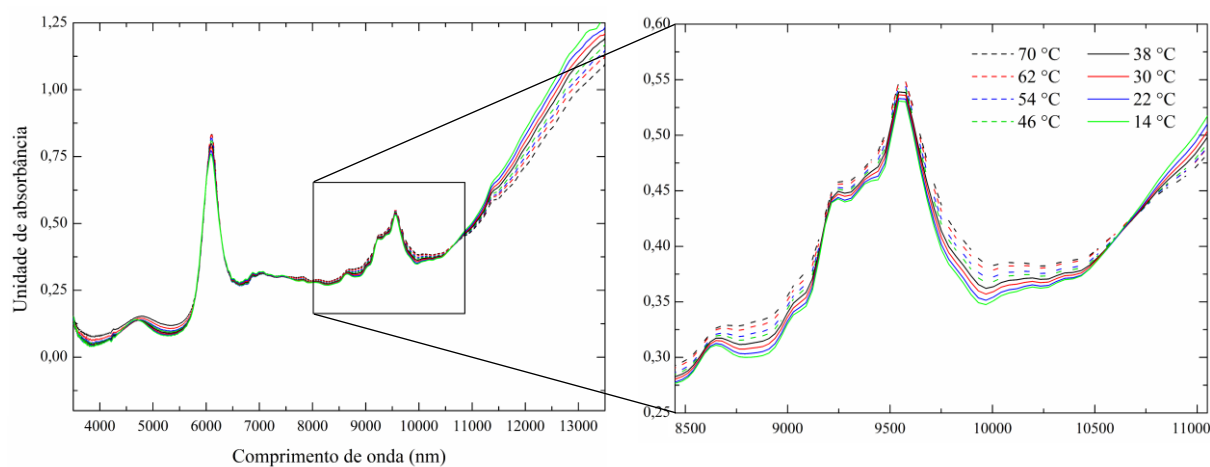
Figura 3.2 – Espectro no infravermelho médio da água destilada em diferentes temperaturas na região de absorção dos compostos fermentativos (8.470 a 10.990 nm): (a) SPD (sem pré-tratamento dos dados); (b) SMM+1ªD.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

A **Figura 3.3** mostra os espectros do sobrenadante adquiridos em diferentes temperaturas em uma ampla região do infravermelho médio (3500–13500 nm) e na região utilizada calibração (8000–11000 nm). Em relação aos modelos obtidos a partir dos dados para os compostos do sobrenadante de fermentação (modelos FS), a **Tabela 3.1** mostra o número ótimo de variáveis latentes (LV_{OT}), os valores correspondentes de RMSEP, RMSECV, RMSEC e o coeficiente de correlação (R^2) obtidos a partir do procedimento LOOCV para cada composto. Os altos valores de R^2 para os modelos indicam que eles proporcionaram excelentes ajustes aos dados. Para todos os compostos (com exceção da sacarose), os valores de RMSEP representaram menos de 2% dos intervalos de dados utilizados para calibração, mostrando bom desempenho dos modelos FS. O desempenho inferior da sacarose pode ser atribuído à interferência de ruído. Segundo Rodrigues *et al.* (2017), a concentração de sacarose deve ser superior a $3,0 \text{ g L}^{-1}$, para que seja possível distinguir o sinal do ruído. Portanto, como a faixa de concentração de sacarose utilizada na calibração foi de $0,0\text{--}3,42 \text{ g L}^{-1}$, a quantificação deste composto pode ter sofrido interferência.

Figura 3.3– Espectros FT-MIR do sobrenadante da fermentação alcoólica adquiridos em diferentes temperaturas na região de 3500–13500 nm. O quadrado destaca a região utilizada para calibração (8000–11000 nm).



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Tabela 3.1 – Análise de desempenho dos modelos FT-MIR/PLS para o sobrenadante de fermentação alcoólica (modelos FS). A fermentação foi realizada a 36 °C e as leituras foram adquiridas a 22 °C.

Compostos	LV _{OT} (-)	RMSECV (g L ⁻¹)	RMSEC (g L ⁻¹)	RMSEP (g L ⁻¹)	R ² (-)	Faixa (g L ⁻¹)
Sacarose	3	0,497	0,372	0,490	0,94	0 – 3,42
Glicose	4	0,694	0,412	0,567	0,998	0 – 33,56
Frutose	3	0,502	0,397	0,726	0,9990	0 – 61,66
Etanol	2	1,110	0,819	1,330	0,998	0 – 87,14
Glicerol	2	0,210	0,165	0,181	0,994	0 – 9,10

LV_{OT}: número ótimo de variáveis latentes; RMSEP: erro quadrático médio de predição; RMSECV: erro quadrático médio da validação cruzada; RMSEC: erro quadrático médio de calibração; R²: coeficiente de correlação entre dados de referência (CLAE) e preditos (modelos PLS).

A **Tabela 3.2** mostra o efeito da temperatura de aquisição do espectro na quantificação de sacarose, glicose, frutose, etanol e glicerol no sobrenadante de fermentação, utilizando os modelos FS. Com base nos valores do desvio padrão (RMSECV), o aumento da temperatura do sobrenadante (de 14 para 70 °C) levou a diferenças significativas entre os valores preditos e de referência para todos os compostos, com exceção do glicerol. Dentro da faixa de temperatura da fermentação alcoólica industrial (30–38 °C), foram observadas variações significativas apenas para a frutose (considerando o RMSECV). No entanto, é importante notar que uma diferença na predição (em valores absolutos) foi observada para todos os compostos. Em termos percentuais (diferença nas concentrações previstas entre 30 e 38 °C dividida pela média desses valores) essas variações foram 7,72 (sacarose), 1,41 (glicose), 2,10 (frutose), 1,01 (etanol) e 0,95% (glicerol). Claramente, os modelos foram sensíveis à mudança do espectro à medida que a temperatura variava. A variação na quantificação dos compostos foi significativa apenas para a frutose, pois sua concentração (62,16 g L⁻¹) foi muito superior aos valores utilizados para os demais compostos (sacarose: 2,32 g L⁻¹; glicose: 32,02 g L⁻¹; etanol: 44,20 g L⁻¹; glicerol: 5,37 g L⁻¹). Portanto, embora o erro do modelo (RMSECV) tenha a mesma ordem de grandeza para todos os compostos, apenas para a frutose, a variação da concentração prevista foi maior que o erro do modelo. Para superar esses efeitos térmicos, modelos de calibração foram construídos usando dados adquiridos em tempo real (*on-line*) durante fermentações em diferentes temperaturas, empregando a técnica de modelo combinado (CHAPANYA; RITTHIRUANGDEJ; MUEANGMONTRI, 2019; RATHORE *et al.*, 2007).

Tabela 3.2 – Efeitos da temperatura na quantificação dos compostos presentes no sobrenadante de fermentação usando os modelos de FS obtidos a 22 °C (temperatura de referência).

T (°C)	Sacarose (±0,50 g L ⁻¹)*	Glicose (±0,69 g L ⁻¹)*	Frutose (±0,50 g L ⁻¹)*	Etanol (±1,11 g L ⁻¹)*	Glicerol (±0,21 g L ⁻¹)*
14	2,14 ^a	31,60 ^a	63,60 ^a	44,46 ^a	5,40 ^a
22	2,32 ^a	32,02 ^{ab}	62,16 ^a	44,20 ^{ab}	5,37 ^a
30	2,49 ^a	32,42 ^{ab}	61,14 ^b	43,62 ^{ab}	5,31 ^a
38	2,69 ^{ab}	32,88 ^{ab}	59,87 ^c	43,18 ^{ab}	5,26 ^a
46	2,86 ^{ab}	33,17 ^b	58,61 ^d	42,61 ^{ab}	5,20 ^a
54	3,03 ^{ab}	33,35 ^b	56,82 ^e	42,03 ^b	5,14 ^a
62	3,18 ^{bc}	33,51 ^b	55,48 ^f	41,42 ^b	5,08 ^a
70	3,34 ^c	33,57 ^b	54,01 ^g	40,29 ^b	4,99 ^a

*Desvios padrão dos modelos (valores RMSECV) com nível de confiança de 95%. Em cada coluna, as medidas seguidas por pelo menos uma letra comum (a–g) não diferem umas das outras com base no RMSECV.

3.3.2. Processamento de dados de fermentações em batelada alimentada

As oscilações térmicas no processo industrial afetam a cinética da levedura, retardando ou acelerando o consumo de substrato (VELOSO *et al.*, 2019). Esse efeito, aliado à diluição do caldo de fermentação pela alimentação do mosto, altera a composição do caldo. Por exemplo, uma redução da temperatura leva a um consumo de substrato mais lento, resultando em seu acúmulo no caldo. Ao mesmo tempo, o etanol é formado mais lentamente, tornando-se mais diluído, devido à alimentação do mosto. Consequentemente, são obtidas diferentes combinações entre os substratos (sacarose, glicose e frutose) e produtos (etanol e glicerol). Para obter uma metodologia eficiente que possa monitorar com sucesso o processo de fermentação alcoólica em batelada alimentada, é necessária uma calibração robusta que abranja um amplo domínio de relações entre os principais compostos. Para isso, os dados das fermentações realizadas a 26, 28, 30, 32, 34 e 36 °C (conjunto de calibração: 77 amostras) foram usados para obter os modelos FT-MIR/PLS para monitoramento em tempo real do processo (modelos RM). Ressalta-se que a utilização de modelos obtidos com diferentes temperaturas também pode ajudar a minimizar os efeitos térmicos na quantificação dos compostos (**Tabela 3.2**).

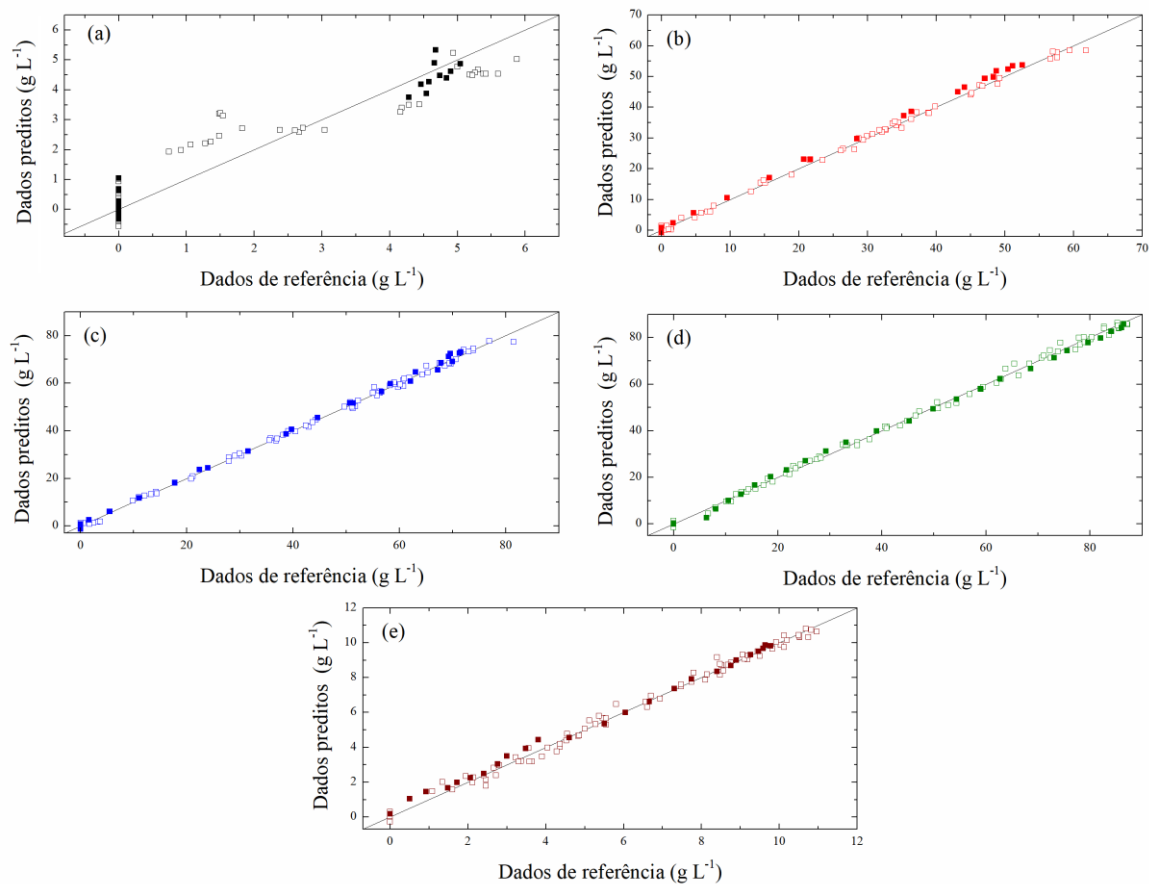
A **Tabela 3.3** mostra o desempenho do melhor modelo selecionado para cada composto. Os valores altos de R^2 e baixos RMSECV (abaixo de 3% da faixa de calibração, com exceção da sacarose) mostraram que os modelos apresentaram desempenho satisfatório. A fim de confirmar que a técnica LOOCV ainda resultaria em uma escolha confiável de LVs, mesmo para um conjunto de dados maior (77 amostras), foram verificadas validações cruzadas de *5-fold* (deixa 15 amostras para validação cruzada) e *10-fold* (deixa 7 amostras para validação cruzada) (ZHANG; YANG, 2015) para modelos RM. Os valores de RMSECV foram semelhantes e os números de LV_{OT} foram os mesmos para a técnica LOOCV e para a validação cruzada *k-fold* (dados não mostrados). O conjunto de validação foi composto pelos dados de fermentação com variação de temperatura (fermentação FV: 12 amostras para cada composto), que simularam o processo industrial. Os valores de RMSEP (**Tabela 3.3**) ficaram abaixo de 7,0% do intervalo de dados para sacarose (6,7%), glicose (3,1%), frutose (1,7%), etanol (1,7%) e glicerol (2,9%), indicando excelente habilidade de predição dos modelos. Conforme discutido anteriormente, a baixa intensidade de sinal da sacarose, que estava muito próxima do limite de distinção de ruído, pode ter contribuído para o desempenho inferior deste composto, em relação aos demais. A proximidade dos valores RMSEC e RMSEP indicou que os modelos de calibração mantiveram a capacidade de predição para amostras de validação externa (não utilizadas no conjunto de calibração). Os altos valores de RER ($>10,0$, exceto sacarose) e RPD ($>3,0$) indicam que os modelos apresentaram alto valor de utilidade (WILLIAMS, 1987) e excelente predição quantitativa (SAEYS; MOUAZEN; RAMON, 2005), respectivamente. A **Figura 3.4** mostra os gráficos de correlação das concentrações de referência dos compostos, determinadas por CLAE e os valores preditos a partir dos melhores modelos PLS, para validação cruzada e validação externa (fermentação FV).

Tabela 3.3 – Análise de desempenho dos modelos FT-MIR/PLS para monitoramento em tempo real (modelos RM) da fermentação alcoólica.

Compostos	LV_{OT}	RMSECV	RMSEC	RMSEP	R²	RER	RPD	Faixa
	(-)	(g L⁻¹)	(g L⁻¹)	(g L⁻¹)	(-)	(-)	(-)	(g L⁻¹)
Sacarose	4	0,749	0,659	0,426	0,922	5,49	11,83	0–5,88
Glicose	6	1,12	0,972	1,58	0,998	13,41	33,24	0–59,46
Frutose	7	1,26	1,10	1,25	0,998	20,45	57,28	0–81,44
Etanol	6	1,52	1,36	1,56	0,998	18,69	55,40	0–87,12
Glicerol	6	0,318	0,283	0,276	0,995	12,18	35,43	0–10,96

LV_{OT}: número ótimo de variáveis latentes; RMSEP: erro quadrático médio de predição; RMSECV: erro quadrático médio da validação cruzada estimado com nível de confiança de 95%; RMSEC: erro quadrático médio de calibração; R²: coeficiente de correlação entre dados de referência (CLAE) e preditos (modelos PLS).

Figura 3.4 – Valores preditos versus valores de referência para as concentrações de (a) sacarose, (b) glicose, (c) frutose, (d) etanol e (e) glicerol, para validação cruzada (símbolos vazios) e validação externa (símbolos fechados). As linhas representam correlações perfeitas.



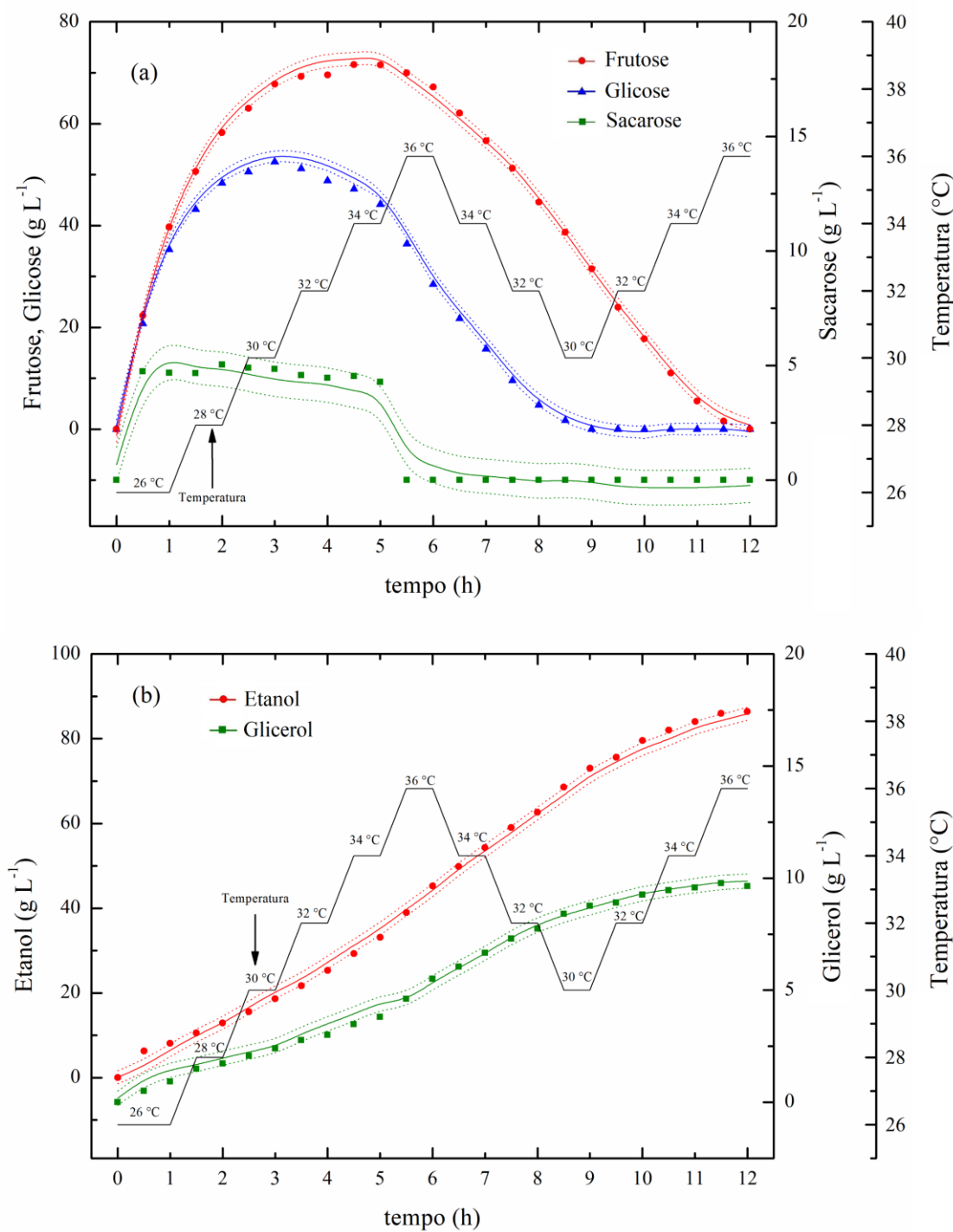
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Vários estudos recentes relataram o monitoramento em tempo real da fermentação alcoólica usando espectroscopia de infravermelho (IR) combinada com o método de calibração multivariada PLS. Nascimento *et al.* (2017) usaram NIR/PLS para monitoramento em tempo real de glicose, etanol e glicerol na fermentação alcoólica em batelada. Os autores obtiveram altos coeficientes de correlação de validação cruzada ($R^2_{\text{Glicose}} = 0,920$; $R^2_{\text{Etanol}} = 0,911$; $R^2_{\text{Glicerol}} = 0,970$) e baixos erros quadráticos médios de predição ($\text{RMSEP}_{\text{Glicose}} = 7,14 \text{ g L}^{-1}$; $\text{RMSEP}_{\text{Etanol}} = 2,36 \text{ g L}^{-1}$; $\text{RMSEP}_{\text{Glicerol}} = 0,116 \text{ g L}^{-1}$). Em outro trabalho, Schalk *et al.* (2017) utilizaram FT-MIR/PLS para monitoramento em tempo real da fermentação alcoólica em batelada, obtendo baixos valores de RMSEP para etanol ($0,61 \text{ g L}^{-1}$) e glicose ($4,34 \text{ g L}^{-1}$). No monitoramento em tempo real da fermentação em batelada alimentada usando FT-MIR/PLS, Rodrigues *et al.* (2017) relataram altos coeficientes de correlação de validação cruzada e baixos

valores de RMSEP para sacarose ($0,54 \text{ g L}^{-1}$), glicose ($1,02 \text{ g L}^{-1}$), frutose ($0,66 \text{ g L}^{-1}$), etanol ($1,93 \text{ g L}^{-1}$) e glicerol ($0,5 \text{ g L}^{-1}$). Estudos utilizando um modelo de calibração combinado (em diferentes temperaturas) para monitorar compostos presentes na fermentação alcoólica são escassos. Chapanya *et al.* (2019) utilizaram modelos de calibração combinados para quantificar açúcares (sacarose, glicose e frutose) em melaço a 25, 35 e 45 °C, mas não durante o processo fermentativo. Com exceção da sacarose, os autores obtiveram valores elevados de R^2 e valores de RMSEP abaixo de 10% da faixa de calibração. Os resultados dos parâmetros de desempenho obtidos no presente estudo (**Tabela 3.3**) corroboraram os valores obtidos nos estudos anteriores empregando a técnica IR/PLS.

A **Figura 3.5** mostra os resultados da aplicação da metodologia desenvolvida no monitoramento em tempo real das concentrações de sacarose, glicose, frutose, etanol e glicerol durante a fermentação alcoólica em batelada alimentada com flutuações de temperatura (fermentação FV). Para todos os compostos, houve similaridade entre os valores preditos pelos modelos e os dados de referência obtidos por CLAE. Assim, a técnica FT-MIR/PLS usando modelos obtidos de fermentações em diferentes temperaturas foi capaz de monitorar com precisão a fermentação alcoólica em batelada alimentada simulando uma condição próxima à industrial.

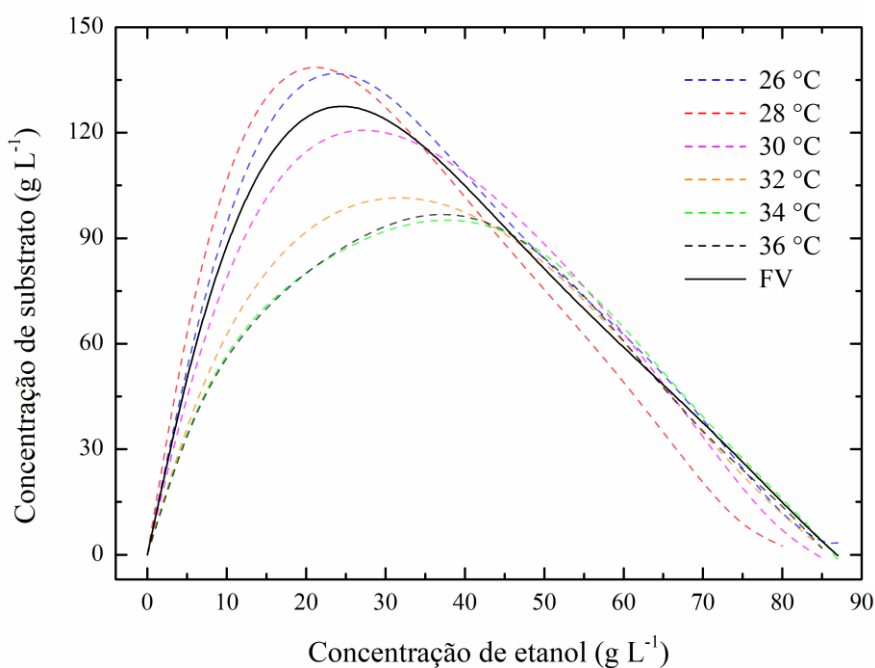
Figura 3.5 – Dados de concentrações obtidos pela técnica FT-MIR/PLS (linhas sólidas) e por CLAE (símbolos), durante a fermentação alcoólica em batelada alimentada com flutuações de temperatura: (a) sacarose, glicose e frutose; (b) etanol e glicerol. As linhas pontilhadas representam os valores de RMSECV (desvios-padrões dos modelos). O perfil de temperatura do caldo também é mostrado.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

A **Figura 3.6** mostra a relação entre as concentrações de substrato (ART) e etanol (produto principal) nas fermentações utilizadas para calibração e validação (FV). Como pode ser visto, os dados de calibração cobriram um amplo domínio e a fermentação FV estava dentro deste domínio. Ressalta-se que, no presente estudo, a flutuação da temperatura foi realizada em condições controladas. No processo industrial, a temperatura do caldo de fermentação varia de acordo com as condições climáticas, pois o processo utiliza água em circuito fechado, passando por uma torre de resfriamento antes de retornar aos trocadores de calor das dornas. A água utilizada no resfriamento do caldo é proveniente de sistemas de captação (rios e lagos). Portanto, várias condições de temperatura podem ocorrer nesse processo, principalmente desde o início da fermentação até o final da alimentação do mosto (fase exponencial de crescimento do microrganismo). Em dias muito quentes, a alta temperatura da água de resfriamento dificulta o controle da temperatura do caldo (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011). No entanto, mesmo com a possibilidade dessas diferentes situações, a ampla faixa de temperatura (26–36 °C) considerada no desenvolvimento da presente metodologia permite que ela seja aplicada para o monitoramento eficaz de uma fermentação alcoólica industrial com qualquer variação de temperatura nesta faixa.

Figura 3.6 – Relação entre concentrações de substrato (ART) e etanol nas fermentações utilizadas para calibração (temperaturas de 26 a 36 °C, linhas tracejadas) e validação (FV, linha contínua).



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

3.4. CONCLUSÕES

Neste capítulo, o efeito da temperatura na quantificação por FT-MIR dos principais compostos da fermentação alcoólica foi avaliado. Na faixa de temperatura de fermentação alcoólica (de 30 a 38 °C), diferenças significativas de concentração foram observadas apenas para a frutose. Modelos de calibração combinados FT-MIR/PLS foram desenvolvidos a partir de fermentações em diferentes temperaturas, a fim de poder monitorar a fermentação alcoólica em batelada alimentada levando em consideração as flutuações térmicas durante o processo. Os modelos foram eficazes para o monitoramento em tempo real dos principais compostos na fermentação alcoólica em batelada alimentada (sacarose, frutose, glicose, etanol e glicerol). Os parâmetros de análise mostraram desempenho satisfatório dos modelos para todos os compostos, com valores de RMSECV e RMSEP abaixo de 7% das faixas de dados de calibração, juntamente com altos valores de R^2 . Os resultados mostraram que a técnica FT-MIR/PLS aplicada com a metodologia proposta tem excelente potencial para ser usada no monitoramento em tempo real da fermentação alcoólica em batelada alimentada. Essa técnica pode ser utilizada em aplicações industriais, pois considera uma ampla gama de relações entre os principais compostos da fermentação alcoólica, resultantes das flutuações térmicas do processo, e possibilita a aquisição rápida de dados precisos. A utilização da técnica FT-MIR/PLS empregando modelos combinados para monitoramento em tempo real da fermentação alcoólica pode reduzir custos e tempo de análise, auxiliando na rápida tomada de decisão no controle do processo. Além disso, a metodologia desenvolvida pode ser utilizada em escala laboratorial, uma vez que não há alteração no volume do caldo devido à retirada de amostra. Isso é importante pois o volume é uma variável de processo que interfere nas condições operacionais.

Capítulo IV

**MODELAGEM MATEMÁTICA DA
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM BATELADA
ALIMENTADA CONSIDERANDO O VOLUME
OCUPADO PELAS CÉLULAS**

4.1. INTRODUÇÃO

Estudos de processos de fermentação alcoólica podem auxiliar no aprimoramento da produção industrial de etanol, utilizando modelos matemáticos como ferramentas valiosas para descrever a dinâmica do processo (RIVERA *et al.*, 2017; VELOSO *et al.*, 2019). A utilização de modelos matemáticos confiáveis e robustos na implementação de rotinas de otimização e controle da fermentação pode contribuir para reduções de custos operacionais e esforço experimental (ALVARADO; GARCIA, 2018). A modelagem matemática pode ser utilizada para simular diferentes condições de cultivo, como a implementação de diferentes modos de operação, possibilitando melhorias econômicas no processo (VELOSO *et al.*, 2019). No desenvolvimento de modelos matemáticos para processos fermentativos, os chamados modelos não intrínsecos consideram que o substrato e o etanol estão presentes em todo o volume do reator, uma vez que o volume ocupado pelas células é desprezado na modelagem (MONBOUQUETTE, 1992, 1987). Em contrapartida, modelos intrínsecos consideram que o substrato e o etanol estão presentes apenas no volume correspondente à fase abiótica (fora das células), levando em consideração o volume ocupado pelas células (JARZĘBSKI; MALINOWSKI; GOMA, 1989; MONBOUQUETTE, 1992, 1987). Além disso, as concentrações de substrato e etanol (C_S e C_E , respectivamente) que são utilizadas na modelagem da fermentação alcoólica são obtidas experimentalmente a partir da fase abiótica (fase líquida – sobrenadante do caldo de fermentação). Conseqüentemente, pode haver um erro associado quando modelos não intrínsecos são usados para representar os dados experimentais. De acordo com Monbouquette (1987), cultivos em condições de alta densidade celular (HCD, do inglês *high cell density*) em que a fração volumétrica ocupada pelo microrganismo é alta (>10%), os balanços de massa devem ser desenvolvidos considerando a massa de substrato e etanol contido apenas na fase abiótica (modelos intrínsecos).

Alguns estudos relatados na literatura compararam a capacidade preditiva de modelos intrínsecos e não intrínsecos para fermentação alcoólica operando em modo contínuo sob condição de HCD (JARZĘBSKI; MALINOWSKI; GOMA, 1989; MONBOUQUETTE, 1992, 1987; WARREN; HILL; MACDONALD, 1990) que é comumente usada para aumentar a produtividade volumétrica em etanol. Outros trabalhos abordaram os efeitos do volume ocupado pelas células no cálculo dos coeficientes de rendimento de substrato para etanol ($Y_{E/S}$) e células ($Y_{X/S}$) (BERMEJO *et al.*, 2021; BORZANI, 1983; PEREIRA *et al.*, 2018), utilizados

na modelagem de processos fermentativos e em cálculos de eficiência fermentativa, mostrando uma diferença significativa nos valores obtidos em condições de HCD. Portanto, a aplicação de modelos não intrínsecos em fermentação alcoólica em modo contínuo com alta concentração de células pode levar a erros grosseiros nos cálculos das concentrações de substrato e etanol, resultando em erros de projeto desastrosos (MONBOUQUETTE, 1992, 1987) bem como em problemas com algoritmos de controle (ALVARADO; GARCIA, 2018). No entanto, até onde sabemos, não houve investigação anterior da aplicação de modelos intrínsecos para fermentação alcoólica em batelada alimentada, que é o modo de operação mais utilizado para produção de etanol a partir de sacarose no Brasil, o segundo maior produtor de etanol do mundo.

A fermentação alcoólica em batelada alimentada começa com alta concentração de células, que diminui devido à adição de mosto. Portanto, durante a fase de enchimento da dorna, a fração volumétrica ocupada pelas células pode não ser desprezível a ponto de ser desconsiderada no balanço de massa. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi desenvolver um modelo intrínseco para fermentação alcoólica em batelada e batelada alimentada sob condições de VHG e HCD, bem como avaliar o efeito do volume na estimativa dos parâmetros cinéticos. Uma fermentação em batelada com alta densidade celular foi modelada usando modelos intrínsecos e não intrínsecos (modelo clássico usado para comparação). A fermentação alcoólica em batelada alimentada foi simulada para avaliar a capacidade preditiva do modelo neste modo de operação, em que a fração volumétrica de células é maior que a fração da fermentação em batelada. Finalmente, uma fermentação VHG em batelada alimentada foi realizada para avaliar o desempenho do modelo sob condições de alta concentração de substrato e etanol.

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. Ensaio experimentais

As fermentações foram realizadas (em duplicata) a 30 °C em um biorreator de 2 L composto por uma seção superior de vidro borossilicato e uma base inferior de aço inoxidável encamisada (47,7 cm de altura total, 30,3 cm de altura do líquido e 9,2 cm de diâmetro interno). Foram empregados dois modos de operação, batelada (B) e batelada alimentada (BA), com alta densidade celular da levedura liofilizada *S. cerevisiae* Y-904 e 400 g de sacarose comercial (421 g de açúcares redutores totais, ART), resultando em concentrações de células e substrato no biorreator próximas às comumente usadas no processo industrial (PEREIRA *et al.*, 2018).

Também foi realizada uma fermentação VHG em batelada alimentada (BA-VHG), com 500 g de sacarose (526 g de ART). Primeiramente, a levedura liofilizada (60 g) foi hidratada em 0,6 L de água destilada (inóculo, correspondente a 30% do volume de trabalho) por 20 min, sob agitação a 250 rpm utilizando um sistema motor/impelidor (Gehaka, AM-20). Nas fermentações em batelada, o mosto (1,4 L) foi misturado instantaneamente com o inóculo, enquanto nas fermentações em batelada alimentada esse volume foi adicionado a uma vazão volumétrica constante (F). Além da sacarose, o 1,4 L de mosto continha KH_2PO_4 (13,44 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (3,4 g), extrato de levedura (16,4 g) e ureia (12,7 g), simulando a composição do melaço de cana-de-açúcar utilizado em destilarias. O pH do mosto foi ajustado para 4,6 com adição de solução de ácido clorídrico 1,0 M. A temperatura do caldo foi mantida a 30 °C por meio de banho termostático (SL-152, Solab) e monitorada por um termômetro digital (MT 512, Full Gauge). A **Tabela 4.1** mostra as condições de operação para cada fermentação realizada neste trabalho.

Tabela 4.1 – Condições experimentais para as fermentações em batelada (B), batelada alimentada (BA) e batelada alimentada VHG (BA-VHG).

Fermentação	C_{X0} (g L ⁻¹)	C_{S0} (g L ⁻¹)	C_{Sm} (g L ⁻¹)	F (L h ⁻¹)	V_0 (L)	V_{X0} (L)	V_{X0}/V_0 (%)
B	30,0	210,0	0	0	2,0	0,19	9,5
BA	100,0	0	300,0	0,280	0,6	0,19	31,5
BA-VHG	100,0	0	375,0	0,200	0,6	0,19	31,5

C_{X0} e C_{S0} : concentrações iniciais de células totais e substrato (g L⁻¹); C_{Sm} : concentração de substrato no mosto (g L⁻¹); F : vazão de alimentação do mosto (L h⁻¹); V_0 e V_{X0} : volume inicial do inóculo e volume inicial de células (L), respectivamente. Em todas as fermentações, a concentração inicial de etanol foi igual a zero ($C_{E0} = 0$ g L⁻¹).

4.2.2. Metodologia analítica

Amostras de 2 mL foram retiradas a cada hora da fermentação e centrifugadas a 10.414 × g e 4 °C por 10 min. As concentrações de sacarose, glicose, frutose e etanol na fase abiótica foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (Modelo 717plus Autosampler, Waters, EUA) equipada com detector de índice de refração (Modelo 2414, Waters, EUA) operado a 40 °C e uma coluna Sugar-Pak I (300 × 6,5 mm, 10 μm, Waters) mantida a 80 °C (PEREIRA *et al.*, 2018). Uma solução de água ultrapura contendo 50 mg L⁻¹ de EDTA de cálcio (hidrato de etilenodiaminotetraacetato de cálcio dissódico) foi usada como eluente a uma vazão de 0,50 mL min⁻¹. Reagentes analíticos puros de sacarose, glicose, frutose e etanol foram

utilizados para a preparação de soluções padrão, em concentrações entre 0,1 e 8,0 g L⁻¹. A fase biótica foi seca a 60 °C e a massa de sedimento seco foi pesada para obter a concentração total de células. A viabilidade celular foi determinada pelo método do azul de metileno (LEE; ROBINSON; WANG, 1981).

4.2.3. Desenvolvimento dos modelos

Os modelos intrínsecos e não intrínsecos foram desenvolvidos a partir do balanço de massa total (Equação 4.1) e dos balanços de massa para células totais (Equação 4.2), células viáveis (Equação 4.3), substrato (Equação 4.4) e etanol (Equação 4.5).

$$\frac{dm_T}{dt} = \rho_M \cdot F \quad (4.1)$$

$$\frac{dm_X}{dt} = \mu \cdot C_{VX} \cdot V \quad (4.2)$$

$$\frac{dm_{VX}}{dt} = \mu \cdot C_{VX} \cdot V \quad (4.3)$$

$$\frac{dm_S}{dt} = C_{Sm} \cdot F - \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \mu \cdot C_{VX} \cdot V \quad (4.4)$$

$$\frac{dm_E}{dt} = \frac{Y_{E/S}}{Y_{X/S}} \cdot \mu \cdot C_{VX} \cdot V \quad (4.5)$$

em que ρ_M é a densidade do mosto (g L⁻¹), F é a vazão de alimentação do mosto (L h⁻¹), μ é a velocidade específica de crescimento celular (h⁻¹), C_{VX} é a concentração de células viáveis (g L⁻¹), V é o volume de caldo (L), C_{Sm} é a concentração de substrato no mosto (g L⁻¹), $Y_{X/S}$ é o coeficiente de rendimento de substrato a células (g_X g_S⁻¹) e $Y_{E/S}$ é o coeficiente de rendimento de substrato a etanol (g_E g_S⁻¹).

O balanço de massa global e os balanços de massa para as células totais e viáveis durante a fermentação considerando $m_T = \rho_M \cdot V$, $m_X = C_X \cdot V$ e $m_{VX} = C_{VX} \cdot V$, resultam nas Equações 4.6, 4.7 e 4.8 (RIVERA *et al.*, 2017; SONEGO *et al.*, 2018; VELOSO *et al.*, 2019). Na modelagem da fermentação em batelada foi considerado $F=0$, pois o mosto foi misturado instantaneamente com o inóculo.

$$\frac{dC_X}{dt} = \mu \cdot C_{VX} - \frac{F}{V} \cdot C_X \quad (4.6)$$

$$\frac{dC_{VX}}{dt} = \mu \cdot C_{VX} - \frac{F}{V} \cdot C_{VX} \quad (4.7)$$

$$\frac{dV}{dt} = F \quad (4.8)$$

em que C_X é a concentração celular total (g L^{-1}).

O desenvolvimento dos balanços de massa para substrato e etanol (Equações 4.4 e 4.5, respectivamente) depende da definição do volume adotado como base para o cálculo das respectivas massas. O modelo não intrínseco (Modelo 1) considera a massa de etanol e substrato nas fases biótica (células) e abiótica (fase líquida), ou seja, em todo o volume de trabalho. Assim, as massas de etanol ($m_{E(1)}$) e substrato ($m_{S(1)}$) são calculadas a partir da concentração de substrato e etanol considerando todo o volume do biorreator (V) conforme as equações abaixo.

$$m_{S(1)} = C_S \cdot V \quad (4.9)$$

$$m_{E(1)} = C_E \cdot V \quad (4.10)$$

em que o subscrito (1) refere-se ao Modelo 1 (modelo não intrínseco), C_S é a concentração de substrato limitante (ART) (g L^{-1}) e C_E é a concentração de etanol (g L^{-1}).

As substituições das Equações 4.9 e 4.10 nas Equações 4.4 e 4.5, respectivamente, resultam nas Equações 4.11 e 4.12:

$$\left(\frac{dC_S}{dt}\right)_1 = (C_{Sm} - C_S) \cdot \frac{F}{V} - \frac{1}{Y_{X/S(1)}} \cdot \mu \cdot C_{VX} \quad (4.11)$$

$$\left(\frac{dC_E}{dt}\right)_1 = \frac{Y_{E/S(1)}}{Y_{X/S(1)}} \cdot \mu \cdot C_{VX} - \frac{F}{V} \cdot C_E \quad (4.12)$$

No modelo não intrínseco, os rendimentos de substrato a etanol ($Y_{E/S(1)}$) e células ($Y_{X/S(1)}$) são dados por:

$$Y_{X/S(1)} = \frac{C_{Xf} \cdot V_f - C_{X0} \cdot V_0}{V_M \cdot C_{Sm} + C_{S0} \cdot V_0 - C_{Sf} \cdot V_f} \quad (4.13)$$

$$Y_{E/S(1)} = \frac{C_{E_f} \cdot V_f - C_{E_0} \cdot V_0}{V_M \cdot C_{S_m} + C_{S_0} \cdot V_0 - C_{S_f} \cdot V_f} \quad (4.14)$$

em que V_M é o volume do mosto (L) e os subscritos “0” e “f” referem-se aos tempos inicial e final do processo, respectivamente.

No modelo intrínseco (Modelo 2), o volume utilizado para calcular a massa de substrato (V_S) no caldo de fermentação foi obtido subtraindo-se o volume biótico (V_B) do volume total (V) (Equação 4.15). Para o volume utilizado no cálculo da massa de etanol (V_E) produzida, também foi considerado o volume intracelular parcial (V_I) de etanol (MONBOUQUETTE, 1992) (Equação 4.16):

$$V_S = V - V_B = V - V \cdot C_X / \rho_B \quad (4.15)$$

$$V_E = V - V_B + V_I = V - V \cdot C_X / \rho_B + V \cdot \gamma_E \cdot C_X / \rho_B \quad (4.16)$$

em que ρ_B é a densidade da levedura em gramas de massa seca por unidade de volume de célula úmida (g L^{-1}) e γ_E é o coeficiente de partição de equilíbrio para o etanol (adimensional). Valores de $\rho_B=390 \text{ g L}^{-1}$ e $\gamma_E=0,78$ foram obtidos da literatura (MONBOUQUETTE, 1992, 1987).

Assim, $m_{S(2)}$ e $m_{E(2)}$ foram calculados de acordo com as seguintes equações:

$$m_{S(2)} = C_S \cdot V_S = C_S \cdot V \cdot (1 - C_X / \rho_B) \quad (4.17)$$

$$m_{E(2)} = C_E \cdot V_E = C_E \cdot V \cdot (1 + (\gamma_E - 1) \cdot C_X / \rho_B) \quad (4.18)$$

em que o subscrito (2) se refere ao Modelo 2 (modelo intrínseco).

As massas de substrato e etanol (Equações 4.17 e 4.18, respectivamente) foram substituídas nos balanços de massa de substrato e etanol (Equações 4.4 e 4.5, respectivamente), resultando nas Equações 4.19 e 4.20.

$$\left(\frac{dC_S}{dt}\right)_2 = \frac{(C_{S_m} - C_S) \cdot F/V + \mu C_{VX} \cdot (C_S / \rho_B - 1/Y_{X/S(2)})}{(1 - C_X / \rho_B)} \quad (4.19)$$

$$\left(\frac{dC_E}{dt}\right)_2 = \frac{((Y_{X/S(2)}/Y_{E/S(2)}) + C_E \cdot (1 - \gamma_E) / \rho_B) \cdot \mu C_{VX} - (F/V) \cdot C_E}{(1 + (\gamma_E - 1) \cdot C_X / \rho_B)} \quad (4.20)$$

Os coeficientes $Y_{X/S(2)}$ e $Y_{E/S(2)}$ foram calculados usando as Equações 4.21 e 4.22, respectivamente (BORZANI, 2008).

$$Y_{X/S(2)} = \frac{C_{Xf} \cdot V_f - C_{X0} \cdot V_0}{V_M \cdot C_{Sm} + C_{S0} \cdot V_0 \cdot (1 - C_{X0}/\rho_B) - C_{Sf} \cdot V_f \cdot (1 - C_{Xf}/\rho_B)} \quad (4.21)$$

$$Y_{E/S(2)} = \frac{C_{Ef} \cdot V_f \cdot (1 + (\gamma_E - 1) \cdot C_{Xf}/\rho_B) - C_{E0} \cdot V_0 \cdot (1 + (\gamma_E - 1) \cdot C_{X0}/\rho_B)}{V_M \cdot C_{Sm} + C_{S0} \cdot V_0 \cdot (1 - C_{X0}/\rho_B) - C_{Sf} \cdot V_f \cdot (1 - C_{Xf}/\rho_B)} \quad (4.22)$$

O crescimento celular nas fermentações B e BA foi descrito pelo modelo de Andrews (1968), que adiciona um termo de inibição de substrato (o primeiro termo entre colchetes na Equação 4.23) ao modelo de Monod (1949). Para descrever o crescimento celular nas fermentações BA-VHG, também foi considerado o termo de inibição do produto descrito pelo modelo Levenspiel (1980) (o segundo termo entre colchetes na Equação 4.23).

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S + \left[\frac{C_S^2}{K_{IS}} \right]} \cdot \left[\left(1 - \frac{C_E}{C_{Emax}} \right)^n \right] \quad (4.23)$$

em que μ_{max} é a velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1}), K_S é a constante de saturação ($g L^{-1}$), K_{IS} é a constante de inibição pelo substrato ($g L^{-1}$), C_{Emax} é a concentração de etanol que causa a interrupção do crescimento celular ($g L^{-1}$) e n é um parâmetro adimensional que pondera a inibição pelo etanol.

O modelo não intrínseco (Modelo 1 – Equações 4.6–4.8, 4.11 e 4.12), foi utilizado para comparação com o modelo intrínseco (Modelo 2 – Equações 4.6–4.8, 4.19 e 4.20) desenvolvido neste trabalho, pois é comumente empregado na modelagem da fermentação alcoólica em batelada alimentada a partir de sacarose (RIVERA *et al.*, 2017; SONEGO *et al.*, 2018; VELOSO *et al.*, 2019).

4.2.4. Estimativa dos parâmetros e validação do modelo

A modelagem e simulação foram realizadas no *software* Scilab 6.0.1. O algoritmo de Runge-Kutta foi empregado para a solução numérica do sistema de equações diferenciais, e os parâmetros cinéticos do modelo de Andrews-Levenspiel (μ_{max} , K_S , K_{IS} , C_{Emax} e n) foram estimados por meio de um algoritmo genético (AG). Este algoritmo avalia a capacidade de uma

coleção de estimativas de parâmetros para a aptidão em resolver a tarefa de minimização dada. Segundo Yao e Sethares (1994) o AG é um tipo de busca “aleatória” estruturada que imita o processo de evolução biológica, em que a cada geração (passo de tempo do algoritmo), os cromossomos mais aptos podem cruzar e dar origem a descendentes (novo parâmetro estimados), que formam a base para a próxima geração. No presente trabalho foi utilizado o AG com 10 gerações e o método dos mínimos quadrados foi utilizado para encontrar o melhor ajuste entre os dados calculados e experimentais.

Duas abordagens foram utilizadas para comparar modelos intrínsecos e não intrínsecos. A abordagem qualitativa baseou-se na realização de inspeção visual. Enquanto a abordagem quantitativa reduz a medida de qualidade a um único número, por meio de índices estatísticos (MURRAY-SMITH, 1998). Para as simulações BA e BA-VHG, o desvio padrão residual (RSD, do inglês *residual standard deviation*), o coeficiente de desigualdade de Theil (TIC, do inglês *Theil's inequality coefficient*), o erro quadrático médio (RMSE, do inglês *root mean square error*) e o erro relativo (REL, do inglês *relative error*) foram os critérios estatísticos utilizados para avaliar a capacidade preditiva do modelo (abordagem quantitativa), conforme mostrado nas Equações 4.24, 4.25, 4.26 e 4.27, respectivamente (ALVARADO; GARCIA, 2018; ATALA, 2001; HVALA *et al.*, 2005).

$$RSD(\%) = \frac{\sqrt{\frac{1}{N_p} \sum_{k=1}^{N_p} (c_k - \hat{c}_k)^2}}{\bar{c}} \times 100 \quad (4.24)$$

$$TIC = \frac{\sqrt{\sum_{k=1}^{N_p} (c_k - \hat{c}_k)^2}}{\sqrt{\sum_{k=1}^{N_p} (c_k)^2 + \sum_{k=1}^{N_p} (\hat{c}_k)^2}} \quad (4.25)$$

$$RMSE = \frac{\sqrt{\sum_{k=1}^{N_p} (c_k - \hat{c}_k)^2}}{N_p} \quad (4.26)$$

$$REL = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^{N_p} ((c_k - \hat{c}_k)^2 / c_k^2)}{N_p}} \quad (4.27)$$

em que N_p é o número de dados experimentais coletados em cada ensaio, c_k e \hat{c}_k são os dados experimentais e preditos para a k-ésima amostra e \bar{c} é a média dos dados experimentais.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Estimativa de parâmetros cinéticos na fermentação alcoólica

A **Tabela 4.2** mostra os parâmetros de rendimento obtidos para os processos em batelada (B) e batelada alimentada (BA), juntamente com os parâmetros cinéticos estimados a partir da fermentação em batelada usando os modelos não intrínseco e intrínseco. Diferentes valores de $Y_{X/S}$ e $Y_{E/S}$ foram obtidos para os modelos intrínseco e não intrínseco, devido à menor quantidade de substrato considerada pelo modelo intrínseco (BORZANI, 2008). Os parâmetros cinéticos do modelo de Andrews (1968) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

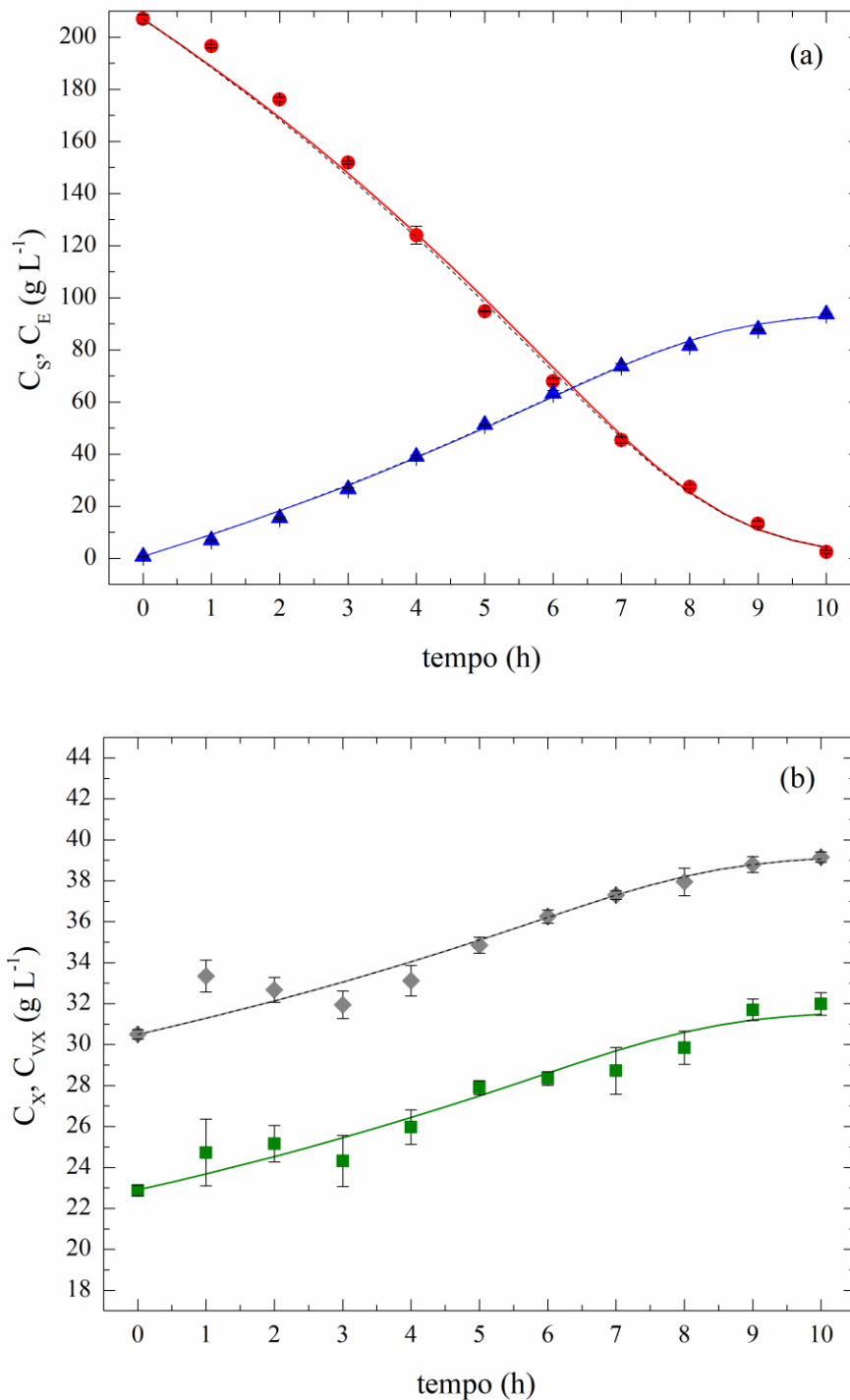
Tabela 4.2 – Parâmetros cinéticos e de rendimentos obtidos para os processos em batelada (B) e batelada alimentada (BA), utilizando os modelos intrínseco e não intrínseco.

Modo de operação	Tipo de modelo	μ_{\max}^* (h ⁻¹)	K_S^* (g L ⁻¹)	K_{IS}^* (g L ⁻¹)	$Y_{E/S}$ (g _E g _S ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (g _X g _S ⁻¹)
B	Não intrínseco	0,100± 0,001	71,3± 5,1	122,1± 5,0	0,455±0,004	0,0423±0,0001
B	Intrínseco	0,100± 0,001	70,7± 5,0	123,8±4,9	0,482±0,003	0,0459±0,0002
BA	Não intrínseco	0,100± 0,001	71,3± 5,1	123,8± 4,9	0,469±0,004	0,0410±0,0001
BA	Intrínseco	0,100± 0,001	70,7± 5,0	123,8± 4,9	0,457±0,003	0,0410±0,0002

*Estimados usando um nível de confiança de 95% (teste t de Student).

A **Figura 4.1** mostra os ajustes dos modelos intrínsecos e não intrínsecos para a fermentação em batelada. Pode-se observar que ambos os modelos forneceram ajustes satisfatórios aos dados experimentais. Devido à baixa fração de volume celular ($V_{X0}/V_0 = 9,5\%$) para um processo em batelada, pode-se observar que o modelo não intrínseco foi capaz de modelar a fermentação alcoólica com alto nível de concordância com os dados experimentais. Portanto, neste caso, o uso do modelo intrínseco não apresentou melhora na predição do comportamento dinâmico da fermentação alcoólica, comparado ao modelo clássico não intrínseco, corroborando os resultados de Monbouquette (1987).

Figura 4.1 – Perfis de concentrações simulados (linhas) e experimentais (símbolos) para fermentação em batelada (B): (a) substrato (círculos) e etanol (triângulos); (b) células totais (losangos) e células viáveis (quadrados). As linhas sólidas e tracejadas representam os resultados dos modelos intrínsecos e não intrínsecos, respectivamente. As barras verticais representam os desvios padrão para cada ponto.

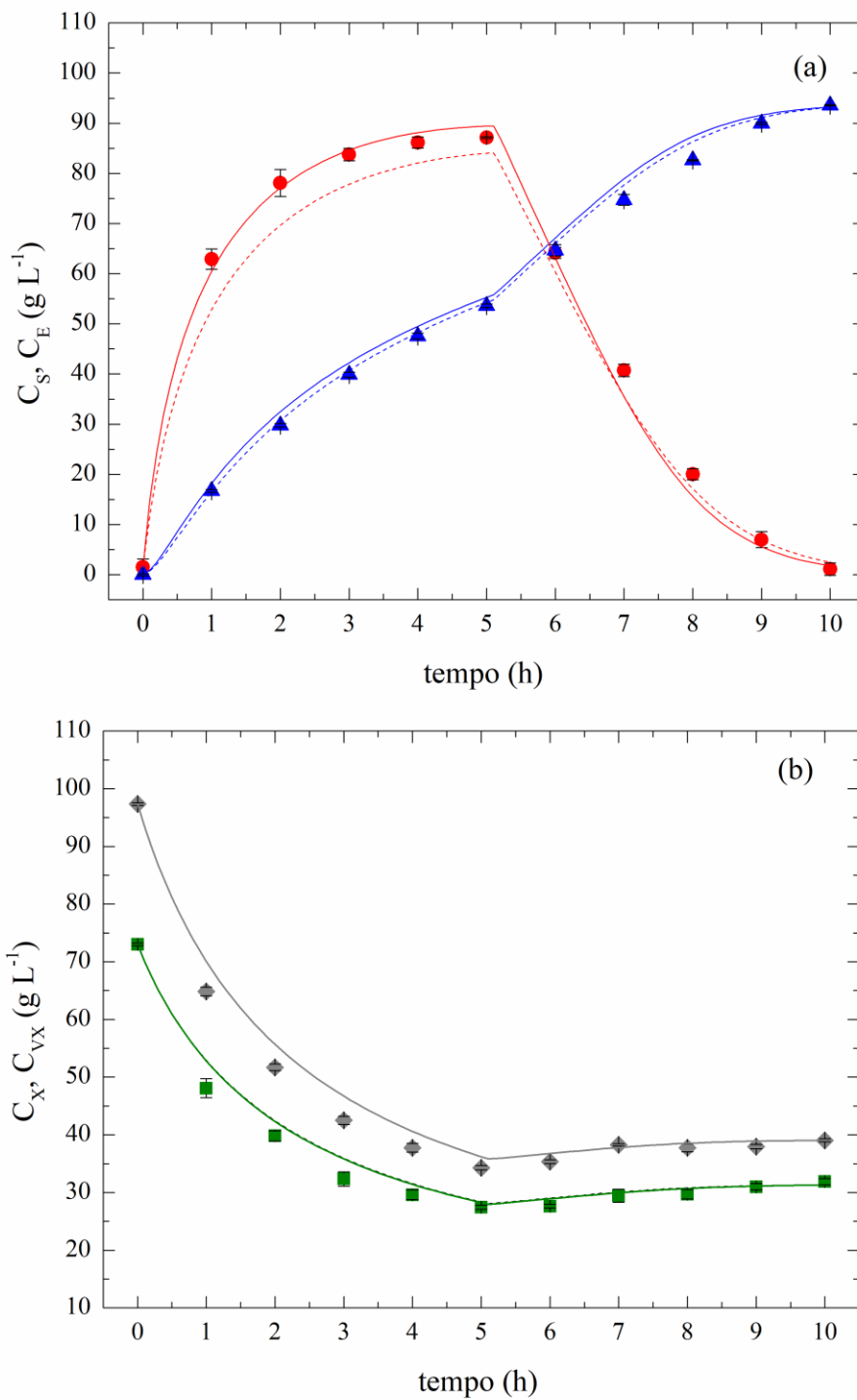


Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.3.2. Simulação da fermentação alcoólica em batelada alimentada

No estudo cinético da fermentação alcoólica, é usual estimar os parâmetros cinéticos a partir de cultivos operando em modo batelada. A utilização destes parâmetros permite simular diferentes condições e modos de processo (RIVERA *et al.*, 2017; VELOSO *et al.*, 2019). Portanto, simulações do processo em batelada alimentada (BA) foram realizadas usando os parâmetros cinéticos obtidos a partir do processo batelada e os parâmetros de rendimento mostrados na **Tabela 4.2**. A **Figura 4.2** mostra os perfis de concentrações experimentais e simulados para a fermentação BA. Pode-se observar que durante a alimentação do mosto (até 5 h), a concentração celular total variou de 100,0 a 35,0 g L⁻¹, semelhante ao processo industrial (PEREIRA *et al.*, 2018). Portanto, a relação V_X/V diminuiu de 31,5 para 11%. O modelo não intrínseco não foi capaz de representar satisfatoriamente o perfil do substrato durante a fase de alimentação, pois este modelo calcula a massa do substrato com base no volume total do reator, resultando em concentrações de substrato simuladas menores que os valores experimentais. Segundo Monbouquette (1992), os modelos não intrínsecos consideram incorretamente que há substrato dentro das células, uma vez que o substrato é consumido ao entrar na célula. Assim, para uma melhor modelagem do processo com alta densidade celular ($V_X/V > 10\%$), o volume celular deve ser desconsiderado no balanço de massa do substrato (baseado apenas no volume abiótico). Em relação ao produto (etanol), os modelos intrínseco e não intrínseco foram capazes de prever satisfatoriamente o comportamento da concentração durante o processo de fermentação. Embora o modelo intrínseco tenha calculado a massa de etanol considerando tanto o volume da fase abiótica quanto o volume intracelular, as previsões dos modelos não diferiram significativamente, pois ambos utilizaram coeficientes de rendimento global ($Y_{E/S}$) para prever o etanol total produzido a partir de o número de células geradas, empregando a razão $Y_{X/S}/Y_{E/S}$ (Equações 4.12 e 4.20). Portanto, o cálculo de $Y_{E/S}$ considerando o etanol presente no interior das células foi importante não só para a obtenção da eficiência da fermentação alcoólica (BERMEJO *et al.*, 2021; BORZANI, 2008; PEREIRA *et al.*, 2018), mas também para a modelagem do processo de alta densidade celular.

Figura 4.2 – Perfis de concentrações simulados (linhas) e experimentais (pontos) na fermentação em batelada alimentada (BA): (a) substrato (círculos) e etanol (triângulos) e (b) células totais (losangos) e células viáveis (quadrados). As linhas sólidas e tracejadas representam os resultados dos modelos intrínsecos e não intrínsecos, respectivamente. As barras verticais representam os desvios padrão para cada ponto.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.3.3. Modelagem da fermentação VHG em batelada alimentada

A fermentação com elevada concentração de substrato no mosto (VHG) é uma estratégia estabelecida para obter altas concentrações de etanol (PULIGUNDLA *et al.*, 2011). Nas fermentações VHG em batelada alimentada, o mosto contém maiores concentrações de substrato, portanto, tempos de enchimento mais longos devem ser usados para mitigar a inibição pelo substrato (VELOSO *et al.*, 2019). Consequentemente, nesse processo, a concentração celular permanece elevada por mais tempo, pois a taxa de diluição é mais lenta. Portanto, o processo BA-VHG foi modelado usando o modelo cinético de Andrews-Levenspiel para descrever o crescimento celular, devido à inibição da levedura pelo etanol. Os parâmetros do modelo Andrews (1968) foram os mesmos estimados em batelada (**Tabela 4.2**), enquanto $C_{E_{max}}$ e n foram obtidos pela rotina de estimativa de parâmetros. Os resultados são apresentados na **Tabela 4.3**, juntamente com os parâmetros de rendimento. Os parâmetros cinéticos estimados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. A **Figura 4.3** mostra os perfis de concentrações experimentais e simulados para a fermentação BA-VHG. Pela abordagem qualitativa, os modelos intrínseco e não intrínseco forneceram boas previsões para C_X , C_{VX} e C_E , enquanto para C_S , o modelo intrínseco forneceu uma melhor previsão.

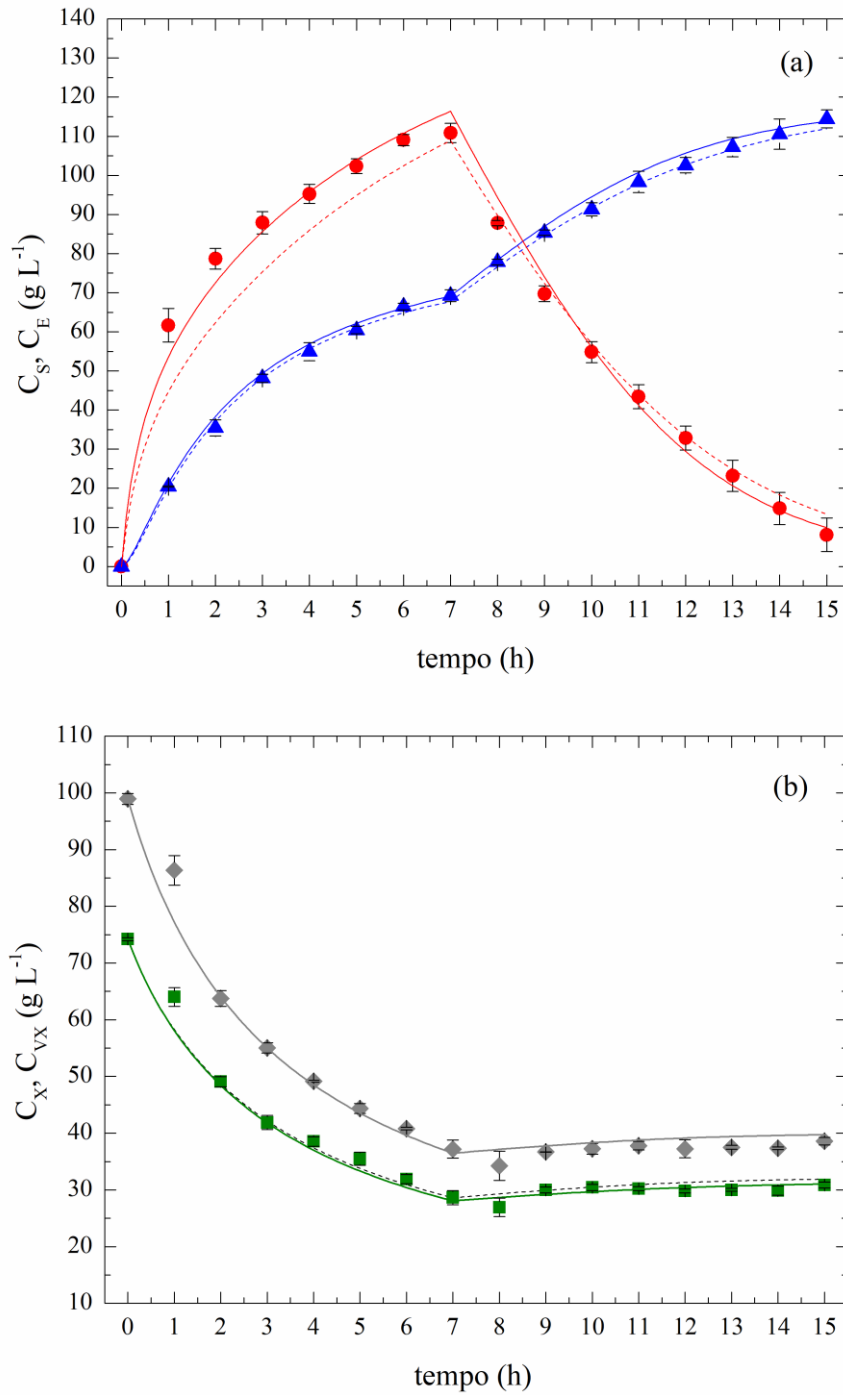
Tabela 4.3 – Parâmetros cinéticos e de rendimentos obtidos para a fermentação VHG em batelada alimentada (BA-VHG), usando os modelos intrínseco e não intrínseco.

Fermentação	Tipo de modelo	$C_{E_{max}}^*$ (g L ⁻¹)	n^* (-)	$Y_{E/S}$ (g _E g _S ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (g _X g _S ⁻¹)
BA-VHG	Não intrínseco	128,9±4,36	0,755±0,032	0,462±0,001	0,031±0,0011
BA-VHG	Intrínseco	129,8±3,74	0,727±0,036	0,451±0,003	0,031±0,0010

*Estimados usando um nível de confiança de 95% (teste t de Student).

Jarzębski, Malinowski e Goma (1989) observaram que em fermentações contínuas com reciclo celular, ambos os modelos (intrínseco e não intrínseco) apresentaram os mesmos resultados. Esses resultados diferem dos aqui apresentados porque o presente trabalho trata de um modo de operação específico para obtenção de etanol de cana-de-açúcar. No processo contínuo, a concentração de substrato é alta no início e baixa no estado estacionário, enquanto a concentração celular é baixa no início e aumenta seu valor ao longo do processo até atingir o estado estacionário. No processo em batelada alimentada, C_S é baixa no início (aumenta com a adição do mosto) e C_X é alta no início, diminuindo com a adição do mosto. Portanto, durante a fase de alimentação da fermentação em batelada alimentada, quando os valores de C_X e C_S são altos, a diferença entre os modelos torna-se mais pronunciada.

Figura 4.3 – Perfis de concentração simulados (linhas) e experimentais (pontos) para a fermentação VHG em batelada alimentada (BA-VHG): (a) substrato (círculos) e etanol (triângulos); (b) células totais (losangos) e células viáveis (quadrados). As linhas sólidas e tracejadas representam os resultados dos modelos intrínsecos e não intrínsecos, respectivamente. As barras verticais representam os desvios padrão para cada ponto.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.3.4. Comparações de índices estatísticos

Como a concentração do substrato apresentou maior diferença pela abordagem qualitativa, a abordagem quantitativa foi aplicada apenas na predição de C_5 . A **Tabela 4.4** mostra os índices estatísticos para o substrato utilizados para avaliar os modelos intrínsecos e não intrínsecos nas fermentações BA e BA-VHG. Quanto menores os valores de RMSE, REL, RSD e TIC, melhor a concordância entre os dados medidos e calculados (HVALA *et al.*, 2005). Pode-se observar que para todos os índices estatísticos os menores valores foram obtidos para o modelo intrínseco, indicando uma melhor predição para o substrato em relação ao modelo não intrínseco.

Tabela 4.4 – Índices estatísticos para o substrato utilizado para avaliar os modelos intrínseco e não intrínseco nas fermentações em batelada alimentada (BA) e em batelada alimentada VHG (BA-VHG).

Índices estatísticos	Batelada alimentada (BA)		Batelada alimentada VHG (BA-VHG)	
	Não intrínseco (Modelo 1)	Intrínseco (Modelo 2)	Não intrínseco (Modelo 1)	Intrínseco (Modelo 2)
RSD (%)	10,58	6,51	12,24	6,04
TIC (-)	0,05	0,03	0,06	0,03
RMSE (g L ⁻¹)	1,80	1,11	2,10	1,02
REL (-)	0,42	0,26	0,21	0,09

Apesar das diferenças de previsão para o substrato, tanto a abordagem intrínseca quanto a não intrínseca mostram a tendência dos principais componentes da fermentação alcoólica, podendo ser utilizadas para fins de simulação. No entanto, modelos matemáticos são amplamente utilizados em rotinas de otimização (RIVERA *et al.*, 2017; SONEGO *et al.*, 2018; VELOSO *et al.*, 2019) e no controle da fermentação alcoólica (ALVARADO; GARCIA, 2018; KUMAR *et al.*, 2019; PETRE; SELIȘTEANU; ROMAN, 2021). Na fermentação em batelada alimentada, por exemplo, a otimização do processo pode ser feita variando o tempo de enchimento da dorna, a fim de manter a concentração de substrato na dorna abaixo de 150 g L⁻¹ (concentração em que a inibição se torna mais pronunciada) (THATIPAMALA; ROHANI; HILL, 1992). Nesse caso, o uso do modelo não intrínseco pode encontrar uma condição ótima em que a concentração máxima de substrato na dorna esteja abaixo da faixa de inibição (150 g L⁻¹), quando na verdade isso não é observado experimentalmente, o que impactaria na produtividade em etanol. Enquanto uma otimização realizada com o modelo intrínseco proposto no presente trabalho resultaria em uma condição mais confiável.

Na fermentação VHG, uma maior quantidade de substrato é processada e, portanto, maior produção de etanol é obtida ($>120 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), resultando em redução do volume de vinhaça e do consumo de vapor na destilação, além de economia de insumos (ácido sulfúrico e antibióticos), água e equipamentos de processo (AMORIM *et al.*, 2011). Porém, quanto maior a C_S , maior o tempo necessário para converter o substrato em produto, levando a uma menor produtividade do processo, ou seja, a quantidade de etanol produzida por unidade de tempo. Índices de produtividade adequados em processos VHG podem ser restabelecidos sob condição de HCD, em que uma maior concentração de células aumenta a taxa de conversão de substrato em produto. Muitos estudos têm aplicado estratégias para melhorar a fermentação VHG, como variação da temperatura do caldo de fermentação (RIVERA *et al.*, 2017), remoção do etanol (inibidor) (SONEGO, 2016) e adaptação da levedura a baixas temperaturas (CRUZ, 2015). Segundo Amorim *et al.* (2011), existem vários desafios científicos a serem resolvidos para a aplicação da fermentação VHG do ponto de vista industrial. A utilização de um modelo matemático adequado para representar este processo torna-se essencial para obter melhorias nas rotinas de otimização e controle. Portanto, para uma representação mais fiel do processo, o alto volume da célula não pode ser negligenciado no desenvolvimento do balanço de massa.

4.4. CONCLUSÕES

O volume ocupado pelas células deve ser considerado no desenvolvimento do balanço de massa das fermentações em batelada alimentada com alta densidade celular (HCD), especialmente sob condições VHG. O modelo intrínseco desenvolvido melhorou a predição do perfil do substrato para este tipo de processo em comparação com um modelo convencional não intrínseco. Assim, a utilização do modelo proposto como ferramenta de otimização do processo pode fornecer condições ótimas de operação mais precisas, evitando erros na previsão do substrato, que em altas concentrações podem causar inibição celular e, conseqüentemente, diminuir a produtividade em etanol. Portanto, o modelo proposto fornece uma alternativa mais confiável para aplicação em estratégias de otimização e controle, podendo contribuir para a superação de desafios que impedem a aplicação da fermentação alcoólica VHG em batelada alimentada em escala industrial, resultando em redução dos custos do processo.

Capítulo V

**MODELAGEM DA FERMENTAÇÃO
ALCOÓLICA EM BATELADA ALIMENTADA
COM ELEVADAS CONCENTRAÇÕES
CELULAR E DE SUBSTRATO EM DIFERENTES
TEMPERATURAS**

5.1. INTRODUÇÃO

A maioria dos estudos modelou a fermentação alcoólica em batelada alimentada a partir de sacarose usando uma concentração celular fixa (CAMARGOS; MORAES; OLIVEIRA, 2020; GUIDINI *et al.*, 2014; LEMOS *et al.*, 2020; SONEGO *et al.*, 2016; VELOSO *et al.*, 2019). Nesse caso, modelos obtidos a partir de baixas concentrações celulares podem levar a previsões incorretas quando extrapolados para fermentação em altas concentrações celulares (MONBOUQUETTE, 1992). Na fermentação alcoólica em batelada alimentada, a maior concentração de células ocorre no início do processo (inóculo), pois a suspensão de células é posteriormente diluída pela adição de mosto. Este processo específico de alimentação gradual do mosto ao inóculo é implementado para evitar efeitos negativos no crescimento celular e na produção de etanol causados por altas concentrações de substrato (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011). Sonego *et al.* (2018) estudaram diferentes tempos de alimentação do mosto ao creme de levedura (inóculo), destacando a importância dessa estratégia de alimentação gradual para evitar o acúmulo de substrato no caldo. Guidini *et al.* (2014) usaram um planejamento experimental para determinar as condições ideais para concentração de células no inóculo ($\sim 130 \text{ g L}^{-1}$), concentração de substrato no mosto (257 g L^{-1}) e tempo de enchimento do reator (6 h), destacando a importância dessas variáveis no processo de fermentação alcoólica em batelada alimentada. No entanto, até onde sabemos, existem poucos estudos de modelagem matemática na literatura que investigaram as influências do tamanho do inóculo e da temperatura do caldo na fermentação alcoólica em condições de altas concentrações de substrato alimentado (VHG). Portanto, o objetivo do presente capítulo foi modelar a fermentação alcoólica em batelada alimentada usando diferentes tamanhos de inóculo, nas temperaturas de 28, 30, 32 e 34 °C. Para isso, foi utilizado um modelo cinético híbrido considerando inibições por substrato, etanol e células. Para cada temperatura (T), foram realizadas fermentações em batelada alimentada com diferentes tamanhos de inóculo (50, 75, 100 e 125 g L^{-1}), com concentrações de substrato no mosto de 296 g L^{-1} ART. Dados de fermentações com altas concentrações de substrato no mosto ($258\text{--}436 \text{ g L}^{-1}$ ART) obtidos no trabalho de Veloso *et al.* (2019), também foram utilizados. Simulações e validações experimentais foram realizadas para condições de VHG e alta densidade celular (HCD), a fim de mostrar a aplicabilidade do modelo em condições diferentes daquelas utilizadas para obter os parâmetros cinéticos.

5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1. Microrganismo e meio de cultura

O microrganismo produtor de etanol utilizado neste estudo foi a cepa de levedura industrial liofilizada *S. cerevisiae* Y-904. Para simular o melaço de cana industrial diluído com caldo de cana-de-açúcar, o mosto (volume de 1,4 L) foi composto pelos seguintes reagentes analíticos: sacarose ($281,0 \text{ g L}^{-1}$, equivalente a $296,0 \text{ g L}^{-1}$ ART), KH_2PO_4 ($9,6 \text{ g L}^{-1}$), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($2,4 \text{ g L}^{-1}$), extrato de levedura ($11,7 \text{ g L}^{-1}$) e ureia ($9,1 \text{ g L}^{-1}$). O pH inicial do mosto foi ajustado para 4,6 por adição de solução de ácido clorídrico 1 M. Nas fermentações experimentais de validação, o mosto apresentou concentrações de sacarose de 413,92, 365,07, 317,84 e $280,92 \text{ g L}^{-1}$ (equivalentes a 435,71, 384,28, 334,57 e $295,71 \text{ g L}^{-1}$ ART, respectivamente).

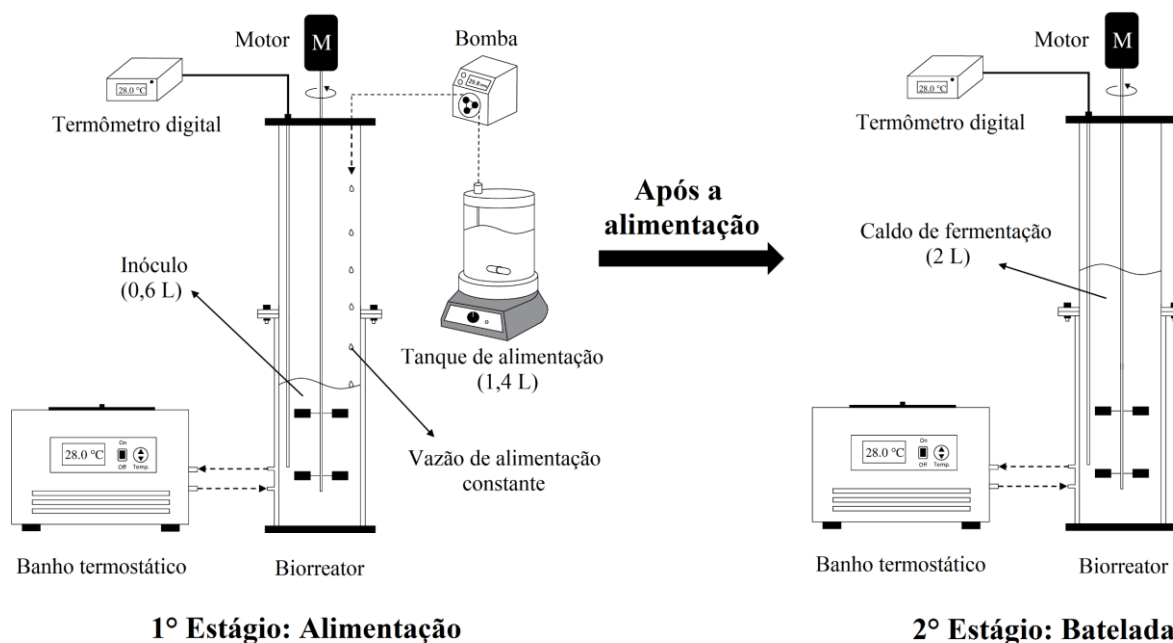
5.2.2. Procedimento experimental

Um total de dezesseis fermentações em batelada alimentada foram realizadas a 28, 30, 32 e $34 \text{ }^\circ\text{C}$, com tamanhos de inóculo (C_{X0}) de 50, 75, 100 e 125 g L^{-1} . As fermentações foram realizadas em um biorreator tipo torre com volume de trabalho de 2 L, composto por uma parte superior transparente (vidro borossilicato) e uma base encamisada (aço inoxidável). As dimensões do biorreator são 47,7 cm de altura total, 30,3 cm de altura do líquido e 9,2 cm de diâmetro interno. A **Figura 5.1** mostra uma ilustração esquemática do equipamento e da metodologia empregada nas fermentações em batelada alimentada.

A levedura liofilizada foi primeiramente hidratada em 0,6 L de água destilada (inóculo, correspondente a 30% do volume de trabalho do biorreator), sem qualquer substrato ou etanol ($C_{E0}=C_{S0}=0,0 \text{ g L}^{-1}$). O inóculo foi mantido sob agitação e temperatura constantes no biorreator durante 20 min, a fim de aclimatar a levedura. O mosto (1,4 L, correspondente a 70% do volume de trabalho do biorreator) foi então alimentado a uma vazão volumétrica constante (F), usando uma bomba peristáltica (Modelo 120 U, Watson-Marlow). Para os cultivos a 28, 30, 32 e $34 \text{ }^\circ\text{C}$ as vazões de alimentação foram 0,175; 0,233; 0,255 e $0,280 \text{ L h}^{-1}$, respectivamente, obtido do trabalho de Veloso *et al.* (2019). A agitação mecânica (250 rpm) foi fornecida por um sistema motor/impelidor para garantir a homogeneização do caldo de fermentação. A temperatura foi mantida constante usando um banho termostático (SL-152, Solab) que recirculou água através da camisa do biorreator. Um termômetro digital (MT 512, Full Gauge) foi usado para medir

continuamente a temperatura. Um agente antiespumante comercial (Qualifoam, diluído a 30% $m\ m^{-1}$) foi adicionado quando necessário, a fim de reduzir o excesso de espuma.

Figura 5.1 – Ilustração esquemática das duas etapas da fermentação alcoólica em batelada alimentada realizadas no presente estudo.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

5.2.3. Metodologia analítica

As amostras foram centrifugadas a $10.414 \times g$ e $4\ ^\circ C$ por 10 min, e a massa celular foi lavada, centrifugada novamente e seca a $60\ ^\circ C$ até que a massa de sedimento seco fosse constante (SONEGO *et al.*, 2016). A concentração de células totais (C_X) foi determinada a partir da massa de sedimento seco. A concentração de células viáveis (C_{VX}) foi obtida multiplicando-se C_X pela porcentagem de células viáveis, determinada pelo método de coloração com azul de metileno (LEE; ROBINSON; WANG, 1981), utilizando uma câmara de Neubauer (Bright Line, Boeco Germany) e um microscópio óptico (BX 50F -3, Olimpo).

As concentrações de etanol, sacarose, glicose e frutose no sobrenadante foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando um cromatógrafo (Modelo 717plus Autosampler, Waters, EUA) equipado com uma coluna Sugar-Pak I ($300 \times 6,5\ mm$, $10\ \mu m$, Waters) mantida a $80\ ^\circ C$ e um detector de índice de refração (Modelo 2414, Waters, EUA) operado a $40\ ^\circ C$. O eluente foi água ultrapura contendo $50\ mg\ L^{-1}$ de

EDTA de cálcio (hidrato de etilenodiaminotetraacetato de cálcio dissódico), com vazão de 0,50 mL min⁻¹. Soluções de sacarose, glicose, frutose e etanol foram utilizadas como padrões, em concentrações entre 0,1 e 8,0 g L⁻¹, preparadas a partir dos reagentes analíticos puros.

5.2.4. Modelagem matemática

Um modelo matemático considerando a produção de etanol associada ao crescimento celular foi desenvolvido a partir dos balanços de massa para células totais (X), células viáveis (VX), etanol (E) e substrato (S), juntamente com o balanço de massa total, resultando em cinco equações diferenciais (Equações 5.1–5.5). O balanço de massa celular total (Equação 5.1) leva em consideração as novas células formadas a partir de células viáveis ($\mu \cdot C_{VX}$) e a quantidade de células totais diluídas pela adição de mosto ($C_X \cdot F/V$). Durante a alimentação do mosto (fase de alimentação), há variação do volume de caldo ($F \neq 0$). Na segunda etapa (fase de batelada), não há variação do volume de caldo, pois todo o mosto já foi alimentado ($F=0$) (CAMARGOS; MORAES; OLIVEIRA, 2020; LEMOS *et al.*, 2020; SONEGO *et al.*, 2018; VELOSO *et al.*, 2019).

$$\frac{dC_X}{dt} = \mu \cdot C_{VX} - \frac{F}{V} \cdot C_X \quad (5.1)$$

$$\frac{dC_{VX}}{dt} = \left(\mu - \frac{F}{V} \right) \cdot C_{VX} \quad (5.2)$$

$$\frac{dC_S}{dt} = \frac{(C_{Sm} - C_S) \cdot F/V + \mu C_{VX} \cdot (C_S/\rho_B - 1/Y_{X/S})}{(1 - C_X/\rho_B)} \quad (5.3)$$

$$\frac{dC_E}{dt} = \frac{((Y_{X/S}/Y_{E/S}) + C_E \cdot (1 - \gamma_E)/\rho_B) \cdot \mu C_{VX} - (F/V) \cdot C_E}{(1 + (\gamma_E - 1) \cdot C_X/\rho_B)} \quad (5.4)$$

$$\frac{dV}{dt} = F \quad (5.5)$$

em que C_X é a concentração celular total (g L⁻¹), μ é a velocidade específica de crescimento celular (h⁻¹), C_{VX} é a concentração de células viáveis (g L⁻¹), F é a vazão de alimentação de mosto (L h⁻¹), V é o volume de caldo (L), C_S é a concentração de substrato limitante (ART) (g L⁻¹), C_{Sm} é a concentração de substrato no mosto (g L⁻¹), C_E é a concentração de etanol (g L⁻¹), $Y_{X/S}$ é o coeficiente de rendimento de substrato a células (g_X g_S⁻¹), $Y_{E/S}$ é o coeficiente de rendimento de substrato a etanol (g_E g_S⁻¹), ρ_B é a densidade da levedura em gramas de massa seca por unidade de volume de

célula úmida (g L^{-1}) e γ_E é o coeficiente de partição de equilíbrio para o etanol (adimensional). Valores de $\rho_B=390 \text{ g L}^{-1}$ e $\gamma_E=0,78$ foram obtidos da literatura (MONBOUQUETTE, 1992, 1987).

O crescimento celular foi descrito por um modelo cinético híbrido (Equação 5.6), derivado dos modelos de Andrews (1968), Levenspiel (1980) e Lee-Pollard-Coulman (1983), considerando as inibições por substrato, produto e células:

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S + \frac{C_S^2}{K_{IS}}} \cdot \left(1 - \frac{C_E}{C_{Emax}}\right)^n \cdot \left(1 - \frac{C_X}{C_{Xmax}}\right)^m \quad (5.6)$$

em que μ_{max} é a velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1}), K_S é a constante de saturação (g L^{-1}), K_{IS} é a constante de inibição pelo substrato (g L^{-1}), C_{Emax} é a concentração máxima de etanol após a qual o crescimento celular cessa (g L^{-1}), n é a potência de inibição do produto (adimensional), C_{Xmax} é a concentração celular máxima após a qual o crescimento celular cessa (g L^{-1}) e m é a potência de inibição da célula (adimensional).

Os coeficientes $Y_{E/S}$ foram determinados usando a Equação 5.7:

$$Y_{E/S} = \frac{C_{E_f} \cdot V_f \cdot (1 + (\gamma_E - 1) \cdot C_{X_f}/\rho_B) - C_{E_0} \cdot V_0 \cdot (1 + (\gamma_E - 1) \cdot C_{X_0}/\rho_B)}{V_M \cdot C_{S_m} + C_{S_0} \cdot V_0 \cdot (1 - C_{X_0}/\rho_B) - C_{S_f} \cdot V_f \cdot (1 - C_{X_f}/\rho_B)} \quad (5.7)$$

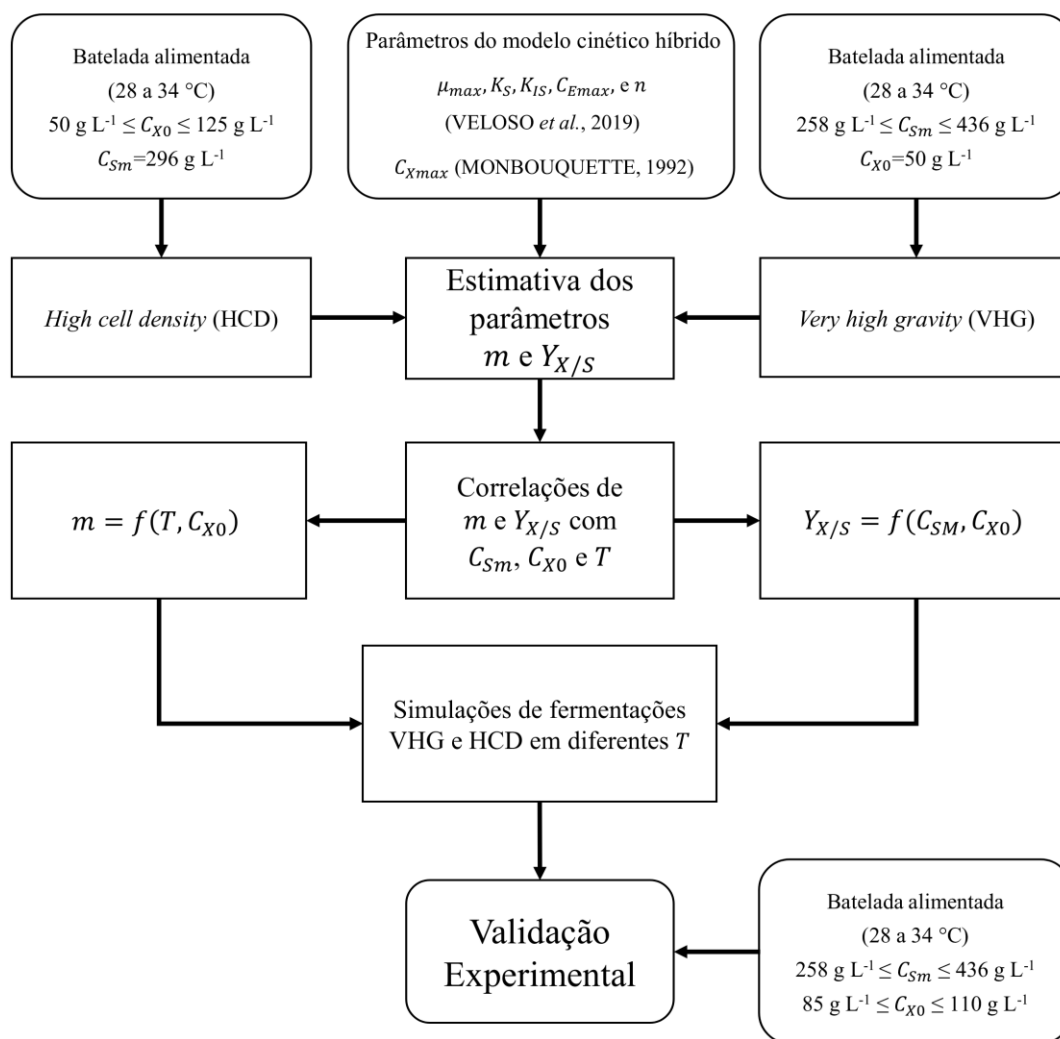
em que os subscritos “0” e “f” referem-se aos tempos inicial e final do processo, respectivamente.

5.2.5. Estimativa de parâmetros e validação do modelo

A **Figura 5.2** mostra um fluxograma que descreve o procedimento para estimativa dos parâmetros usando dados de fermentações em batelada alimentada sob duas condições: (1) alta concentração de substrato no mosto (VHG) com C_{X_0} constante (dados de Veloso *et al.* (2019)), e (2) alta densidade celular (HCD) com C_{S_m} constante. Correlações matemáticas obtidas a partir dos parâmetros estimados foram estabelecidas para parametrizar os comportamentos de m e $Y_{X/S}$, sendo essas correlações utilizadas para validar as simulações nas condições VHG e HCD.

O coeficiente de rendimento celular ($Y_{X/S}$) e o parâmetro de potência de inibição da célula (m) foram estimados por meio de um algoritmo genético utilizando o *software* Scilab (v. 6.1.1). Os parâmetros μ_{max} , K_S , K_{IS} , C_{Emax} e n foram obtidos do trabalho de Veloso *et al.* (2019) e encontram-se apresentados na **Tabela 5.1**. O valor do parâmetro C_{Xmax} utilizado no modelo cinético foi de $320,0 \text{ g L}^{-1}$, conforme indicado por Monbouquette (1992).

Figura 5.2 – Fluxograma descrevendo o procedimento de estimativa de parâmetros e a simulação da fermentação alcoólica em batelada alimentada sob condições de VHG e HCD.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Tabela 5.1 – Parâmetros utilizados na modelagem cinética da fermentação alcoólica em batelada alimentada com diferentes tamanhos de inóculo.

T (°C)	μ _{max} ^a (h ⁻¹)	K _s ^a (g L ⁻¹)	K _{IS} ^a (g L ⁻¹)	C _{E_{max}} ^a (g L ⁻¹)
28	0,157	19,98	170,0	139,7
30	0,177	20,72	170,7	119,2
32	0,195	40,13	170,7	105,0
34	0,220	78,55	170,5	99,7

^aValores obtidos do trabalho de Veloso *et al.* (2019)

O desvio padrão residual (RSD, do inglês *residual standard deviation*, Equação 5.8) foi utilizado como critério estatístico para avaliação da capacidade preditiva do modelo:

$$RSD(\%) = \frac{\sqrt{\frac{1}{N_p} \sum_{k=1}^{N_p} (c_k - \hat{c}_k)^2}}{\bar{c}} \times 100 \quad (5.8)$$

em que N_p é o número de dados experimentais, c_k e \hat{c}_k são as concentrações experimentais e previstas, respectivamente, de células totais, células viáveis, substrato e etanol, para a k -ésima amostra e \bar{c} é a média das concentrações experimentais.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Modelos matemáticos cinéticos têm sido progressivamente adaptados para representar várias condições do processo fermentativo. O modelo cinético de Monod (1949) é o modelo mais simples para descrever o crescimento celular sem nenhum tipo de inibição. Quando os processos são conduzidos na presença de inibidores, termos adicionais devem ser incluídos no modelo Monod (1949), a fim de representar satisfatoriamente a cinética do processo. No modelo de Andrews (1968), um termo de inibição pelo substrato é adicionado ao modelo de Monod. Da mesma forma, o modelo de Levenspiel (1980) descreve a cinética microbiana sob condições de inibição pelo produto. A inibição celular também pode ser representada pela inclusão de um termo de inibição no modelo Monod (1949), conforme relatado por Lee, Pollard e Coulman (1983). No presente trabalho, foi utilizado um modelo de crescimento celular não estruturado e não segregado (Equação 5.6), que consiste em uma equação simples para prever um processo complexo (crescimento celular sob diferentes condições de inibição). Mesmo considerando os três tipos de inibição mencionados acima, melhorias adicionais ainda devem ser feitas no modelo para permitir a previsão do comportamento do processo em uma ampla gama de condições experimentais de T , C_{Sm} e C_{X0} que afetam a cinética microbiana. Parâmetros que dão peso exponencial à inibição por produto e células (n e m , respectivamente), quando fixados, não podem representar diferentes condições de inibição. O parâmetro n do modelo cinético (Equação 5.6) dá peso à inibição pelo produto (LEVENSPIEL, 1980) e pode ser correlacionado com a concentração de etanol no caldo em uma ampla faixa (80 a 135 g L⁻¹) (VELOSO *et al.*, 2019). Analogamente à potência de inibição pelo produto (n), o parâmetro m deve ser corrigido para que o modelo seja capaz de representar o processo sob diferentes condições de temperatura e tamanho do inóculo.

5.3.1. Estimativa dos parâmetros m e $Y_{X/S}$

A **Figura 5.3** mostra a modelagem cinética para as dezesseis fermentações em batelada alimentada com $C_{Sm}=296 \text{ g L}^{-1}$ e diferentes tamanhos de inóculo (50, 75, 100 e 125 g L^{-1}), a 28, 30, 32 e 34 °C. Os resultados mostraram que o modelo cinético híbrido proposto proporcionou um excelente ajuste aos dados experimentais. A **Tabela 5.2** apresenta os parâmetros estimados (m e $Y_{X/S}$) e os principais resultados para cada condição.

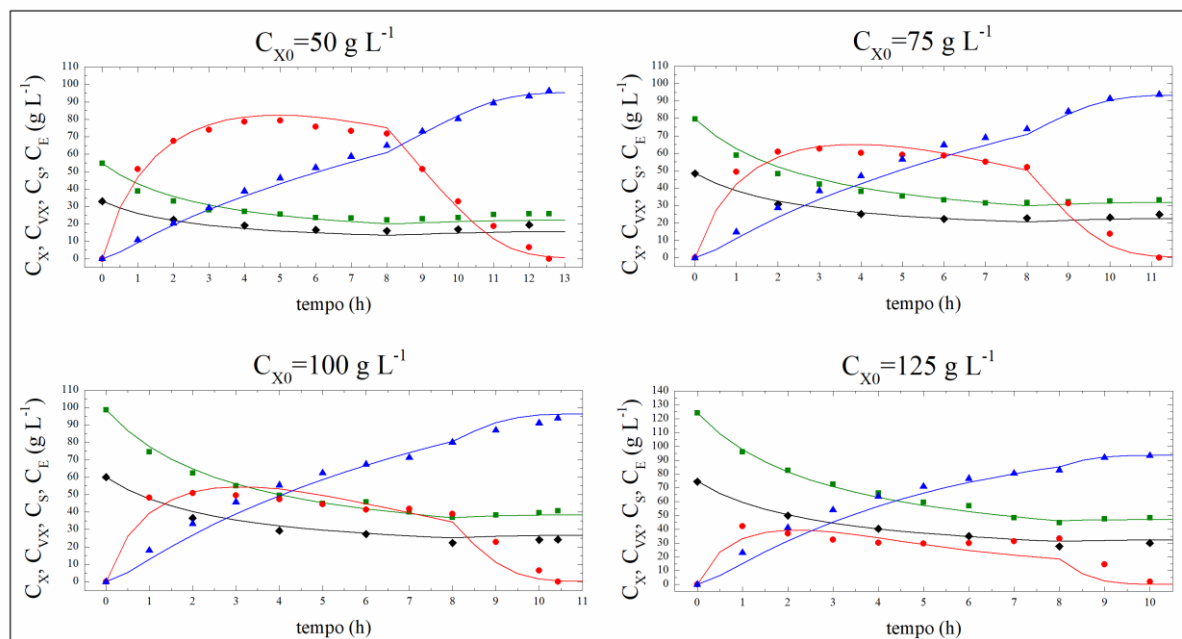
Tabela 5.2 – Principais resultados encontrados para cada condição avaliada.

T (°C)	n ^a (-)	C _{X0} (g L ⁻¹)	m ^b (-)	Y _{X/S} ^b (gx gs ⁻¹)	Y _{E/S} (g _E gs ⁻¹)	P _E (g L ⁻¹ h ⁻¹)	A _P (%)
28	0,28	50,9	7,92 ± 1,16	0,0260 ± 0.0031	0,457	7,68	-
	0,25	79,6	4,49 ± 0,55	0,0364 ± 0.0034	0,448	8,38	9,1
	0,25	98,7	3,49 ± 0,50	0,0402 ± 0.0042	0,443	9,02	17,7
	0,25	124,1	2,34 ± 0,54	0,0452 ± 0.0068	0,451	9,26	20,7
30	0,28	54,9	7,63 ± 1,420	0,0268 ± 0.0037	0,463	8,09	-
	0,27	77,8	4,28 ± 0,51	0,0364 ± 0.0029	0,456	9,40	16,2
	0,27	103,3	2,87 ± 0,43	0,0417 ± 0.0034	0,453	10,67	31,9
	0,31	125,2	2,23 ± 0,49	0,0466 ± 0.0061	0,467	11,02	36,2
32	0,26	50,8	6,79 ± 1,18	0,0271 ± 0.0030	0,451	8,03	-
	0,25	80,4	3,62 ± 0,66	0,0350 ± 0.0037	0,446	9,40	16,7
	0,28	106,0	2,16 ± 0,69	0,0410 ± 0.0060	0,463	10,67	34,6
	0,30	128,9	1,63 ± 0,60	0,0440 ± 0.0070	0,466	11,02	37,0
34	0,25	51,9	3,79 ± 1,23	0,0250 ± 0.0030	0,449	9,10	-
	0,28	81,6	1,90 ± 0,81	0,0365 ± 0.0048	0,457	10,00	9,9
	0,30	103,4	1,11 ± 0,78	0,0410 ± 0.0067	0,463	10,88	19,6
	0,31	126,3	0,79 ± 0,46	0,0440 ± 0.0050	0,466	11,01	21,0

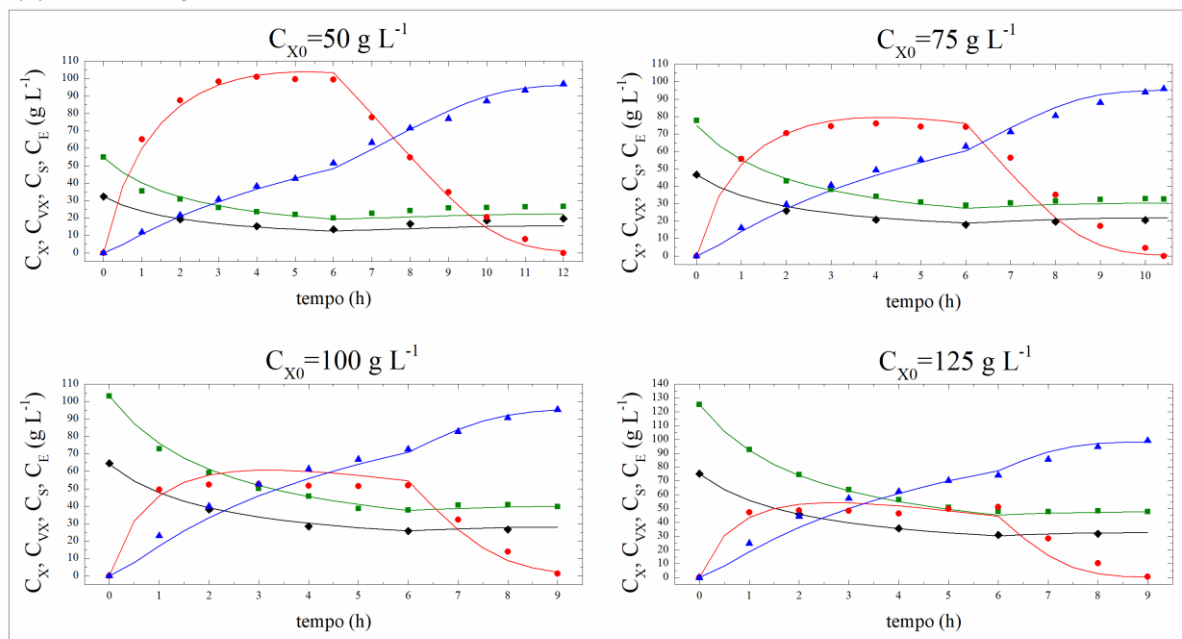
^aValores obtidos do trabalho de Veloso *et al.* (2019); ^bEstimado com nível de confiança de 95% (teste t de Student); P_E: produtividade volumétrica em etanol; A_P: aumento percentual da produtividade em relação à condição C_{X0}=50 g L⁻¹ em cada temperatura.

Figura 5.3 – Perfis de concentração simulados (linhas) e experimentais (símbolos) de etanol (triângulos), substrato (círculos), células totais (quadrados) e células viáveis (losangos) para tamanhos de inóculo de 50, 75, 100 e 125 g L⁻¹, a temperaturas de (a) 28 °C, (b) 30 °C, (c) 32 °C e (d) 34 °C

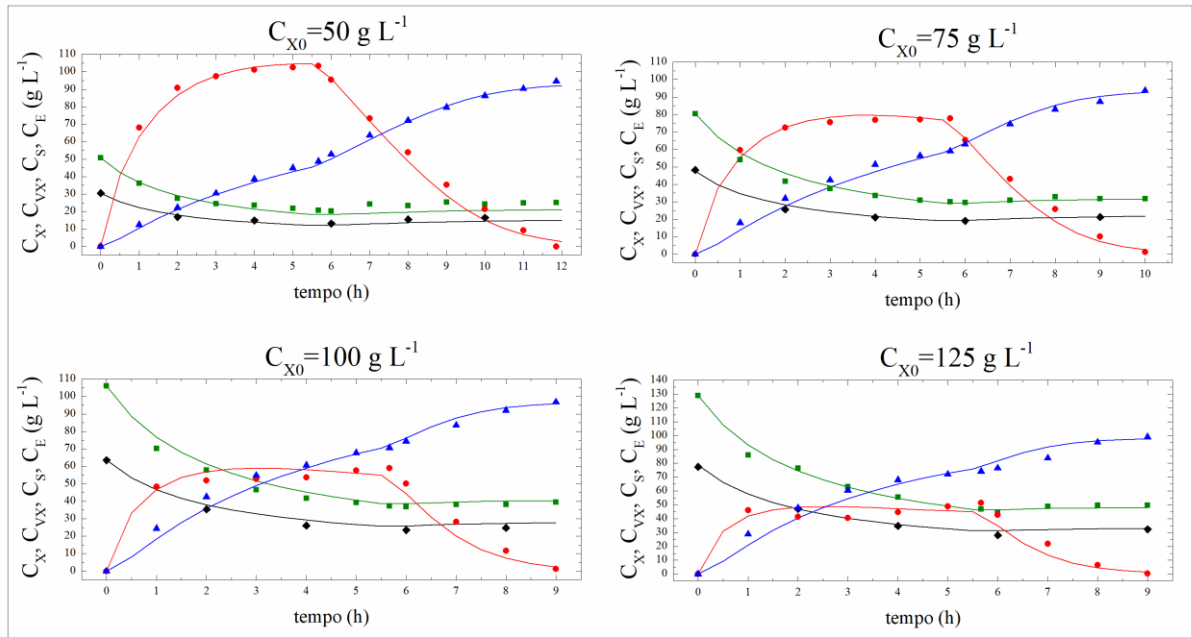
(a) Fermentações a 28 °C



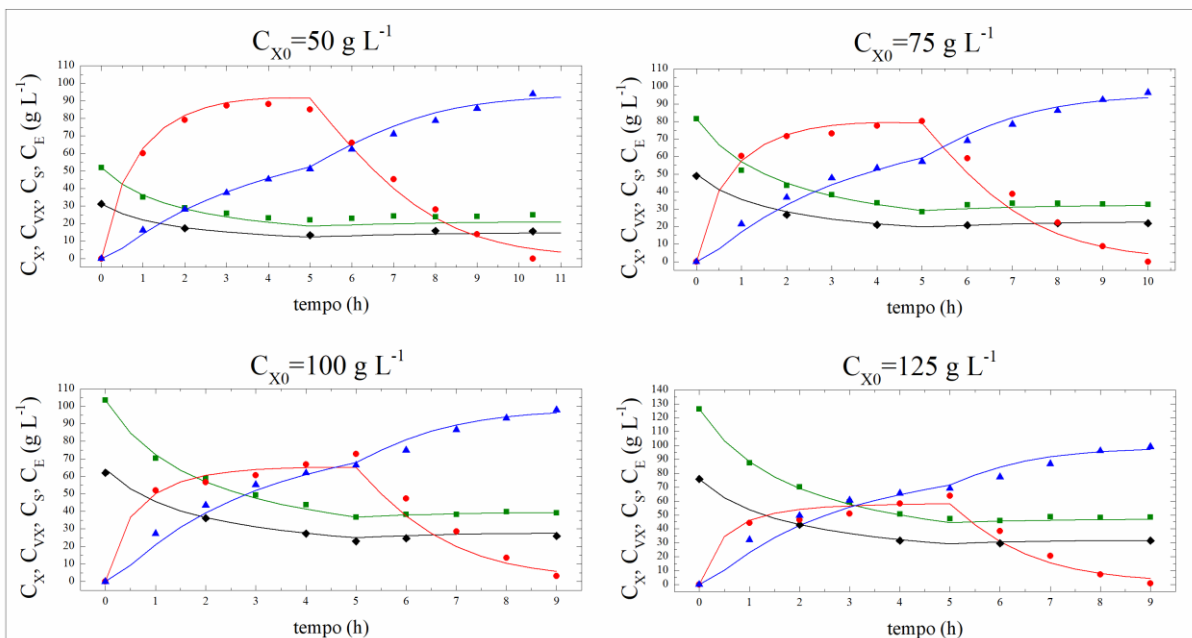
(b) Fermentações a 30 °C



(c) Fermentações a 32 °C



(d) Fermentações a 34 °C



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

O parâmetro m mostrou dependência do tamanho do inóculo e da temperatura. O aumento do tamanho do inóculo levou a um aumento da taxa de consumo de substrato, resultando em maior produtividade em etanol. No entanto, o aumento percentual na produtividade (A_P) tendeu à estabilidade para todos os experimentos com $C_{X0}=125 \text{ g L}^{-1}$, indicando que para C_{X0} acima de 100 g L^{-1} , o aumento do tamanho do inóculo não contribuiu proporcionalmente para o aumento da produtividade em etanol. De acordo com a literatura, altas densidades celulares podem afetar a produtividade do processo (CYSEWSKI; WILKE, 1978; LEE; POLLARD; COULMAN, 1983; WESTMAN; FRANZÉN, 2015). Esse comportamento pode ser quantificado usando o parâmetro de potência de inibição da célula (m), que fornece uma indicação de quão fortemente o termo de inibição afeta a velocidade específica de crescimento celular (LEE; POLLARD; COULMAN, 1983). Observou-se que para cada temperatura, o parâmetro m diminuiu com o aumento de C_{X0} . Segundo Jarzębski, Malinowski e Goma (1989) o crescimento celular é prejudicado devido à dificuldade de acesso aos nutrientes, limitações de espaço e interações celulares em condições de altas concentrações celulares, levando a cinéticas e composições diferentes das normalmente encontradas. A alta densidade celular leva a uma menor disponibilidade de nutrientes por célula, induzindo alterações na fisiologia celular que causam baixa velocidade específica de crescimento celular (WESTMAN; FRANZÉN, 2015). Avbelj *et al.* (2015) estudaram a cinética de interação da levedura *S. cerevisiae*, concluindo que os microrganismos podem interagir e se comunicar entre si. Esse mecanismo de comunicação permite que os microrganismos determinem a densidade populacional, estimulando mudanças no comportamento celular. Portanto, a variação de m com C_{X0} está de acordo com outros estudos relatados na literatura. O parâmetro m também foi estimado para o conjunto de dados de diferentes concentrações de substrato no mosto (dados de Veloso *et al.* (2019)), mas neste caso não foi observada dependência com C_{Sm} (dados não mostrados). Uma ampla coleção de equações predefinidas foi testada para encontrar a melhor correlação entre o parâmetro m e as variáveis C_{X0} e T . Os testes de correlação otimizados foram realizados usando o *software* Matlab (v. R2017a). O critério de seleção da correlação baseou-se na minimização da soma dos quadrados dos resíduos. A melhor correlação (Equação 5.9) entre C_{X0} e T para prever m foi obtida usando os dados da **Tabela 5.2**, com um coeficiente de determinação quadrático (R^2) de 0,98 e um coeficiente de determinação quadrático ajustado (R_a^2) de 0,97.

$$m(T, C_{X0}) = (361 \pm 83) \cdot \left(e^{\left(\frac{3,21 \pm 0,75}{C_{X0}} - (0,0343 \pm 0,0005) \cdot T \right)} - \frac{10,8 \pm 2,6}{T} \right) \quad (5.9)$$

O coeficiente de rendimento celular ($Y_{X/S}$) aumentou com o aumento de C_{X0} , mas diferente do parâmetro m , não apresentou variações com a temperatura de fermentação. Comportamento semelhante foi relatado em outros estudos, em uma faixa de temperatura próxima a do presente trabalho (AMILLASTRE *et al.*, 2012; PHISALAPHONG; SRIRATTANA; TANTHAPANICHAKOON, 2006). O modelo proposto (Equações 5.1–5.6) foi ajustado aos dados experimentais para seis condições de batelada alimentada, relatadas no trabalho de Veloso *et al.* (2019) (denominada FB1 a FB6), com $C_{X0}=50 \text{ g L}^{-1}$ e diferentes condições de concentração de substrato no mosto (C_{Sm}) para estimar o parâmetro $Y_{X/S}$ (**Tabela 5.3**). Neste caso, o parâmetro correspondente m foi calculado usando a correlação proposta (Equação 5.9). Conforme apresentado na **Tabela 5.3**, o parâmetro $Y_{X/S}$ também apresentou variação com C_{Sm} , concordando com resultados relatados na literatura (PEREIRA *et al.*, 2013; PHISALAPHONG; SRIRATTANA; TANTHAPANICHAKOON, 2006; VELOSO *et al.*, 2019). Assim, foi possível avaliar como o parâmetro $Y_{X/S}$ mudou com o tamanho do inóculo (C_{X0}) e a concentração do substrato no mosto (C_{Sm}). Uma ampla coleção de equações predefinidas foi testada para correlacionar $Y_{X/S}$ com as variáveis C_{Sm} e C_{X0} , usando o *software* Matlab. O critério de escolha da melhor correlação baseou-se na minimização da soma dos quadrados dos resíduos. A melhor equação (Equação 5.10), com $R^2=0,96$ e $R_a^2=0,95$, foi obtida correlacionando C_{Sm} e C_{X0} para predição de $Y_{X/S}$ usando dados das **Tabelas 5.2 e 5.3**.

Tabela 5.3 – Parâmetros estimados para modelagem da fermentação alcoólica em batelada alimentada em diferentes temperaturas e com diferentes concentrações de substrato no mosto.

Fermentação ^a	T (°C)	C _{Sm} (g L ⁻¹)	m (-)	Y _{X/S} ^b (gx gs ⁻¹)	P _E (g L ⁻¹ h ⁻¹)
FB1	28	257,1	7,95	0,0244 ± 0,0003	7,94
FB2	30	259,3	7,46	0,0254 ± 0,0003	8,49
FB3	32	256,7	6,47	0,0233 ± 0,0004	9,29
FB4	28	436,3	7,95	0,0184 ± 0,0002	4,99
FB5	30	375,1	7,46	0,0220 ± 0,0003	6,79
FB6	32	334,6	6,47	0,0225 ± 0,0005	8,19

^aDados obtidos do trabalho de Veloso *et al.* 2019; ^bEstimado com nível de confiança de 95% (teste t de Student).

$$Y_{X/S}(C_{Sm}, C_{X0}) = \frac{(C_{Sm} \cdot C_{X0}) \cdot 10^{-3}}{(2,68 \pm 0,79) \cdot C_{Sm} + (2,61 \pm 0,63) \cdot C_{X0} - (309,8 \pm 22,4)} \quad (5.10)$$

Considerando vinte e dois experimentos em batelada alimentada (**Tabelas 5.2 e 5.3**) e os resultados obtidos usando o modelo cinético híbrido em cada ensaio, pode-se verificar que as condições experimentais ótimas (que maximizam a produtividade em etanol) são obtidas para temperaturas entre 30 e 34 °C e para os maiores valores de C_{X0} (125 g L⁻¹). Em relação ao parâmetro C_{Sm} , há uma tendência decrescente de produtividade quando a concentração de substrato no mosto aumenta, ou seja, na faixa estudada, menores valores de C_{Sm} levaram a maiores P_E . Isso ocorre devido à menor inibição da levedura pelo etanol. No entanto, vale ressaltar que outras condições operacionais ótimas podem ser encontradas para fermentação alcoólica com remoção do produto de inibição, ou seja, fermentação extrativa (por exemplo, *stripping*, vácuo, solvente), para a qual o modelo cinético híbrido também pode ser usado.

O **Quadro 5.1** mostra alguns trabalhos referentes à fermentação alcoólica em diferentes condições de operação. Dentre esses estudos, muitos avaliaram os efeitos da temperatura e da elevada concentração de substrato nos parâmetros cinéticos, mas utilizando uma única condição inicial de concentração celular (ATALA, 2001; PHISALAPHONG; SRIRATTANA; TANTHAPANICHAKOON, 2006; RIVERA *et al.*, 2017; VELOSO *et al.*, 2019). Outros autores estudaram o efeito do tamanho do inóculo em diferentes temperaturas, mas não avaliaram os efeitos dessas variáveis nos parâmetros cinéticos (CRUZ; RESENDE; RIBEIRO, 2018; LALUCE *et al.*, 2009). Obter parâmetros cinéticos em uma única condição não é útil quando se deseja simular adequadamente a fermentação alcoólica em diferentes condições. Conforme discutido anteriormente, com o aumento do tamanho do inóculo, os parâmetros m e $Y_{X/S}$ variaram. Portanto, a partir da modelagem e correlações (Equações 5.9 e 5.10) propostas neste estudo, será possível obter os parâmetros cinéticos em uma ampla faixa de T , C_{X0} e C_{Sm} .

Quadro 5.1 – Compilação de alguns estudos analisando diferentes condições de fermentação alcoólica e principais resultados obtidos.

Referência	Modo	C_S consumido (g L ⁻¹)	T (°C)	C_{X0} (g L ⁻¹)	Valor máximo de C_X (g L ⁻¹)	Valor máximo de C_E (g L ⁻¹)
Phisalaphong <i>et al.</i> (2006)	Bat. ^a	220	30–42	0.2	8	80
Laluce <i>et al.</i> (2009)	Bat.	200	30–40	30–40	45	100
Pereira <i>et al.</i> (2013)	Bat.	358	27–30	0.4	11	135
Guidini <i>et al.</i> (2014)	Bat. Alim. ^b	180	32	50–146	146	100
Rivera <i>et al.</i> (2017)	Bat. Alim.	291	27–33	80	80	124
Cruz <i>et al.</i> (2018)	Bat. Alim.	190	24–34	10–40	40	90
Veloso <i>et al.</i> (2019)	Bat. Alim.	305	28–34	50	50	135

^aBat.: refere-se à operação em modo batelada; ^bBat. Alim.: refere-se à operação em modo batelada alimentada

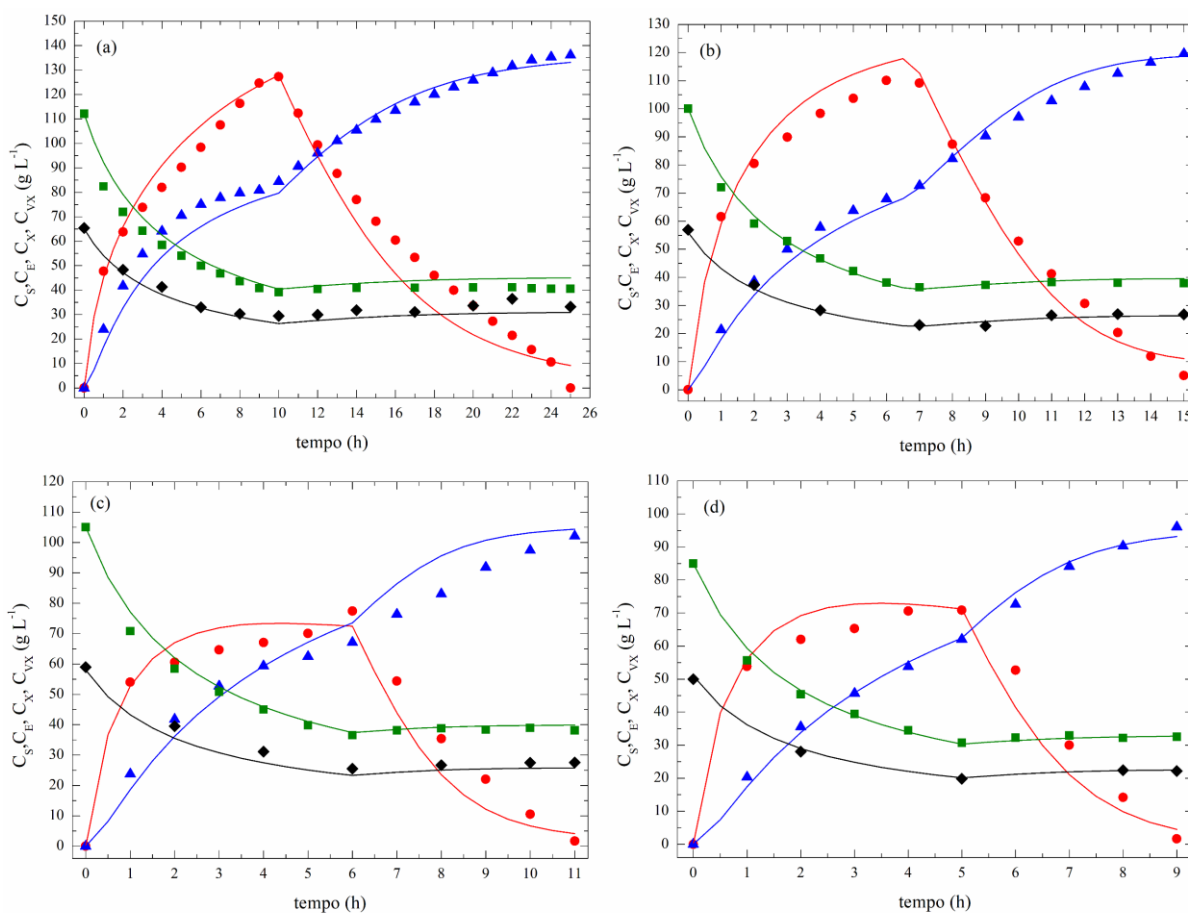
5.3.2. Validação experimental

A validação do modelo proposto e as correlações (Equações 5.9 e 5.10) empregaram quatro fermentações, em diferentes temperaturas, sob condições VHG/HCD. É importante notar que essas quatro condições de validação não foram utilizadas para estimar nenhum parâmetro do modelo. A **Figura 5.4** mostra os perfis de concentração de etanol, substrato, células totais e células viáveis obtidas para essas fermentações. As condições de validação (FV) são apresentadas na **Tabela 5.4**. Pode-se observar que o modelo proposto foi capaz de representar satisfatoriamente a cinética de fermentação alcoólica em batelada alimentada sob condições VHG/HCD. Isso provavelmente ocorreu porque o modelo usou apenas células viáveis (C_{VX}) como microrganismo consumidor de substrato e produtor de etanol, enquanto C_X foi usado apenas no termo de inibição celular do modelo cinético (Equação 5.6). Além disso, o modelo proposto considerou alterações no comportamento cinético devido a altas concentrações de substrato no mosto e altas densidades celulares, utilizando correlações para calcular os parâmetros m e $Y_{X/S}$.

Tabela 5.4– Condições experimentais para validação do modelo e valores dos parâmetros m e $Y_{X/S}$ obtidos a partir das correlações propostas (Equações 5.9 e 5.10, respectivamente).

Fermentação	T (°C)	C_{Sm} (g L ⁻¹)	C_{X0} (g L ⁻¹)	m (-)	$Y_{X/S}$ (gx gs ⁻¹)
FV1	28	436,0	112,0	2,81	0,0424
FV2	30	384,0	105,0	2,92	0,0405
FV3	32	337,0	100,0	2,42	0,0394
FV4	34	296,0	85,0	2,00	0,0356

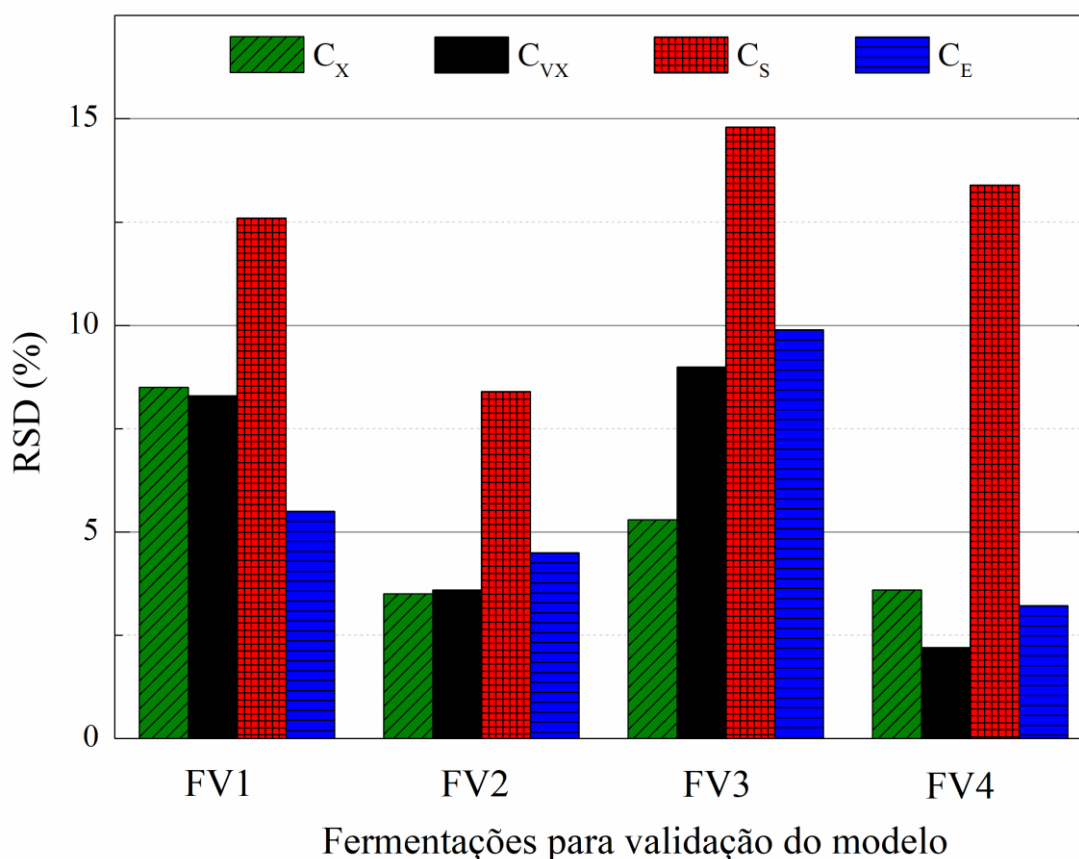
Figura 5.4 – Perfis simulados (linhas completas) e experimentais (símbolos), das concentrações de etanol (triângulos), substrato (círculos), células totais (quadrados) e células viáveis (losangos) nas fermentações em batelada alimentada com alta concentração de substrato e alta densidade celular: (a) FV1 (T=28 °C, C_{Sm} =436 g L⁻¹ e C_{X0} =112 g L⁻¹); (b) FV2 (T=30 °C, C_{Sm} =384 g L⁻¹ e C_{X0} =105 g L⁻¹); (c) FV3 (T=32 °C, C_{Sm} =337 g L⁻¹ e C_{X0} =100 g L⁻¹); e (d) FV4 (T=34 °C, C_{Sm} =296 g L⁻¹ e C_{X0} =85 g L⁻¹).



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Conforme mostrado na **Figura 5.5**, valores baixos de desvio padrão residual (RSD) foram obtidos para substrato (<15%), etanol (<10%), células totais (<8,5%) e células viáveis (<8,5%). Na engenharia de bioprocessos, valores de RSD <10% são considerados aceitáveis (ATALA, 2001). Para as fermentações FV1, FV3 e FV4, os valores de RSD para o substrato foram ligeiramente superiores a 10%. No entanto, em estudos de simulação, especialmente para a fermentação alcoólica em batelada alimentada, é comum observar maiores desvios para C_S (LEMOS *et al.*, 2020; RIVERA *et al.*, 2017; VELOSO *et al.*, 2019). Uma vez que o RSD é uma medida de quão bem o modelo representa um conjunto de dados, os baixos valores de RSD indicaram que o modelo proposto tem boa robustez preditiva para fermentações em batelada alimentada realizadas usando diferentes condições de entrada.

Figura 5.5 – Valores de RSD obtidos para previsões do modelo nas fermentações em batelada alimentada em diferentes temperaturas, sob condições de alta concentração de substrato no mosto (VHG) e alta densidade celular (fermentações FV1-FV4).



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

5.4. CONCLUSÕES

O modelo proposto foi capaz de prever a dinâmica comportamental da fermentação alcoólica em batelada alimentada, considerando três tipos de inibição (substrato, etanol e células). O uso de correlações matemáticas possibilitou a obtenção de parâmetros de modelo que são dependentes de variáveis de processo em amplas faixas de temperatura (28–34 °C), concentração de substrato no mosto (258–436 g L⁻¹), tamanho do inóculo (50–125 g L⁻¹) e concentração de etanol (80–135 g L⁻¹). Portanto, o modelo proposto contribui para estudos de simulação e otimização visando obter condições ótimas de operação para fermentação alcoólica em batelada alimentada (considerando temperatura, concentração celular e concentração de substrato no mosto), a fim de aumentar a produtividade em operações industriais em condições de VHG e HCD.

Capítulo VI

**ANÁLISE TÉRMICA DAS FERMENTAÇÕES
ALCOÓLICAS CONVENCIONAL E EXTRATIVA
EM DIFERENTES TEMPERATURAS**

6.1. INTRODUÇÃO

A fermentação a baixa temperatura (abaixo de 32 °C) tem sido amplamente estudada, pois com a redução da temperatura, há maior resistência das leveduras ao etanol (CRUZ; RESENDE; RIBEIRO, 2021; DIAS *et al.*, 2012; PHISALAPHONG; SRIRATTANA; TANTHAPANICHAKOON, 2006; RIVERA *et al.*, 2017; VELOSO *et al.*, 2019). Nestes casos, é possível alimentar mostos mais concentrados ($>357 \text{ g L}^{-1}$), resultando em vinhos com alto teor de etanol ($>15 \text{ }^\circ\text{GL}$ ou v v^{-1} a 20 °C), processo conhecido como fermentação VHG (do inglês, *very high gravity*) (PULIGUNDLA *et al.*, 2011). A tecnologia VHG promove diversos benefícios ambientais e econômicos, como redução do volume de vinhaça gerado, redução de água utilizada na diluição do mosto e menor consumo de vapor na etapa de destilação (PULIGUNDLA *et al.*, 2011; YAMAKAWA *et al.*, 2019). No entanto, quando a temperatura de fermentação é reduzida, pode haver um volume maior de água para resfriar o caldo, pois nestas condições a levedura gera mais calor (LÓPEZ; SECANELL, 1992; THEERARATTANANOON; LIN; PENG, 2008). À medida que o microrganismo cresce, o calor é gerado, independente da presença ou não de oxigênio (aeróbio ou anaeróbio) (LUONG; VOLESKY, 2022). López e Secanell (1992) propuseram um modelo matemático para calcular o calor gerado em diferentes temperaturas durante a fermentação na produção de vinho branco. A partir dos dados apresentados pelos autores, conclui-se que com a redução da temperatura de fermentação, a geração total de calor é maior. De acordo com diversos estudos na literatura, fermentações a baixas temperaturas resultam em maior viabilidade celular (ALDIGUIER *et al.*, 2004; AMILLASTRE *et al.*, 2012; VELOSO *et al.*, 2019; YAMAKAWA *et al.*, 2019) e, conseqüentemente, mais calor metabólico.

Uma tecnologia alternativa que vem se mostrando atrativa para a remoção do calor gerado é a fermentação extrativa por arraste gasoso com CO_2 (*CO₂ stripping*, em inglês) (ALMEIDA *et al.*, 2021; CAMPOS *et al.*, 2022). Nesse processo, o fluxo de gás promove a vaporização do etanol e da água, retirando calor do sistema (SILVA *et al.*, 2015). Almeida *et al.* (2021) realizaram fermentações convencionais e extrativas a 34 °C por *stripping*, com vazões específicas de CO_2 de 0,5 e 1 vvm, e mostraram a eficiência dessa técnica na remoção de calor, resultando em economia de até 62,7% na água de resfriamento. Campos *et al.* (2022) avaliaram, por simulações, a fermentação extrativa com CO_2 sob diferentes condições de substrato, a 34 °C, encontrando para cada condição uma vazão de gás ótima para remover o inibidor e ao mesmo tempo minimizar o volume de água para manter a temperatura da dorna

constante. No entanto, até onde sabemos, não há estudos relacionados à economia de água utilizada na fermentação extrativa VHG a baixas temperaturas. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os calores envolvidos em fermentações convencionais e extrativas por arraste gasoso com CO₂, em diferentes temperaturas. Utilizando um modelo matemático obtido a partir do balanço de massa e energia, foram realizadas simulações para encontrar as condições ideais para a aplicação da técnica de *stripping* (vazão de gás, tempos de início e parada) para economizar água na fermentação VHG extrativa a baixa temperatura (28 °C).

6.2. MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1. Microrganismo e meio de cultura

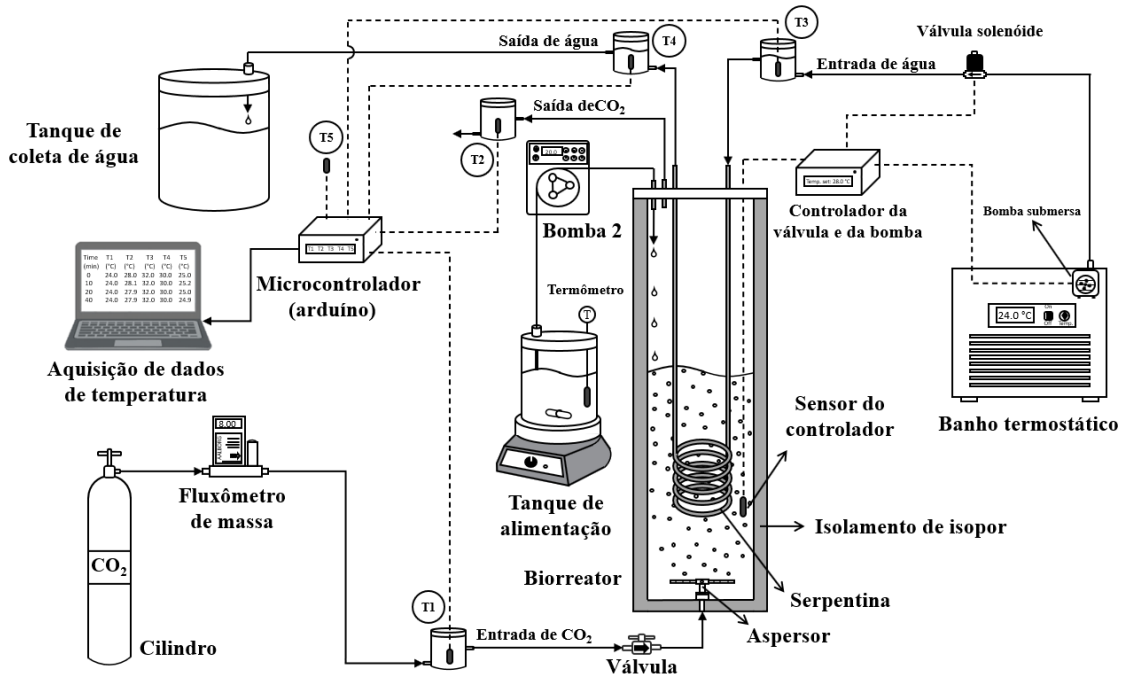
O microrganismo utilizado neste estudo foi a levedura industrial liofilizada *S. cerevisiae* Y-904. O mosto (7 L) simulou melaço de cana industrial diluído com caldo de cana-de-açúcar e foi composto por sacarose (na faixa de 281–353 g L⁻¹, equivalente a 296–371 g L⁻¹ ART), extrato de levedura (11,7 g L⁻¹), KH₂PO₄ (9,6 g L⁻¹), ureia (9,1 g L⁻¹) e MgSO₄.7H₂O (2,4 g L⁻¹). Uma solução de HCl 1,0 M foi adicionada para regular o pH em 4,6.

6.2.2. Procedimento experimental

Fermentações convencionais e extrativas em batelada alimentada foram realizadas em um biorreator pneumático tipo coluna de bolhas feito de vidro borossilicato (volume de trabalho de 10 L, diâmetro interno de 16,0 cm, altura do líquido de 49,5 cm, altura total de 67,6 cm). Para reduzir a perda de calor pela parede, o biorreator foi isolado com camadas de isopor resultando em diâmetro externo de 28,2 cm. Nas fermentações extrativas, o CO₂ foi injetado no biorreator através de um aspersor do tipo cruzeta com 180 orifícios com diâmetro de 0,5 mm, espaçados de 2,0 mm.

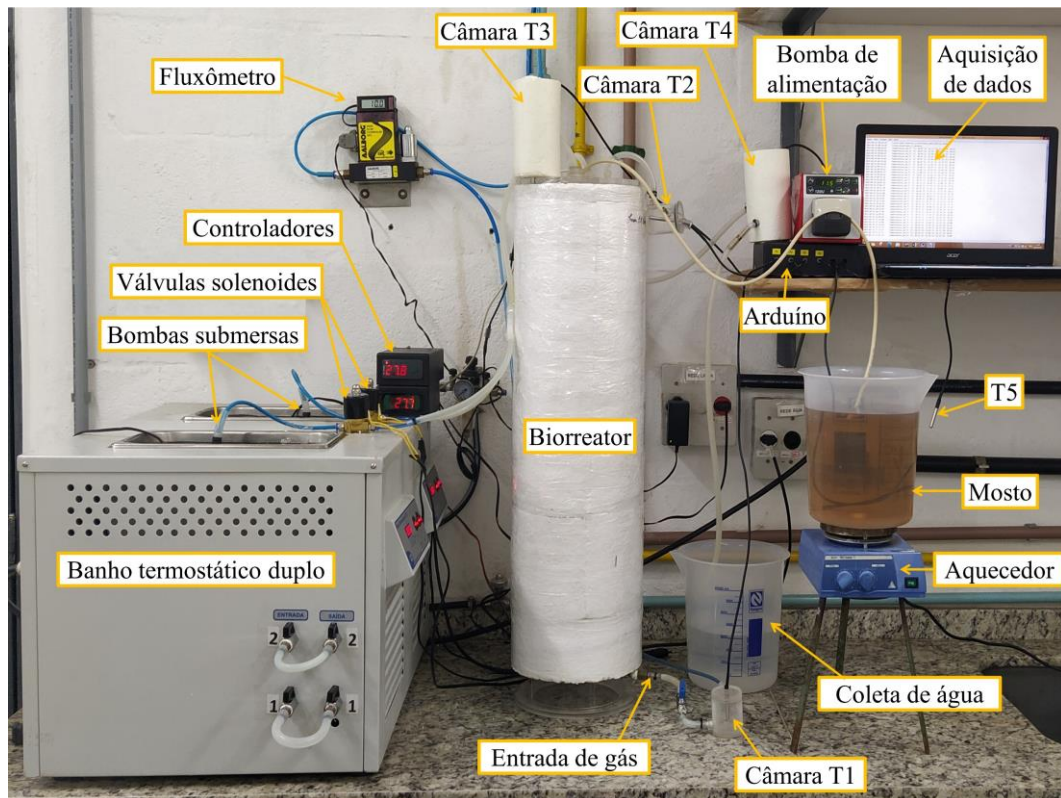
A **Figura 6.1** mostra o aparato utilizado nas fermentações extrativas em batelada alimentada. A imagem da bancada de trabalho é mostrada na **Figura 6.2**.

Figura 6.1 – Ilustração esquemática do aparato experimental usado nas fermentações extrativas por arraste gasoso com CO₂ em batelada alimentada.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 6.2 – Bancada de trabalho dos experimentos de análise térmica da fermentação extrativa por arraste gasoso com CO₂ em batelada alimentada em diferentes temperaturas.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

A levedura (300 g) foi previamente hidratada em 3 L de água destilada (inóculo, correspondente a 30% do volume de trabalho). A temperatura do inóculo foi inicialmente regulada para cada condição (28 e 34 °C) usando um banho termostático (SL-152, Solab) que recirculou a água através de uma serpentina no interior do biorreator. Após 20 min de aclimatação na temperatura desejada, iniciou-se a alimentação do mosto (7 L) com vazão de alimentação constante (F) utilizando uma bomba peristáltica (Modelo 120 U, Watson-Marlow). A temperatura do mosto foi mantida a 30 °C em todas as fermentações.

Nas fermentações extrativas, o gás utilizado foi CO₂ comercial (99,5% de pureza) proveniente de um cilindro (25 kg e 60 atm quando cheio), que passou pelo fluxômetro de massa (GFC 37, Aalborg) e uma câmara de aquisição de temperatura T1 (**Figura 6.1**) antes de ser inserido no biorreator. A temperatura da corrente de saída de CO₂ também foi monitorada na câmara T2. A diferença entre a temperatura da água de entrada (T3) e a temperatura do caldo de fermentação foi fixada em 4 °C em todas as fermentações. Água proveniente de um banho termostático foi utilizada para controle da temperatura, por meio da recirculação em uma serpentina (dentro do biorreator) utilizando uma bomba submersa (HJ-741, Sunsun). A bomba operou com vazão de 15 L h⁻¹ e só foi acionada quando a temperatura do caldo oscilou em $\pm 0,3$ °C em relação à temperatura desejada em cada condição (*setpoint*). Um controlador liga/desliga (MT 512, Full Gauge) com sensor de temperatura imerso no caldo de fermentação foi utilizado para acionar a bomba. Uma válvula solenóide, conectada ao controlador, também foi utilizada para evitar a passagem indesejada de água (devido ao deslocamento de nível). O fluxo de água de saída foi conduzido para um tanque de armazenamento e o volume foi medido a cada hora. As temperaturas da água de saída (T4) e externa (ambiente, T5) também foram medidas. A aquisição de dados de T1, T2, T3, T4 e T5 foi realizada a cada 10 minutos por meio de sensores conectados a um microcontrolador (Arduino). Todos os sensores de temperatura foram previamente calibrados com um calibrador *dry-block* (DB-35L, Techne).

A cada hora uma amostra (2 mL) do caldo de fermentação foi retirada para quantificar células totais e viáveis, substrato e etanol. Para reduzir o excesso de espuma, um agente antiespumante comercial (Qualifoam) foi adicionado quando necessário. Nas fermentações convencionais o mesmo procedimento foi realizado, exceto que nenhum gás foi injetado no biorreator, o aspersor foi removido e um sistema motor/impelidor (Gehaka, AM-20) a 250 rpm foi utilizado para garantir a homogeneização do caldo de fermentação. Todas as fermentações foram realizadas em duplicata.

6.2.3. Modelagem das fermentações convencional e extrativa

6.2.3.1. Balanço de massa

O modelo matemático para fermentações extrativas por arraste gasoso com CO₂ em batelada alimentada foi obtido a partir do balanço de massa e considerou o etanol produzido associado ao crescimento celular. O balanço de massa para células totais (X), células viáveis (VX), etanol (E) e substrato (S), bem como o balanço de massa total, considerou a remoção de etanol e água e a variação de volume devido ao arraste, resultando em cinco equações diferenciais (Equações 6.1–6.5). Além disso, os balanços de massa para etanol e substrato também consideraram o volume ocupado pelas células (modelo desenvolvido no **Capítulo IV**).

$$\frac{dC_X}{dt} = \mu \cdot C_{VX} - (dV/dt)/V \cdot C_X \quad (6.1)$$

$$\frac{dC_{VX}}{dt} = (\mu - (dV/dt)/V) \cdot C_{VX} \quad (6.2)$$

$$\frac{dC_S}{dt} = \frac{C_{Sm} \cdot F/V - (dV/dt) \cdot C_S/V + \mu C_{VX} \cdot (C_S/\rho_B - 1/Y_{X/S})}{(1 - C_X/\rho_B)} \quad (6.3)$$

$$\frac{dC_E}{dt} = \frac{((Y_{E/S}/Y_{X/S}) + C_E \cdot (1 - \gamma_E)/\rho_B) \cdot \mu C_{VX} - (k_E - k_E \cdot C_X/\rho_B + (dV/dt)/V) \cdot C_E}{(1 + (\gamma_E - 1) \cdot C_X/\rho_B)} \quad (6.4)$$

$$\frac{dV}{dt} = F - \frac{(C_E \cdot k_E + k_A \cdot (\rho_A - C_E)) \cdot V \cdot (1 - C_X/\rho_B)}{\rho_A} \quad (6.5)$$

em que C_X é a concentração celular total (g L⁻¹), μ é a velocidade específica de crescimento celular (h⁻¹), C_{VX} é a concentração de células viáveis (g L⁻¹), F é a vazão de alimentação de mosto (L h⁻¹), V é o volume de caldo (L), C_S é a concentração de substrato limitante (ART) (g L⁻¹), C_{Sm} é a concentração de substrato no mosto (g L⁻¹), C_E é a concentração de etanol (g L⁻¹), $Y_{X/S}$ é o coeficiente de rendimento de substrato a células (gx gs⁻¹), $Y_{E/S}$ é o coeficiente de rendimento de substrato a etanol (g_E gs⁻¹), k_E é a constante de velocidade de remoção de etanol (h⁻¹), k_A é a constante de velocidade de remoção de água (h⁻¹), ρ_B é a densidade da levedura em gramas de massa seca por unidade de volume de célula úmida (g L⁻¹), γ_E é o coeficiente de partição de equilíbrio para o etanol (adimensional) e ρ_A é a massa específica da água (g L⁻¹).

O crescimento celular foi descrito pelo modelo cinético híbrido (Equação 6.6) que considera a inibição por substrato (ANDREWS, 1968), etanol (LEVENSPIEL, 1980) e células (LEE; POLLARD; COULMAN, 1983).

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S + \frac{C_S^2}{K_{IS}}} \cdot \left(1 - \frac{C_E}{C_{Emax}}\right)^n \cdot \left(1 - \frac{C_X}{C_{Xmax}}\right)^m \quad (6.6)$$

em que μ_{max} é a velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1}), K_S é a constante de saturação ($g L^{-1}$), K_{IS} é a constante de inibição pelo substrato ($g L^{-1}$), C_{Emax} é a concentração máxima de etanol após a qual o crescimento celular cessa ($g L^{-1}$), n é a potência de inibição do produto (adimensional), C_{Xmax} é a concentração celular máxima após a qual o crescimento celular cessa ($g L^{-1}$) e m é a potência de inibição da célula (adimensional).

Nas fermentações extrativas, as constantes de velocidade de remoção de etanol e água foram calculadas por meio de equações obtidas a partir de um delineamento composto central rotacional de dois níveis (DCCR), conforme metodologia proposta por Rodrigues *et al.* (2018) (Equações 6.7 e 6.8). Os experimentos foram realizados utilizando solução hidroalcoólica com concentração inicial de etanol de $80 g L^{-1}$. As variáveis consideradas foram a temperatura da solução e a vazão específica de gás (ϕ_{CO_2}), na faixa de 28 a 34 °C e 0,3 a 4,0 vvm, respectivamente. O DCCR foi composto por 4 pontos fatoriais, 4 pontos axiais e 3 pontos centrais, totalizando 11 experimentos. O *software* Statistica v. 7.0 foi usado para obter a regressão.

$$k_E = 2,044 \cdot 10^{-2} \cdot \phi_{CO_2} + 2,649 \cdot 10^{-3} \cdot T - 7,484 \cdot 10^{-2} \quad (6.7)$$

$$k_A = 2,33 \cdot 10^{-4} \cdot (\phi_{CO_2})^2 + 1,59 \cdot 10^{-3} \cdot \phi_{CO_2} + 3,31 \cdot 10^{-4} \cdot T - 9,17 \cdot 10^{-3} \quad (6.8)$$

em que T é a temperatura do caldo (°C) e ϕ_{CO_2} é a vazão específica de CO_2 (vvm).

A vazão específica de gás foi calculada como a razão entre a vazão volumétrica de CO_2 e o volume da fase líquida no reator.

$$\phi_{CO_2} = \frac{F_{CO_2}}{60 \cdot V} \quad (6.9)$$

em que F_{CO_2} é a vazão volumétrica de dióxido de carbono ($L h^{-1}$).

No balanço de massa para fermentações convencionais, k_E e k_A foram iguais a zero, pois não houve inserção de gás no sistema ($F_{CO_2}=0$) e conseqüentemente não houve remoção de etanol e água por arraste com CO_2 . Da mesma forma, nas fermentações extrativas essas constantes foram consideradas iguais a zero ($k_E=k_A=0$) somente a partir do momento de interrupção da vazão de gás ($F_{CO_2}=0$).

6.2.3.2. Balanço de energia

O balanço de energia para fermentação extrativa em estado estacionário resultou na Equação 6.10, que considerou os seguintes termos (em $kJ h^{-1}$): a taxa de geração de calor metabólico (\dot{Q}_{met}), a taxa de variação de entalpia devido à alimentação do mosto ($\Delta\dot{H}_m$), a taxa de calor trocada com a água na serpentina (\dot{Q}_A), a taxa de perda de calor através da parede do biorreator (\dot{Q}_P), a taxa de remoção de calor devido à vaporização de etanol e água ($\Delta\dot{H}_{vap}$) e a taxa de remoção de calor devido à diferença de entalpia entre as correntes de CO_2 de entrada e saída (\dot{Q}_{CO_2}).

$$\dot{Q}_{met} + \Delta\dot{H}_m = \dot{Q}_A + \dot{Q}_P + \Delta\dot{H}_{vap} + \dot{Q}_{CO_2} \quad (6.10)$$

Os termos $\Delta\dot{H}_m$, \dot{Q}_A , \dot{Q}_P e \dot{Q}_{CO_2} foram representados pelas Equações 6.11, 6.12, 6.13 e 6.14, respectivamente (ALMEIDA *et al.*, 2021; CAMPOS *et al.*, 2022).

$$\Delta\dot{H}_m = \rho_A \cdot F \cdot c_{pA} \cdot (T_m - T) \quad (6.11)$$

$$\dot{Q}_A = \rho_A \cdot F_A \cdot c_{pA} \cdot (T_{A,sai} - T_{A,entra}) \quad (6.12)$$

$$\dot{Q}_P = U \cdot A \cdot (T - T_{ext}) \quad (6.13)$$

$$\dot{Q}_{CO_2} = \rho_{CO_2} \cdot F_{CO_2} \cdot c_{pCO_2} \cdot (T_{CO_2,sai} - T_{CO_2,entra}) \quad (6.14)$$

em que c_{pA} é a capacidade calorífica da água a pressão constante ($kJ g^{-1} °C^{-1}$), T_m é a temperatura do mosto ($°C$), F_A é a vazão volumétrica de água ($L h^{-1}$), $T_{A,sai}$ e $T_{A,entra}$ são as temperaturas das águas de saída e entrada ($°C$), respectivamente, U é o coeficiente global de transferência de calor do biorreator ($kJ h^{-1} °C^{-1} m^{-2}$), A é a área de transferência de calor do biorreator (superfície externa do biorreator) (m^2), T_{ext} é a temperatura ambiente ($°C$), ρ_{CO_2} é a massa específica do dióxido de carbono ($g L^{-1}$), c_{pCO_2} é a capacidade calorífica do dióxido de carbono a pressão constante ($kJ g^{-1} °C^{-1}$) e $T_{CO_2,sai}$ e $T_{CO_2,entra}$ são as temperaturas de saída e entrada do dióxido de carbono ($°C$), respectivamente.

A taxa de remoção de calor devido à vaporização de etanol e água foi calculada pela Equação 6.15 (ALMEIDA *et al.*, 2021; CAMPOS *et al.*, 2022).

$$\begin{aligned} \Delta \dot{H}_{vap} = & \frac{k_E \cdot C_E \cdot V}{MM_E} \Delta \hat{H}_{vap,E} + \frac{k_A \cdot (\rho_A - C_E) \cdot V}{MM_A} \Delta \hat{H}_{vap,A} \\ & + \left(\frac{k_E \cdot C_E \cdot V}{MM_E} + \frac{k_A \cdot (\rho_A - C_E) \cdot V}{MM_A} \right) \cdot (-\Delta \hat{H}_{mix}) \end{aligned} \quad (6.15)$$

em que MM_E é a massa molar do etanol (g mol^{-1}), $\Delta \hat{H}_{vap,E}$ é a entalpia específica de vaporização do etanol (kJ mol^{-1}), MM_A é a massa molar da água (g mol^{-1}), $\Delta \hat{H}_{vap,A}$ é a entalpia específica de vaporização da água (kJ mol^{-1}) e $\Delta \hat{H}_{mix}$ é a entalpia específica da mistura (kJ mol^{-1}) calculada a partir da correlação proposto por Boyne e Williamson (1967), de acordo com a Equação 6.16.

$$\begin{aligned} \Delta \hat{H}_{mix} = & x_E \cdot (1 - x_E) \\ & \cdot [1,580 + 1,785 \cdot (1 - 2 \cdot x_E) + 3,487 \cdot (1 - 2 \cdot x_E)^2 + 3,187 \\ & \cdot (1 - 2 \cdot x_E)^3 + 1,957 \cdot (1 - 2 \cdot x_E)^4] \end{aligned} \quad (6.16)$$

em que x_E é a fração molar de etanol na fase líquida.

Portanto, substituindo as Equações 6.11–6.15 na Equação 6.10, a geração de calor metabólico devido ao crescimento celular pode ser calculada pela Equação 6.17 a partir dos dados experimentais.

$$\begin{aligned} \dot{Q}_{met} = & -\rho_A \cdot F \cdot c_{p_A} \cdot (T_m - T) + \rho_A \cdot F_A \cdot c_{p_A} \cdot (T_{A,sai} - T_{A,entra}) + U \cdot A \\ & \cdot (T - T_{ext}) + \rho_{CO_2} \cdot F_{CO_2} \cdot c_{p_{CO_2}} \cdot (T_{CO_2,sai} - T_{CO_2,entra}) \\ & + \frac{k_E \cdot C_E \cdot V}{MM_E} \Delta \hat{H}_{vap,E} + \frac{k_A \cdot (\rho_A - C_E) \cdot V}{MM_A} \Delta \hat{H}_{vap,A} \\ & - \left(\frac{k_E \cdot C_E \cdot V}{MM_E} + \frac{k_A \cdot (\rho_A - C_E) \cdot V}{MM_A} \right) \cdot \Delta \hat{H}_{mix} \end{aligned} \quad (6.17)$$

Assim como no balanço de massa, no balanço de energia para fermentações convencionais, k_E e k_A e foram iguais a zero. Da mesma forma, nas fermentações extrativas essas constantes foram consideradas iguais a zero ($k_E=k_A=0$) somente a partir do momento de interrupção da vazão de gás ($F_{CO_2}=0$).

6.2.4. Simulações das fermentações convencionais e extrativas

Usando o modelo descrito, as fermentações em batelada alimentada foram simuladas em diferentes temperaturas. As simulações foram realizadas no *software* Scilab (v. 6.1.1) e considerado o biorreator com 10 L de volume de trabalho. Nas simulações, a taxa de geração de calor metabólico foi obtida usando a Equação 6.18 (SHULER; KARGI, 2002) e comparada com os valores experimentais obtidos (Equação 6.17).

$$\dot{Q}_{met,Sim} = \frac{\mu \cdot C_{VX} \cdot V}{Y_H} \quad (6.18)$$

em que $1/Y_H$ é o calor metabólico produzido por grama de massa celular produzida (kJ gx^{-1}).

Conhecendo $\dot{Q}_{met,Sim}$, é possível obter \dot{Q}_A usando a Equação 6.10 e calcular F_A pela Equação 6.12 em cada instante de tempo. O volume total de água (V_A) para manter constante a temperatura do caldo ($dT/dt=0$) em cada cenário simulado foi obtido integrando F_A , conforme Equação 6.19.

$$V_A = \int F_A dt \quad (6.19)$$

Os parâmetros cinéticos (Equação 6.6), os coeficientes de rendimento e os parâmetros usados no balanço de energia são mostrados no **Quadro 6.1**.

Quadro 6.1 – Parâmetros utilizados no balanço de energia, parâmetros cinéticos e coeficientes de rendimento utilizados na modelagem e simulação da fermentação alcoólica em diferentes temperaturas.

Parâmetros	Unidades	Equações/Valores	Referências
Y_H	gx kJ ⁻¹	0,1	Shuler e Kargi (2002)
γ_E	-	0,78	Monbouquette (1992)
ρ_B	gx L ⁻¹	390,0	Monbouquette (1987)
ρ_A^a	g L ⁻¹	$1004,7 \cdot e^{-0,0003 \cdot T(^{\circ}C)}$	Haynes(2015)
ρ_{CO_2}	g L ⁻¹	1,8	Haynes (2015)
c_{pA}	kJ g ⁻¹ °C ⁻¹	0,0042	Haynes (2015)
c_{pCO_2}	kJ g ⁻¹ °C ⁻¹	0,000864	Haynes (2015)
MM_E	g mol ⁻¹	46,07	Haynes (2015)
MM_A	g mol ⁻¹	18,02	Haynes (2015)
$\Delta\hat{H}_{vap,E}$	kJ mol ⁻¹	38,14	Perry <i>et al.</i> (1999)
$\Delta\hat{H}_{vap,A}$	kJ mol ⁻¹	43,73	Perry <i>et al.</i> (1999)
U^b	kJ h ⁻¹ °C ⁻¹ m ⁻²	5,64	Silva <i>et al.</i> (2015)
μ_{max}	h ⁻¹	$4,05 \cdot 10^6 \cdot e^{-\frac{5139,2}{T(K)}}$	Veloso <i>et al.</i> (2019)
K_S	g L ⁻¹	$14,35 \cdot e^{7,64 \cdot \left(\frac{T(^{\circ}C)-28}{28}\right)}$	Veloso <i>et al.</i> (2019)
K_{IS}	g L ⁻¹	170,0	Veloso <i>et al.</i> (2019)
C_{Emax}	g L ⁻¹	$138,45 \cdot e^{-1,88 \cdot \left(\frac{T(^{\circ}C)-28}{28}\right)}$	Veloso <i>et al.</i> (2019)
C_{Xmax}	g L ⁻¹	320,0	Monbouquette (1992)
n	-	$0,143 \cdot \left(\frac{C_{Ef}}{80,0}\right)^{3,56}$	Veloso <i>et al.</i> (2019)
m^c	-	$361 \cdot \left(e^{\left(\frac{3,21}{C_{X0}} - 0,0343 \cdot T(^{\circ}C)\right)} - \frac{10,8}{T(^{\circ}C)}\right)$	Capítulo V
$Y_{X/S}^c$	gx gs ⁻¹	$\frac{(C_{Sm} \cdot C_{X0}) \cdot 10^{-3}}{2,68 \cdot (C_{Sm} + C_{X0}) - 309,8}$	Capítulo V
$Y_{E/S}$	gE gs ⁻¹	0,46	Veloso <i>et al.</i> (2019)

^aCorrelação obtida a partir de dados obtidos na literatura; ^bValor determinado de acordo com Silva *et al.* (2015);

^cCorrelações obtidas no **Capítulo V** da presente tese de doutorado.

6.2.5. Métodos analíticos

As amostras do caldo de fermentação foram centrifugadas a $10.414\times g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min (5810-R, Eppendorf). O sobrenadante foi separado da massa de sedimento (células). As células foram lavadas com água destilada e secas a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ em estufa. A concentração celular total (C_X) foi obtida pela razão entre a massa de sedimento seco e o volume retirado da amostra. A viabilidade celular foi determinada pelo método do azul de metileno (LEE; ROBINSON; WANG, 1981) usando uma câmara de Neubauer (Bright Line, Boeco Germany) e um microscópio óptico (BX 51, Olympus). A concentração de células viáveis (C_{VX}) foi determinada multiplicando C_X pela viabilidade celular.

O sobrenadante foi diluído (1:20) em água ultrapura e filtrado usando um filtro de nylon ($25\text{ }\mu\text{m}$). As concentrações de sacarose, glicose, frutose e etanol foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (Modelo 717plus Autosampler, Waters, EUA) equipada com uma coluna Sugar-Pak I ($300 \times 6,5\text{ mm}$, $10\text{ }\mu\text{m}$, Waters) a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ acoplada a um detector de índice de refração (Modelo 2414, Waters, EUA) operado a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Uma solução de 50 mg L^{-1} de hidrato de etilenodiaminotetraacetato de cálcio dissódico (em água ultrapura) foi usada como eluente a uma vazão de $0,5\text{ mL min}^{-1}$. Soluções de reagentes puros com concentrações entre $0,1$ e $0,8\text{ g L}^{-1}$ foram usadas como padrão para todos os compostos.

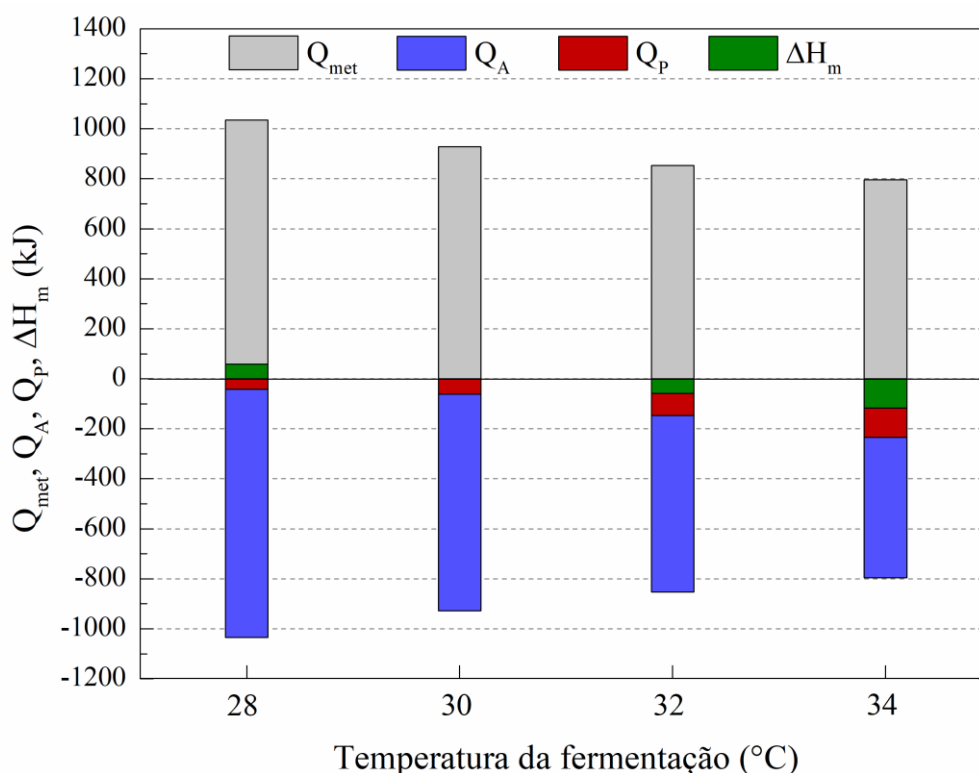
6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1. Efeito da temperatura nos calores envolvidos na fermentação convencional

Simulações de fermentações convencionais em batelada alimentada em diferentes temperaturas (28 , 30 , 32 e $34\text{ }^{\circ}\text{C}$) com $C_{X0}=100\text{ g L}^{-1}$ e $C_{Sm}=300\text{ g L}^{-1}$ foram realizadas usando o modelo descrito, considerando $T_m=30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (temperatura do mosto) e $T_{ext}=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (temperatura externa). A **Figura 6.3** mostra a contribuição de cada termo do balanço de energia ($Q_{met,Sim}$, Q_A , Q_P e ΔH_m) obtido a partir da integração das Equações 6.11–6.13 e Equação 6.18. Valores negativos denotam a energia removida do sistema (caldo de fermentação), enquanto valores positivos denotam os termos que contribuem para aumentar a energia no sistema. De acordo com as simulações, houve um aumento na geração de calor metabólico ($Q_{met,Sim}$) com a redução da temperatura de fermentação, corroborando a literatura (LÓPEZ; SECANELL, 1992). Portanto, para manter a temperatura do caldo constante, o calor removido pela água (Q_A)

deve ser maior para fermentações a baixas temperaturas. A perda de calor através da parede foi maior para altas temperaturas devido ao maior gradiente entre a temperatura externa e a temperatura do caldo. Nas simulações a 32 e 34 °C a energia devido ao substrato alimentado (ΔH_m), contribuiu para diminuir a temperatura, enquanto para 28 °C ΔH_m contribuiu para o aumento da temperatura e a 30 °C não houve contribuição de energia devido à alimentação de mosto ($\Delta H_m=0$).

Figura 6.3 – Contribuição de cada termo do balanço de energia das fermentações convencionais em batelada alimentada com $C_{X0}=100 \text{ g L}^{-1}$ e $C_{Sm}=300 \text{ g L}^{-1}$ a 28, 30, 32 e 34 °C.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Para validar a metodologia proposta, foram realizadas fermentações convencionais em batelada alimentada (CF) a 28 °C (CF_{28}) e 34 °C (CF_{34}). A **Tabela 6.1** mostra as condições experimentais das fermentações realizadas neste estudo, bem como os principais resultados. É importante destacar que em todas as fermentações a temperatura do caldo não apresentou variações significativas, pois o controlador acionou a bomba quando a temperatura do caldo oscilou em $\pm 0,3$ °C em relação ao *setpoint*. Portanto, as temperaturas de fermentação foram consideradas constantes, uma vez que a oscilação não ultrapassou 1%. A partir do volume de água coletado, obteve-se uma curva de acúmulo de volume em função do tempo. Uma equação

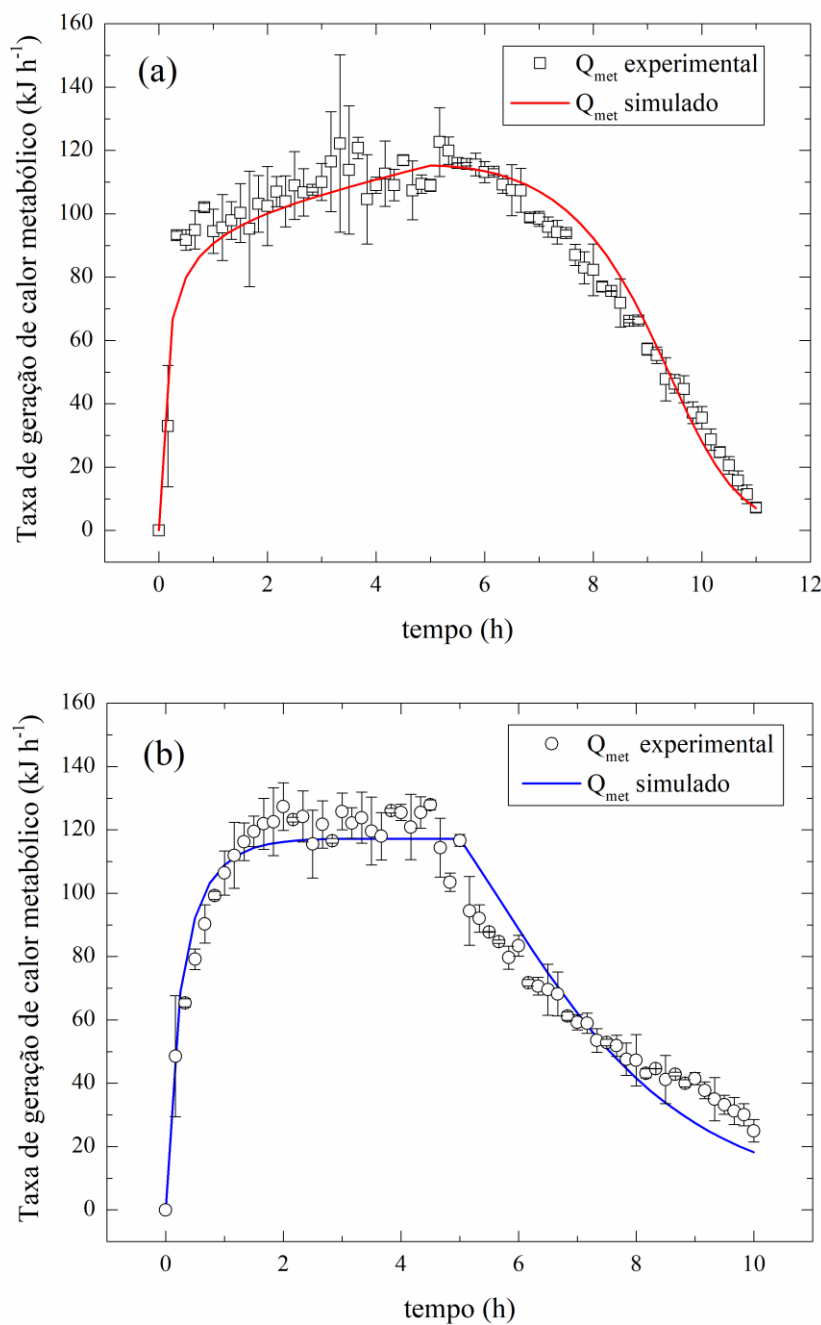
foi ajustada a esta curva e derivada para obter F_A . Portanto, foi possível calcular o valor experimental de Q_{met} (Equação 6.17) uma vez que alguns termos foram medidos ou calculados a partir dos dados experimentais ($U, A, F, F_A, T, T_m, T_{A,entra}, T_{A,sai}$ e T_{ext}) e os demais são propriedades físicas dos fluidos (ρ_A e c_{pA}). A **Figura 6.4** mostra a semelhança entre os perfis de taxa de geração de calor experimental e simulado (Equação 6.18) para CF_{28} e CF_{34} . Para obter a quantidade total de calor metabólico gerado, a área sob a curva foi calculada. Para CF_{28} , $Q_{met,Sim}=957,0$ kJ e $Q_{met,Exp}=959,8$ kJ, resultando em uma diferença de 0,2%. Para CF_{34} , $Q_{met,Sim}=830,6$ kJ e $Q_{met,Exp}=841,2$ kJ, resultando em uma diferença de 1,3%. Esses resultados indicam que a metodologia proposta é adequada para descrever o comportamento energético da fermentação em batelada alimentada.

Tabela 6.1– Condições experimentais e principais resultados das fermentações convencionais (CF) e extrativas (EF).

	Fermentações em batelada alimentada				
	CF ₃₄	CF ₂₈	EF ₃₄	EF ₂₈	EF _{28VHG}
T (°C)	34	28	34	28	28
F_{CO₂} (L h⁻¹)	-	-	540	900	600
t_{início}(h)	-	-	0	0	0
t_{parada} (h)	-	-	7,5	8,5	14,0
C_{Sm} (g L⁻¹)	299,5	297,7	301,8	300,3	371,7
C_{Etotal} (g L⁻¹)	95,1	94,9	95,0	95,0	120,0
V_E (L)	1,20	1,20	1,20	1,20	1,52
V_A (L)	30,6	50,6	10,1	17,0	19,3
V_A/V_E (-)	25,4	42,0	8,4	14,1	12,7
V_A/V_{Aref} (%)	100,0	100,0	33,0	33,6	38,1

T é a temperatura do caldo, F_{CO_2} é a vazão volumétrica de dióxido de carbono, $t_{início}$ é o tempo de início do arraste gasoso, t_{parada} é o tempo de parada do arraste gasoso, C_{Sm} é a concentração de substrato no mosto, C_{Etotal} é a concentração total de etanol, V_E é o volume de etanol produzido, V_A é o volume de água para controle de temperatura e V_{Aref} é o volume de água de referência para controle de temperatura em fermentações convencionais. V_{Aref} para EF_{28} e EF_{28VHG} foi V_A obtida em CF_{28} , enquanto V_{Aref} para EF_{34} foi V_A obtida em CF_{34} .

Figura 6.4 – Taxa de geração de calor metabólico experimental (símbolos) e simulada (linha) durante a fermentação convencional em batelada alimentada a (a) 28 °C (CF_{28}) e (b) 34 °C (CF_{34}). As barras verticais representam o desvio padrão da média para cada ponto.

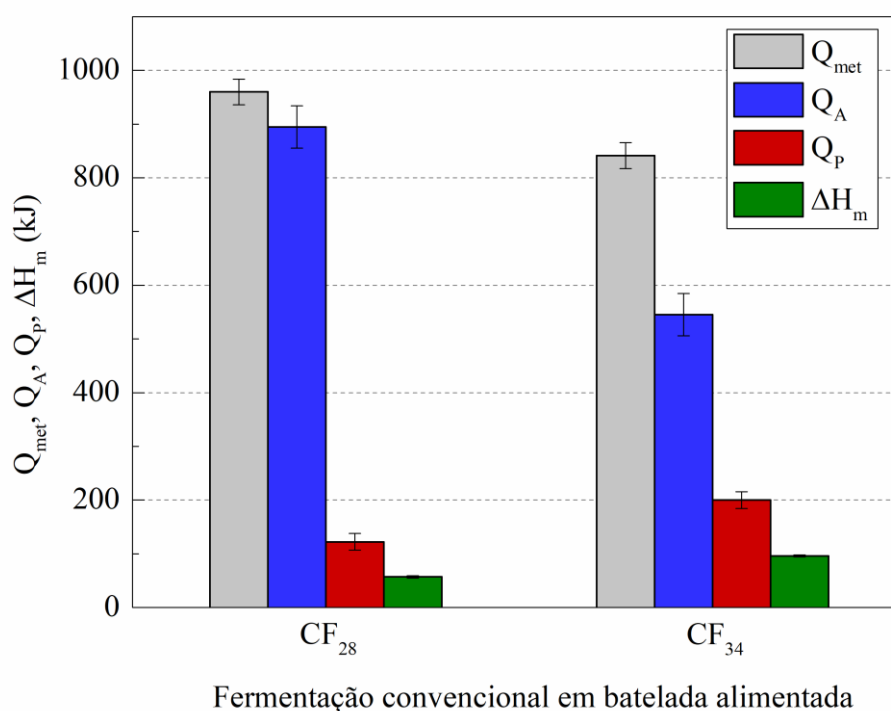


Fonte: Arquivo pessoal do autor.

A **Figura 6.5** mostra a contribuição de cada termo do balanço de energia para as fermentações CF_{28} e CF_{34} , calculada a partir dos dados experimentais. Para CF_{28} , a temperatura externa foi em média $T_{ext}=21,5$ °C e para CF_{34} , $T_{ext}=22,3$ °C. Em ambas as fermentações a temperatura do mosto foi $T_m=30$ °C. Em CF_{28} a energia do mosto (57 kJ) contribuiu para o aumento de energia no sistema, sendo responsável por 5,6% do calor do sistema, enquanto Q_{met}

(959,8 kJ) foi responsável por 94,4% do aquecimento do sistema. Os termos que contribuíram para o resfriamento do caldo de fermentação foram Q_A e Q_P , representando 88 e 12% do calor removido, respectivamente. Em CF_{34} o único termo que contribuiu para o aumento da temperatura foi Q_{met} (841,2 kJ). As contribuições dos termos Q_A , Q_P e ΔH_m para o sistema de refrigeração foram 64,8; 23,8 e 11,4%, respectivamente.

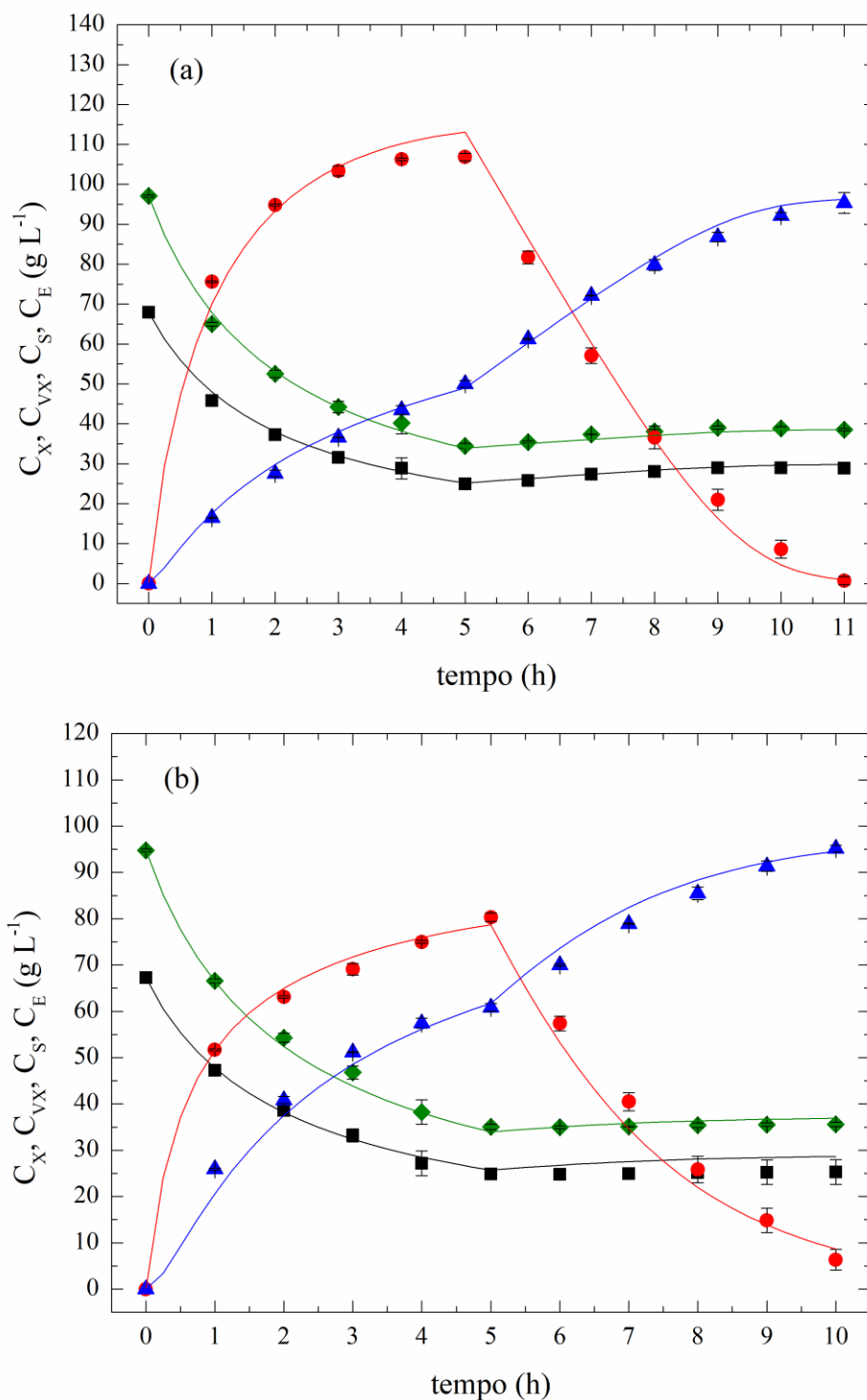
Figura 6.5 – Contribuição de cada termo do balanço de energia em fermentações convencionais em batelada alimentada CF_{28} e CF_{34} , com base em dados experimentais. As barras verticais representam o desvio padrão da média.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Usando o modelo cinético descrito, as fermentações CF_{28} e CF_{34} foram modeladas e os perfis de C_X , C_{VX} , C_S e C_E são mostrados na **Figura 6.6**. A partir da modelagem, foi possível obter o volume de água de resfriamento utilizado em cada fermentação e compará-lo com os dados experimentais. A quantidade de água de resfriamento obtida pelo modelo foi de 49,6 L em CF_{28} e 29,9 L em CF_{34} , resultando em uma diferença inferior a 2,5% (para ambas as fermentações) em relação aos dados experimentais (**Tabela 6.1**). Nas fermentações convencionais observa-se que a quantidade de água em CF_{28} foi cerca de 65% maior que o volume total de água utilizado para resfriar CF_{34} . Portanto, o modelo utilizado neste estudo foi satisfatório tanto para prever a cinética da fermentação alcoólica quanto para descrever o comportamento energético do processo.

Figura 6.6 – Perfis simulados (linhas) e experimentais (símbolos) das concentrações de substrato (círculos), etanol (triângulos), células viáveis (quadrados) e células totais (losangos): (a) 28 °C (CF_{28}) e (b) 34 °C (CF_{34}). As barras verticais representam o desvio padrão da média para cada ponto.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

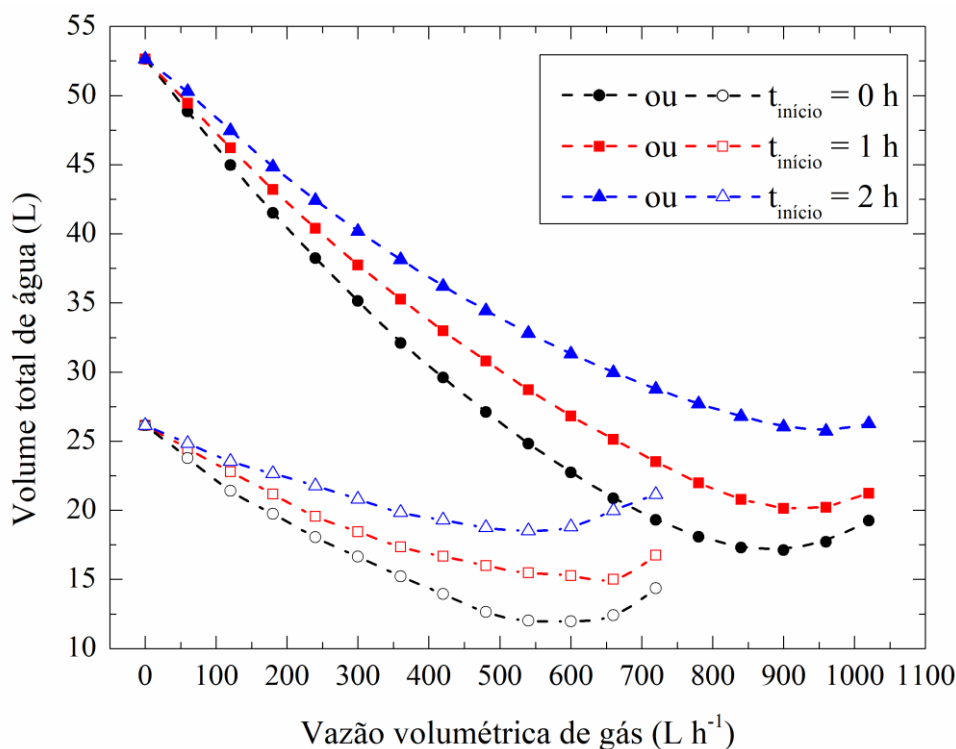
6.3.2. Termos energéticos da fermentação extrativa por arraste gasoso com CO₂

Verificada a precisão do modelo, foram realizadas simulações da fermentação extrativa (EF) nas mesmas condições anteriores ($C_{X0}=100 \text{ g L}^{-1}$ e $C_{Sm}=300 \text{ g L}^{-1}$) em temperaturas de 28 (EF_{28}) e 34 °C (EF_{34}). Diferentes vazões de gás foram simuladas para encontrar a menor quantidade de água necessária para manter a temperatura do caldo de fermentação constante ($dT/dt=0$). Na maioria dos trabalhos publicados na literatura, o *stripping* é utilizado como técnica para remover o produto inibidor (etanol), iniciando quando a concentração de etanol está em torno de 40 g L^{-1} , geralmente na terceira hora de fermentação (ALMEIDA *et al.*, 2021; CAMPOS *et al.*, 2022; SONEGO *et al.*, 2016). No entanto, o presente estudo buscou explorar o *stripping* exclusivamente como uma ferramenta de remoção de calor. Portanto, diferentes tempos de início da aspersão de gás foram avaliados para EF_{28} e EF_{34} . A **Figura 6.7** mostra a variação do volume total de água para controle de temperatura com vazão de gás para três tempos de início do *stripping* ($t_{início}=0, 1$ e 2 h). Para cada $t_{início}$, foram realizadas simulações com diferentes vazões de CO₂ (F_{CO_2}) com intervalos de 60 L h^{-1} . Para EF_{28} , foram realizadas 18 simulações com F_{CO_2} variando de 0 a 1020 L h^{-1} (símbolos cheios na **Figura 6.7**) e para EF_{34} , a vazão de CO₂ variou de 0 a 720 L h^{-1} , resultando em 13 simulações (símbolos vazios na **Figura 6.7**). Para cada simulação, \dot{Q}_A foi obtido pela Equação 6.10, e pela Equação 6.12 foi possível obter a vazão volumétrica de água (F_A) em cada instante de tempo, sendo o volume total de água (V_A) obtido a partir da integração de F_A (Equação 6.19).

Para ambas as simulações EF_{28} e EF_{34} , nota-se que o menor volume de água é obtido quando o *stripping* começa no tempo inicial de fermentação ($t_{início}=0 \text{ h}$). A quantidade de água é denotada como total, pois nas simulações há momentos em que a taxa total de calor removido ($\dot{Q}_P + \Delta\dot{H}_{vap} + \dot{Q}_{CO_2}$) é maior que a taxa metabólica de calor gerado (\dot{Q}_{met}), sendo necessário fornecer energia ao sistema (água quente) para garantir uma temperatura constante do caldo de fermentação. Além disso, vale ressaltar que a partir de uma determinada vazão de gás, há um volume maior de água para manter a temperatura do caldo constante. Isso ocorre porque a taxa de remoção de calor devido à vaporização do etanol e da água ($\Delta\dot{H}_{vap}$) é muito alta, exigindo um volume muito grande de água de aquecimento. Portanto, para cada condição simulada, existe uma vazão de CO₂ (F_{CO_2}) que resulta no volume mínimo de água total (resfriamento + aquecimento), que são $F_{CO_2}=540 \text{ L h}^{-1}$ para EF_{34} e $F_{CO_2}=900 \text{ L h}^{-1}$ para EF_{28} , ambos para $t_{início}=0 \text{ h}$. Conforme observado, a vazão volumétrica de CO₂ para a fermentação EF_{34} foi

menor que EF_{28} . Isso não se deve apenas ao menor calor metabólico gerado na fermentação a 34 °C, mas também ao aumento da pressão de vapor do etanol e da água com o aumento da temperatura.

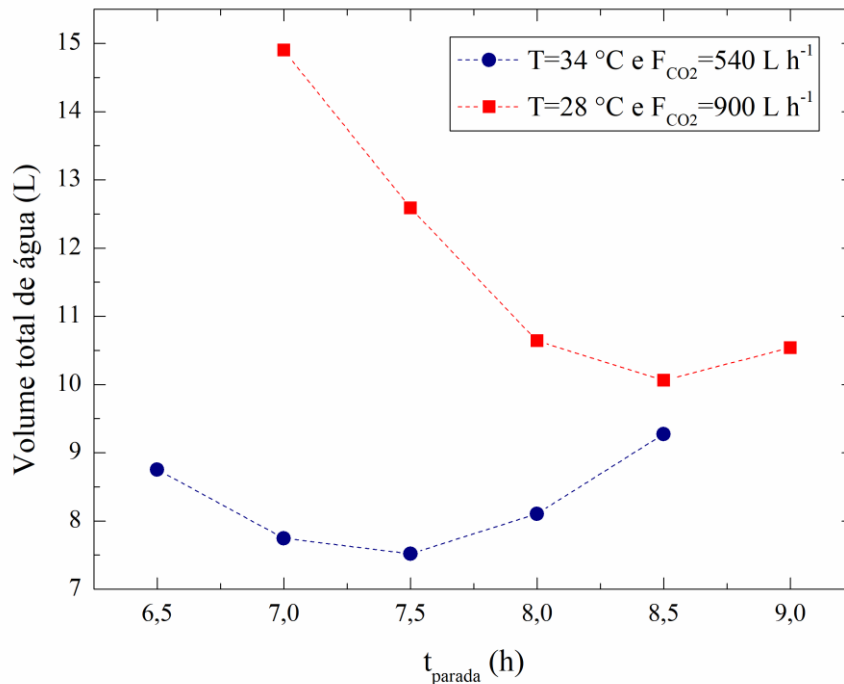
Figura 6.7 – Simulações de diferentes vazões específicas de CO_2 com *stripping* começando em 0 h (círculo), 1 h (quadrado) e 2 h (triângulo) nas fermentações a 28 °C (EF_{28} , símbolos cheios) e 34 °C (EF_{34} , símbolos vazios). As linhas pontilhadas foram usadas apenas para destacar a tendência da curva.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Analisando a taxa de geração de calor metabólico das fermentações convencionais (**Figura 6.4**) pode-se observar que a partir de um determinado momento, a taxa de calor metabólico começa a diminuir, ou seja, menos calor é gerado. Assim, como a vazão do gás é mantida até o final da fermentação, há um momento em que $(\dot{Q}_P + \Delta\dot{H}_{vap}) > \dot{Q}_{met}$ e o processo requer mais aquecimento de água. Portanto, pode haver um momento em que o arraste gasoso para remover o calor não seja mais necessário. Por isso, foram realizadas simulações interrompendo o *stripping* em cinco momentos diferentes (t_{parada}) para avaliar a economia de água em EF_{28} e EF_{34} . A **Figura 6.8** mostra diferentes tempos de parada do *stripping* para as simulações de EF_{28} com $F_{\text{CO}_2} = 900 \text{ L h}^{-1}$ e EF_{34} com $F_{\text{CO}_2} = 540 \text{ L h}^{-1}$ e $t_{início} = 0 \text{ h}$. De acordo com as simulações, o t_{parada} que minimiza o volume de água para controle de temperatura foi de 7,5 h para EF_{34} e de 8,5 h para EF_{28} .

Figura 6.8 – Volume de água em função do tempo de parada do *stripping* (t_{parada}) para as simulações EF_{28} ($F_{CO_2}=900 \text{ L h}^{-1}$) e EF_{34} ($F_{CO_2}=540 \text{ L h}^{-1}$) com $t_{início}=0 \text{ h}$. As linhas pontilhadas foram usadas apenas para destacar a tendência da curva.

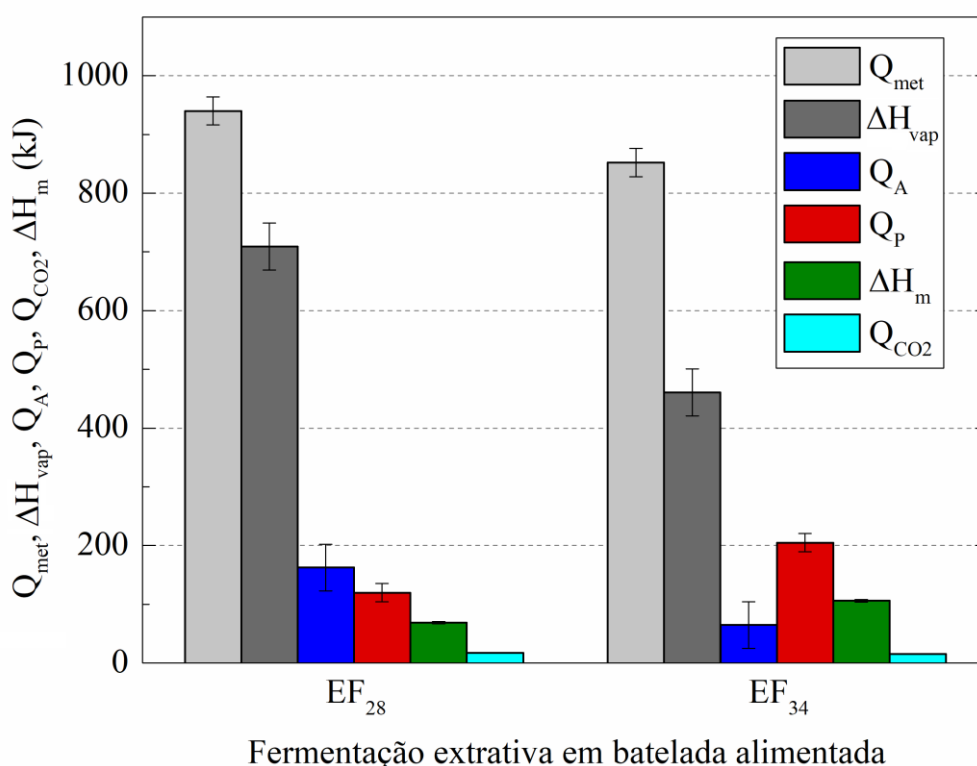


Fonte: Arquivo pessoal do autor.

As validações experimentais foram realizadas nas mesmas condições simuladas visando a economia de água prevista pelo modelo. As condições experimentais e os principais resultados das fermentações EF_{28} e EF_{34} são apresentados na **Tabela 6.1**. A **Figura 6.9** mostra a contribuição de cada termo do balanço de energia para as fermentações EF_{28} e EF_{34} . Na fermentação EF_{28} , 70,3% da energia total retirada do sistema, correspondeu a ΔH_{vap} , 11,87% a Q_P , 16,11% a Q_A e 1,72% a Q_{CO_2} , enquanto ΔH_m contribuiu para o aumento de energia no sistema, sendo responsável por 6,8% e Q_{met} foi responsável por 93,2% do aquecimento do sistema. Para EF_{34} as contribuições de ΔH_{vap} , Q_P , Q_A , ΔH_m e Q_{CO_2} foram de 54,11; 24,05; 7,6; 12,44 e 1,80%, respectivamente. Em ambas as fermentações, a maior contribuição para o resfriamento do caldo foi do ΔH_{vap} , que contribuiu para a redução do Q_A . A quantidade de água utilizada para resfriar o caldo de fermentação em EF_{28} foi de 13,1 L e, para aquecimento, 3,9 L, totalizando 17,0 L (**Tabela 6.1**), o que representa uma economia de 66,4%, em relação à CF_{28} . Na fermentação EF_{34} foram utilizados 6,8 L de água de resfriamento e 3,3 L de água de aquecimento, resultando em um total de 10,1 L (economia de 67% em relação à CF_{34}). Almeida *et al.* (2021) realizaram fermentações extrativas em biorreator de coluna de bolhas com 10 L

(volume de trabalho) operando em modo batelada a 34 °C. A vazão de gás utilizada foi $F_{CO_2}=600 \text{ L h}^{-1}$ e o *stripping* durou desde o início do cultivo até o final (consumo total de substrato). Nessas condições, os autores obtiveram uma redução no volume de água de 62,7%, em relação à fermentação convencional. Assim, a estratégia de simulação para obter F_{CO_2} , $t_{início}$ e t_{parada} para reduzir a água utilizada no controle de temperatura mostrou-se eficaz, uma vez que os resultados do presente estudo mostraram maior economia de água, em comparação aos resultados da literatura.

Figura 6.9 – Contribuição de cada termo do balanço de energia para fermentações extrativas (EF_{28} e EF_{34}). As barras verticais representam o desvio padrão da média.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

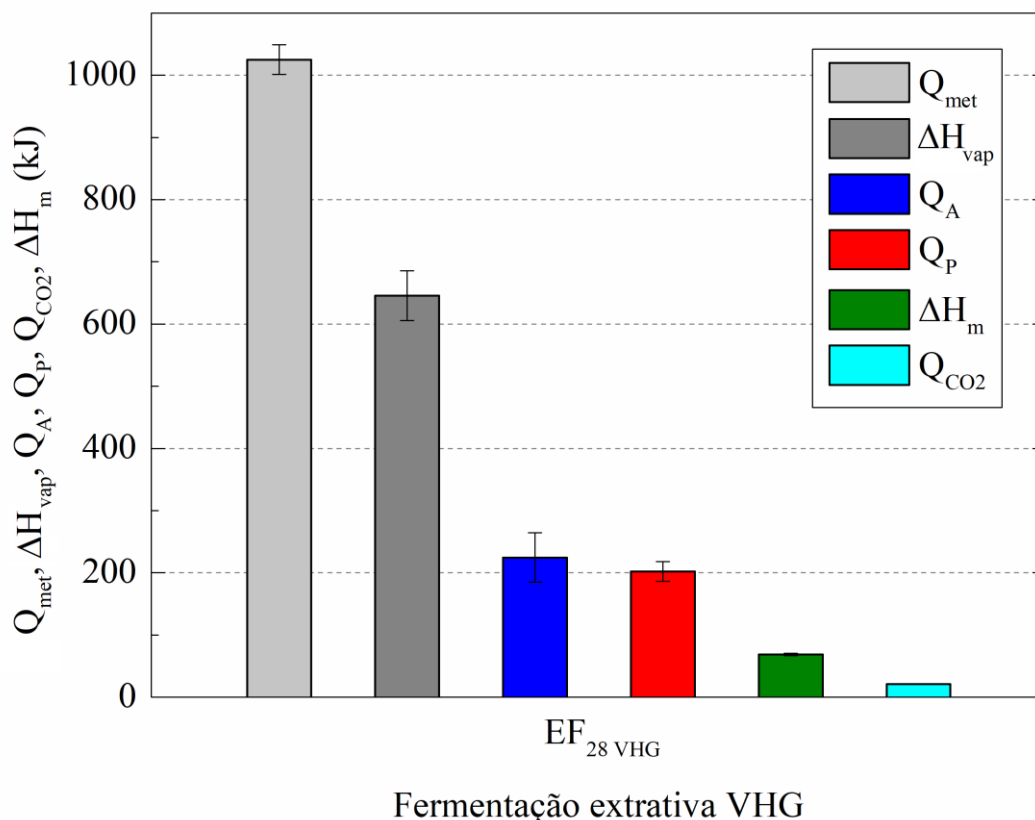
6.3.3. Termos energéticos da fermentação VHG extrativa por arraste gasoso com CO_2

A fermentação a baixas temperaturas tem sido utilizada para obter vinhos com alto teor de etanol. Para isso, a fermentação com elevada concentração de substrato no mosto (VHG) é aplicada (PULIGUNDLA *et al.*, 2011). Vários benefícios têm sido discutidos sobre a fermentação VHG, como economia de vapor na etapa de destilação, redução do volume de vinhaça gerado, entre outros (YAMAKAWA *et al.*, 2019). No entanto, como mostrado no presente estudo, a redução da temperatura de fermentação implica em uma maior quantidade

de água utilizada para o resfriamento da dorna. Portanto, uma das maneiras de combinar alto teor de etanol com economia de água de resfriamento é realizar a fermentação VHG extrativa a baixas temperaturas com remoção de etanol por CO_2 .

Simulações da fermentação VHG extrativa com $C_{Sm}=372 \text{ g L}^{-1}$, $C_{X0}=100 \text{ g L}^{-1}$ a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ foram realizadas utilizando o modelo descrito. A mesma estratégia apresentada na seção anterior foi adotada para encontrar uma vazão de gás e um tempo de parada de *stripping*, a fim de favorecer a economia de água. Para esta condição, os resultados encontrados foram $F_{\text{CO}_2}=600 \text{ L h}^{-1}$ e tempo de parada do *stripping* (t_{parada}) em 14 h de fermentação. Em seguida, foi realizada uma fermentação VHG extrativa nas mesmas condições da simulação ($EF_{28\text{VHG}}$). As contribuições de cada termo do balanço de energia para a fermentação $EF_{28\text{VHG}}$ são mostradas na **Figura 6.10**, onde as contribuições de ΔH_{vap} , Q_A , Q_P e Q_{CO_2} correspondem a 59,0; 20,6; 18,5 e 1,9% de toda a energia do sistema ($Q_{\text{met}}+\Delta H_m$), respectivamente.

Figura 6.10 – Contribuição de cada termo do balanço de energia para a fermentação $EF_{28\text{VHG}}$. As barras verticais representam o desvio padrão da média.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

As quantidades de etanol produzido e água para controle de temperatura na fermentação EF_{28VHG} são mostradas na **Tabela 6.1**. Observa-se que houve um aumento no volume de etanol produzido (V_E) e uma redução no volume de água (V_A), o que contribuiu para a redução da relação V_A/V_E , quando comparada à condição de referência adotada neste estudo (CF_{28}). Na safra de 2022/2023 no Brasil foram produzidos 28,6 bilhões de litros de etanol, respondendo à 27% da produção mundial (CONAB, 2023). A temperatura das dornas industriais dificilmente se mantém na temperatura ideal de fermentação (34 °C), podendo chegar até 40 °C em dias quentes devido à ineficiência dos trocadores de calor (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011). No entanto, para efeito de comparação, utilizando-se como base de cálculo o volume de água para controle de temperatura por litro de etanol produzido na fermentação CF_{34} ($V_A/V_E=25,4$ L_{água} L_{etanol}⁻¹), estima-se um volume de 725 milhões m³ de água utilizada no resfriamento das dornas de fermentação com base na safra 2022/2023. Por outro lado, a fermentação EF_{28VHG} resultaria em 363 milhões de m³ de água, o que representa uma economia de 50%. A redução de água para controle de temperatura também implicaria na redução do número de trocadores de calor e custos com produtos químicos utilizados no tratamento da água para evitar corrosão e incrustação nos trocadores de calor (CHAVEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2013).

Além disso, a fermentação EF_{28VHG} produziu um total de 120 g L⁻¹ de etanol (15,2 °GL), dos quais 107 g L⁻¹ permaneceram na fase líquida e 13 g L⁻¹ foram removidos por *stripping*, que podem ser recuperados de diferentes maneiras (HASHI; TEZEL; THIBAUT, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2019; STRODS; MEZULE, 2017; TAYLOR *et al.*, 2010). A fermentação CF_{34} produziu um vinho com teor de etanol de 12 °GL (95 g L⁻¹). Segundo Lopes *et al.*, (2016), esse teor de etanol geraria 7,7 litros de vinhaça para cada litro de etanol produzido. Portanto, na safra de 2022/2023, foram produzidos 220 bilhões de litros de vinhaça, enquanto um teor de etanol de 15,2 °GL resultaria em 162,2 bilhões de litros de vinhaça, representando uma economia de 23,5% do volume de vinhaça produzido, o que implicaria em reduções no armazenamento e custos de transporte. Além disso, o consumo de vapor poderia ser reduzido comparando EF_{28VHG} e CF_{34} (DIAS *et al.*, 2012), que poderiam ser usados para geração de energia.

Como mostrado, a fermentação a baixa temperatura resulta em diversas vantagens econômicas, uma vez que é possível obter alto teor de etanol. No entanto, reduzir a temperatura da fermentação pode não ser uma alternativa ecologicamente amigável, pois requer grande

volume de água para manter a temperatura da dorna constante. Entretanto, o *stripping* aplicado à fermentação alcoólica VHG a baixa temperatura mostrou-se uma técnica capaz de aliar os benefícios econômicos com os benefícios ambientais, pois apresentou redução no volume de água para controle de temperatura. Portanto, a aplicação desta técnica pode contribuir para o uso sustentável dos recursos hídricos, atendendo aos objetivos almejados pela Organização das Nações Unidas (ONU, 2022), que visa proporcionar o acesso à água potável e ao saneamento para a humanidade.

6.4. CONCLUSÕES

Utilizando um modelo obtido a partir dos balanços de massa e de energia, foi possível avaliar o calor gerado em fermentações convencionais em batelada alimentada em diferentes temperaturas. A validação experimental, com o sistema de coleta de água proposto, comprovou a precisão do modelo matemático para representar a dinâmica da fermentação alcoólica convencional, bem como o comportamento energético do processo a 28 (CF_{28}) e 34 °C (CF_{34}), uma vez que a quantidade de calor metabólico total gerado pelo modelo foi muito próxima dos dados experimentais para ambas as temperaturas (<1,5%). Simulações da fermentação extrativa por arraste gasoso com CO₂ em batelada alimentada foram realizadas a 28 (EF_{28}) e 34 °C (EF_{34}) com uma concentração de substrato de 300 g L⁻¹ a fim de encontrar as condições ideais para a aplicação da técnica de *stripping*, visando obter o menor volume de água para manter a temperatura constante (estado estacionário). A validação experimental mostrou uma redução do volume de água para controle de temperatura de 66,4 e 67,0% para EF_{28} (comparado com CF_{28}) e EF_{34} (comparado com CF_{34}), respectivamente. Da mesma forma, foram realizadas simulações da fermentação extrativa com elevada concentração de substrato no mosto (VHG) a 28 °C (EF_{28VHG}), resultando em condições operacionais de $F_{CO_2}=600$ L h⁻¹, $t_{início}=0$ h e $t_{parada}=14$ h. A validação experimental de EF_{28VHG} mostrou uma economia de água de 61,9% (em comparação com CF_{28}). Além disso, um teor total de etanol de 15,2 °GL foi obtido, o que resultaria em menor volume de vinhaça gerado. Concluindo, a técnica de *stripping* aplicada à fermentação alcoólica VHG a baixa temperatura, mostrou-se promissora e ecologicamente amigável no que diz respeito à economia de água e geração de vinhaça, sendo capaz de reduzir custos ligados ao tratamento, armazenamento e transporte da vinhaça e de produtos químicos utilizados no tratamento da água.

Capítulo VII

**OTIMIZAÇÃO DA FERMENTAÇÃO
EXTRATIVA POR ARRASTE GASOSO COM CO₂
EM DIFERENTES TEMPERATURAS**

7.1. INTRODUÇÃO

A inibição da levedura pelo etanol torna-se mais pronunciada quando a concentração de etanol atinge 40 g L^{-1} (AIBA; SHODA; NAGATANI, 1968) e cessa o crescimento celular quando atinge concentrações em torno de 90 g L^{-1} (MAIORELLA; BLANCH; WILKE, 1983). Por isso, o teor alcoólico no vinho ao final da fermentação fica na faixa de 10-11 °GL (v v⁻¹ a 20 °C). Esse baixo teor alcoólico implica em alto gasto energético na etapa de destilação e elevado volume de vinhaça gerado. Uma das maneiras de se contornar a inibição pelo etanol é reduzir a temperatura do caldo, fazendo com que a levedura se torne mais tolerante ao etanol. Dessa forma é possível obter vinhos com elevados teores alcoólicos a partir da alimentação de mostos mais concentrados, processo conhecido como VHG (do inglês *very high gravity*). O elevado teor alcoólico implica em economia energética durante a destilação e menor geração de vinhaça (LOPES *et al.*, 2016). Além disso, em baixas temperaturas há menor formação de espuma e contaminação do caldo, diminuindo gastos com antiespumante e antibióticos. No entanto, quando a temperatura da fermentação é reduzida, a cinética microbiana torna-se mais lenta, resultando em processos demorados e, conseqüentemente, impactando na produtividade volumétrica em etanol. Para reestabelecer a produtividade do processo, podem ser empregadas maiores concentrações celulares, processo conhecido como HCD (do inglês *high cell density*).

Outra forma que vem sendo amplamente estudada para aumentar a produtividade do processo é a fermentação extrativa, na qual o etanol é removido do caldo à medida em que é produzido. Dentre as técnicas de extração do etanol, destaca-se o arraste gasoso (*stripping*) em que um gás inerte é borbulhado no caldo, removendo o etanol por transferência de massa. O CO₂ é naturalmente um gás a ser aplicado nesse processo, pois é produzido durante a própria fermentação. Nesse sentido, a fermentação alcoólica extrativa com CO₂ tem sido amplamente estudada para aplicação da técnica VHG. Sonogo *et al.* (2018) otimizaram a fermentação alcoólica extrativa por arraste gasoso de etanol com CO₂ a 34 °C, variando a vazão de alimentação de mosto e o momento do início do *stripping*. Os autores alimentaram mosto com alta concentração de substrato ($304,2 \text{ g L}^{-1}$) produzindo $136,9 \text{ g L}^{-1}$ (17,2 °GL) de etanol em 16 h, resultando em uma elevada produtividade de $8,6 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (94% da produtividade industrial).

Diante do exposto, o presente capítulo teve como objetivo aliar a técnica de *stripping* com a redução da temperatura. Para isso, a partir da modelagem matemática desenvolvida nos capítulos anteriores, realizou-se a otimização da fermentação alcoólica extrativa nas temperaturas de 28, 30, 32 e 34 °C, com elava concentração de substrato no mosto (VHG) e alta densidade celular (HCD). Um algoritmo genético foi utilizado para otimizar a concentração de etanol para iniciar o *stripping*. Para validar as condições otimizadas, foram realizadas fermentações extrativas por arraste gasoso com CO₂ em condições de VHG e HCD nas temperaturas estudadas.

7.2. MATERIAIS E MÉTODOS

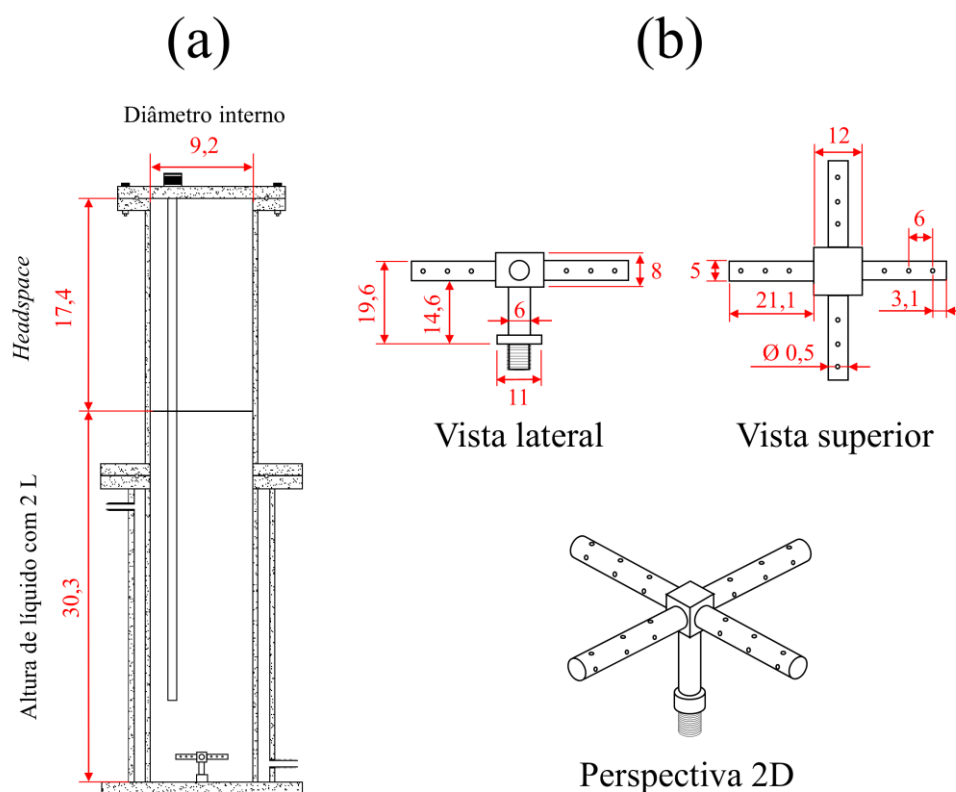
7.2.1. Microrganismo e meio de cultura

Levedura industrial liofilizada *S. cerevisiae* Y-904 (60 g, base seca) foi utilizada nesse estudo como microrganismo produtor de etanol. O mosto foi composto por extrato de levedura (11,66 g L⁻¹), KH₂PO₄ (9,6 g L⁻¹), ureia (9,14 g L⁻¹), MgSO₄.7H₂O (2,40 g L⁻¹) e sacarose (281 g L⁻¹ nas fermentações convencionais e 411 g L⁻¹ nas fermentações extrativas). Volume suficiente de água destilada foi adicionado para completar 1,4 L. O pH do mosto foi ajustado para 4,6 com adição de HCl 1,0 M.

7.2.2. Biorreator pneumático

As fermentações foram conduzidas em biorreator do tipo coluna de bolhas com 2 L de volume útil (altura total de 47,7 cm e diâmetro interno de 9,2 cm), composto por uma parte superior de acrílico e uma base encamisada de aço inoxidável. Um aspensor perfurado do tipo cruzeta (36 furos com 0,5 mm de diâmetro e espaçados com 5 mm) foi instalado na base do reator. A **Figura 7.1** mostra detalhes do biorreator e do aspensor.

Figura 7.1 – (a) Dimensões do biorreator e (b) Dimensões do aspersor e perspectiva 2D. Medidas em milímetros.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

7.2.3. Procedimento experimental

A massa de levedura liofilizada (60 g) foi previamente hidratada em 0,6 L de água destilada. A suspensão de células (inóculo) foi inserida no interior do biorreator e mantida na temperatura de cultivo sob agitação constante de 200 rpm durante 20 minutos. A agitação foi promovida por um sistema motor/impelidor (AM-20, Gehaka), enquanto a temperatura foi monitorada por um termômetro digital (MT 512, Full Gauge) e controlada pela recirculação de água destilada proveniente de um banho termostático (SL-152, Solab). Nas fermentações convencionais (sem arraste gasoso) o mosto foi alimentado ao longo de 5 h à vazão de alimentação de $0,280 \text{ L h}^{-1}$ promovida por uma bomba peristáltica (Model 120 U, Watson-Marlow). Nas fermentações extrativas, devido a elevada concentração de substrato, o mosto foi alimentado durante 8 h, à vazão de $0,175 \text{ L h}^{-1}$. Após a alimentação do mosto, o processo seguiu em modo batelada até o consumo total de substrato. O sistema motor/impelidor garantiu a agitação do caldo nas fermentações convencionais durante todo processo. O mesmo sistema de agitação foi mantido nas fermentações extrativas até o início do arraste gasoso, sendo retirado nesse instante.

Nas fermentações extrativas, o gás utilizado foi CO₂ comercial (99,5% de pureza) acondicionado em cilindro (25 kg e 60 atm quando cheio). A vazão de gás foi controlada em 5 L min⁻¹ através de um fluxômetro de massa (GFC 37, Aalborg). O CO₂ foi injetado através do aspersor (base do reator) e deixou o sistema através de uma saída na tampa do biorreator (parte superior). O início do *stripping* variou em cada fermentação e perdurou até o consumo total de substrato. Todas as fermentações (convencionais e extrativas) foram conduzidas em duplicata e a cada hora foram retiradas amostras de 2 mL para determinação das concentrações de células totais e viáveis. Um sistema de amostragem foi utilizado para monitoramento em tempo real da concentração de etanol e substrato, no qual uma bomba peristáltica (323Dz, Watson-Marlow) promoveu a recirculação do caldo do interior do biorreator para uma câmara de amostragem.

7.2.4. Métodos analíticos

A concentração celular foi obtida pelo método gravimétrico. As amostras foram centrifugadas a $10.414 \times g$ e 4 °C por 10 min, separando a massa de células do sobrenadante. As células foram então lavadas com água destilada e submetidas à nova centrifugação. A massa de células foi seca em estufa a 60 °C até que a massa do sedimento seco não apresentasse variação. A viabilidade celular foi determinada pelo método de azul de metileno. Uma alíquota do caldo foi diluída em 1 mL de EDTA, agitada durante 1 min e adicionado 1 mL de solução de azul de metileno, seguido de mais 1 min de agitação. Após o preparo, a amostra descansou por 5 min e, em seguida, foi colocada em câmara de Neubauer (Bright Line, Boeco Germany) e analisada em microscópio óptico (BX51, Olympus).

As concentrações de substrato e etanol foram determinadas por espectroscopia de infravermelho médio por transformada de Fourier (FT-MIR). A sonda de fibra óptica de refletância total atenuada (ATR, do inglês *attenuated total reflectance*), acoplada ao espectrofotômetro (ReactIR 45m, Mettler-Toledo AutoChem, Inc), foi posicionada na câmara de amostragem em contato com o caldo de fermentação. O espectrofotômetro, equipado com detector de mercúrio-cadmio-telureto (MCT) foi refrigerado com N₂ líquido e purgado com gás N₂ para remoção de CO₂ e água do compartimento óptico. Os espectros foram adquiridos a cada 20 min na faixa de comprimentos de onda de 3.000 a 15.000 nm (resolução de 4,2 nm e 256 varreduras por amostra). Os detalhes do pré-processamento das amostras e da calibração multivariada utilizada para obtenção das concentrações encontram-se no **Capítulo III**.

7.2.5. Modelagem matemática

A modelagem da fermentação extrativa com arraste de etanol com CO₂ foi descrita pelas Equações 7.1-7.5, obtidas a partir dos balanços de massa para células totais, células viáveis, substrato e etanol, bem como do balanço de massa total. O balanço de massa para substrato foi desenvolvido considerando somente a massa presente no sobrenadante (fase abiótica), enquanto o balanço de massa para etanol considerou também a massa de etanol intracelular. O modelo descreve tanto a fase de enchimento (F≠0) quanto a fase de batelada (F=0).

$$\frac{dC_X}{dt} = \mu \cdot C_{VX} - (dV/dt)/V \cdot C_X \quad (7.1)$$

$$\frac{dC_{VX}}{dt} = (\mu - (dV/dt)/V) \cdot C_{VX} \quad (7.2)$$

$$\frac{dC_S}{dt} = \frac{C_{Sm} \cdot F/V - (dV/dt) \cdot C_S/V + \mu C_{VX} \cdot (C_S/\rho_B - 1/Y_{X/S})}{(1 - C_X/\rho_B)} \quad (7.3)$$

$$\frac{dC_E}{dt} = \frac{((Y_{E/S}/Y_{X/S}) + C_E \cdot (1 - \gamma_E)/\rho_B) \cdot \mu C_{VX} - (k_E - k_E \cdot C_X/\rho_B + (dV/dt)/V) \cdot C_E}{(1 + (\gamma_E - 1) \cdot C_X/\rho_B)} \quad (7.4)$$

$$\frac{dV}{dt} = F - \frac{(C_E \cdot k_E - k_A \cdot (\rho_A - C_E)) \cdot V \cdot (1 - C_X/\rho_B)}{\rho_A} \quad (7.5)$$

em que C_X é a concentração celular total (g L⁻¹), μ é a velocidade específica de crescimento celular (h⁻¹), C_{VX} é a concentração de células viáveis (g L⁻¹), F é a vazão de alimentação de mosto (L h⁻¹), V é o volume de caldo (L), C_S é a concentração de substrato limitante (ART) (g L⁻¹), C_{Sm} é a concentração de substrato no mosto (g L⁻¹), C_E é a concentração de etanol (g L⁻¹), $Y_{X/S}$ é o coeficiente de rendimento de substrato a células (g_X g_S⁻¹), $Y_{E/S}$ é o coeficiente de rendimento de substrato a etanol (g_E g_S⁻¹), k_E é a constante de velocidade de remoção de etanol (h⁻¹), k_A é a constante de velocidade de remoção de água (h⁻¹), ρ_B é a densidade da levedura em gramas de massa seca por unidade de volume de célula úmida (g L⁻¹), γ_E é o coeficiente de partição de equilíbrio para o etanol (adimensional) e ρ_A é a massa específica da água (g L⁻¹). Valores de $\rho_B=390$ g L⁻¹ e $\gamma_E=0,78$ foram obtidos da literatura (MONBOUQUETTE, 1992, 1987).

A massa específica da água (ρ_A) varia com a temperatura. A partir de dados da literatura (HAYNES, 2015) foi ajustada uma equação que descreve ρ_A em função da temperatura (Equação 7.6).

$$\rho_A = 1004,7 \cdot e^{-0,0003 \cdot T} \quad (7.6)$$

em que T é a temperatura ($^{\circ}\text{C}$).

As constantes de remoção de etanol e água foram descritas pelas Equações 7.7 e 7.8, respectivamente, propostas por Rodrigues *et al.* (2018). Nas fermentações extrativas antes do início do *stripping* e nas fermentações convencionais (sem arraste gasoso), as constantes foram iguais a zero ($k_E=k_A=0$).

$$k_E = 2,715 \cdot 10^{-2} \cdot \phi_{CO_2} + 4,107 \cdot 10^{-3} \cdot T - 1,317 \cdot 10^{-1} \quad (7.7)$$

$$k_A = 2,872 \cdot 10^{-3} \cdot \phi_{CO_2} + 1,928 \cdot 10^{-5} \cdot T - 8,058 \cdot 10^{-5} \quad (7.8)$$

em que ϕ_{CO_2} é a vazão específica de CO_2 (vvm).

Um modelo cinético misto (Equação 7.9) foi utilizado para descrever o crescimento celular considerando as inibições por substrato, produto e células (ANDREWS, 1968; LEE; POLLARD; COULMAN, 1983; LEVENSPIEL, 1980):

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S + \frac{C_S^2}{K_{IS}}} \cdot \left(1 - \frac{C_E}{C_{Emax}}\right)^n \cdot \left(1 - \frac{C_X}{C_{Xmax}}\right)^m \quad (7.9)$$

em que μ_{max} é a velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1}), K_S é a constante de saturação (g L^{-1}), K_{IS} é a constante de inibição pelo substrato (g L^{-1}), C_{Emax} é a concentração máxima de etanol após a qual o crescimento celular cessa (g L^{-1}), n é a potência de inibição do produto (adimensional), C_{Xmax} é a concentração celular máxima após a qual o crescimento celular cessa (g L^{-1}) e m é a potência de inibição da célula (adimensional).

7.2.6. Otimização do início do arraste gasoso

A estratégia de otimização consistiu em maximizar a produtividade (função objetivo) variando o tempo de início do *stripping*. O cálculo da produtividade levou em conta a concentração de etanol total (etanol no vinho + etanol arrastado). A Equação 7.10 descreve a função objetivo (J).

$$J = \max(P_E) = \max\left(\frac{C_{Et}}{t_f}\right) \quad (7.10)$$

em que P_E é a produtividade em etanol ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$), C_{Et} é a concentração de etanol total (g L^{-1}) e t_f é o tempo final da fermentação (h).

Os parâmetros cinéticos utilizados na otimização da fermentação extrativa em diferentes temperaturas, obtidos da literatura e/ou no presente trabalho, são apresentados no **Quadro 7.1**.

Quadro 7 1 – Parâmetros cinéticos e coeficientes de rendimento utilizados na otimização da fermentação alcoólica em diferentes temperaturas.

Parâmetros	Unidades	Equações/Valores	Referências
μ_{max}	h^{-1}	$4,05 \cdot 10^6 \cdot e^{-\frac{5139,2}{T(K)}}$	Veloso <i>et al.</i> (2019)
K_S	g L^{-1}	$14,35 \cdot e^{7,64 \cdot \left(\frac{T(^{\circ}\text{C})-28}{28}\right)}$	Veloso <i>et al.</i> (2019)
K_{IS}	g L^{-1}	170,0	Veloso <i>et al.</i> (2019)
C_{Emax}	g L^{-1}	$138,45 \cdot e^{-1,88 \cdot \left(\frac{T(^{\circ}\text{C})-28}{28}\right)}$	Veloso <i>et al.</i> (2019)
C_{Xmax}	g L^{-1}	320,0	Monbouquette (1992)
n	-	$0,143 \cdot \left(\frac{C_{Ef}}{80,0}\right)^{3,56}$	Veloso <i>et al.</i> (2019)
m	-	$361 \cdot \left(e^{\left(\frac{3,21}{C_{X0}} - 0,0343 \cdot T(^{\circ}\text{C})\right)} - \frac{10,8}{T(^{\circ}\text{C})}\right)$	Capítulo V
$Y_{X/S}$	$\text{g}_X \text{g}_S^{-1}$	$\frac{(C_{Sm} \cdot C_{X0}) \cdot 10^{-3}}{2,68 \cdot (C_{Sm} + C_{X0}) - 309,8}$	Capítulo V
$Y_{E/S}$	$\text{g}_E \text{g}_S^{-1}$	0,46	Veloso <i>et al.</i> (2019)

O procedimento de otimização foi realizado no *software* Scilab v. 6.1.1, implementando um algoritmo genético (AG). O algoritmo interagiu com a função objetivo variando o tempo de início do *stripping*. Os valores dos parâmetros do algoritmo genético utilizado na solução do problema de otimização são apresentados na **Tabela 7.1**.

Tabela 7.1 – Parâmetros do algoritmo genético empregados na otimização.

Parâmetros do algoritmo	Valores
Número de indivíduos da população	100
Probabilidade de cruzamento	0,7
Probabilidade de mutação	0,1
Número de gerações	10

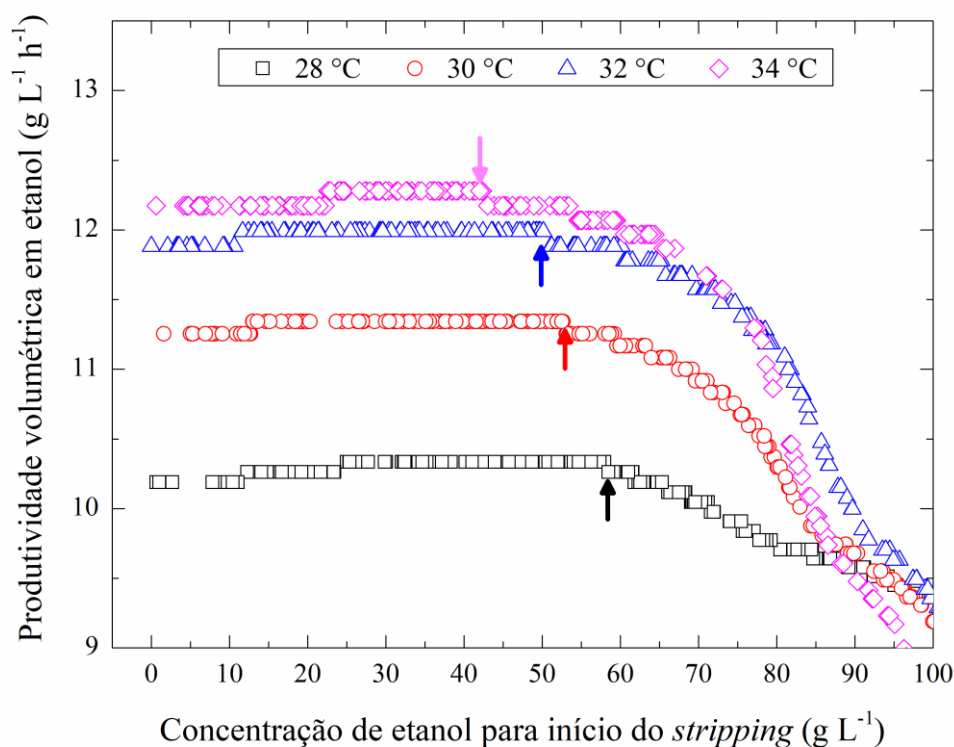
7.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.3.1. Otimização da fermentação extrativa em diferentes temperaturas

A rotina computacional de otimização utilizou o modelo proposto e os parâmetros cinéticos para determinar a concentração de etanol ideal para o início do *stripping*. A otimização das fermentações extrativas a 28, 30, 32 e 34 °C considerou uma vazão volumétrica de CO₂ de 5 L min⁻¹, elevada concentração celular no inóculo de 100 g L⁻¹ (HCD) e elevada concentração de substrato no mosto de 431,6 g L⁻¹ (VHG). Em cada uma das quatro fermentações extrativas a serem otimizadas, a rotina computacional variou a concentração de etanol a partir da qual inicia-se o *stripping* (C_{ES}), obtendo a respectiva produtividade. A **Figura 7.2** mostra os valores de produtividade em função de C_{ES} para cada condição otimizada. Nas fermentações extrativas a 28, 30, 32 e 34 °C, as máximas C_{ES} que resultaram nas maiores produtividades foram 57, 53, 50 e 43 g L⁻¹, respectivamente. As maiores produtividades obtidas na otimização das fermentações extrativas a 28, 30, 32 e 34 °C foram 10,30; 11,30; 12,00 e 12,30 g L⁻¹ h⁻¹, respectivamente.

De acordo com Aiba *et al.* (1968), a inibição da levedura pelo etanol torna-se mais pronunciada quando a concentração de etanol atinge valores acima de 40 g L⁻¹. Por isso, em estudos de fermentação extrativa por arraste gasoso com CO₂ em 34 °C iniciaram o processo de *stripping* quando a concentração de etanol no caldo atingiu 40 g L⁻¹ (CAMPOS *et al.*, 2022; MARTINS, 2021; RODRIGUES, 2019; SONEGO, 2016). Quando a fermentação alcoólica é conduzida em temperaturas mais baixas, a levedura torna-se mais resistente ao etanol, devido a menor fluidez da membrana (FERNANDES, 2008; PHISALAPHONG; SRIRATTANA; TANTHAPANICHAKOON, 2006; WANDERLEY, 1994). Portanto, os resultados da otimização corroboram a literatura, pois foram encontradas maiores concentrações de etanol para o início do *stripping*, com a redução da temperatura.

Figura 7.2 – Produtividade em etanol em função da concentração de etanol a partir da qual tem início o *stripping* (C_{ES}), resultante do processo de otimização das fermentações extrativas a 28 (quadrados), 30 (círculos), 32 (triângulos) e 34 °C (losangos). As setas indicam a maior C_{ES} que maximiza a produtividade em cada condição.

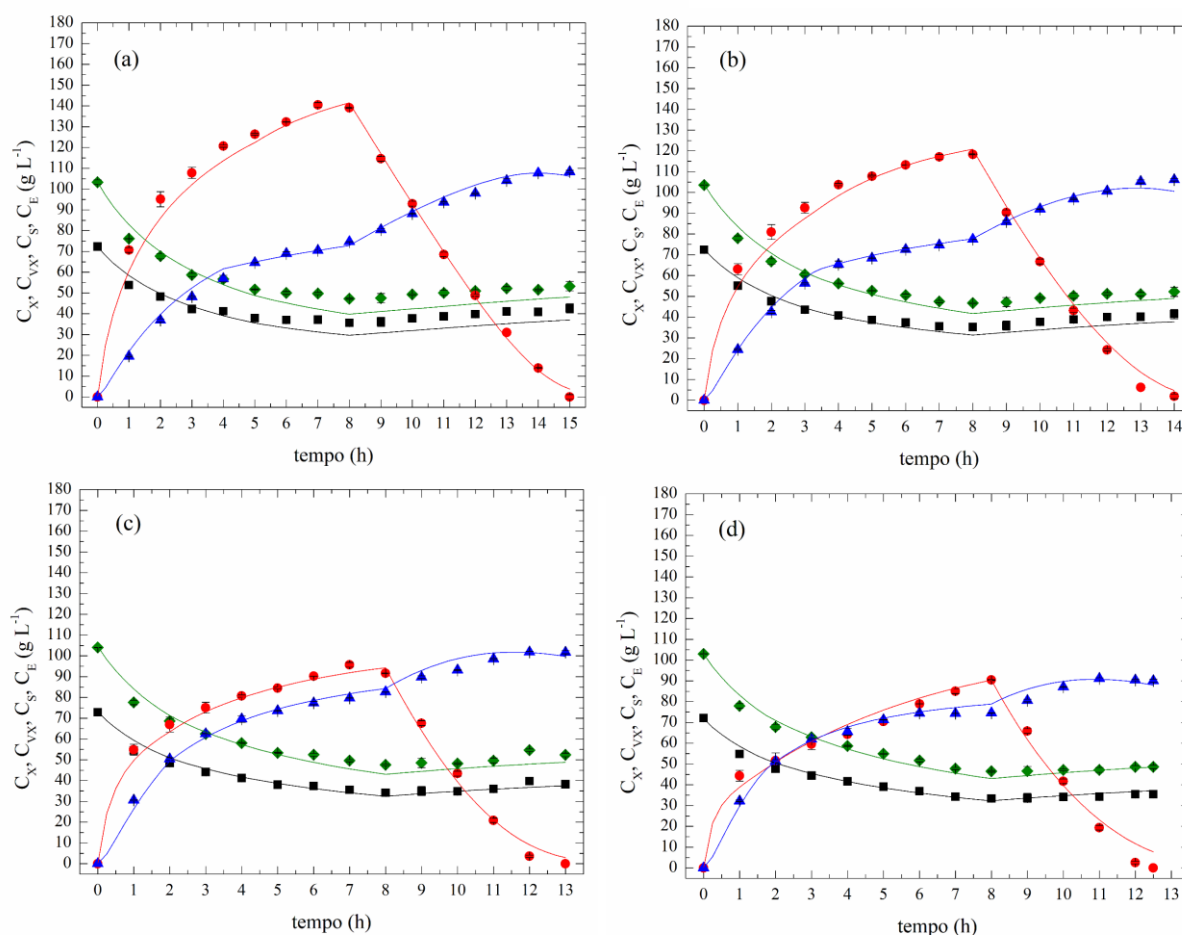


Fonte: Arquivo pessoal do autor.

A partir dos resultados obtidos na etapa de otimização, realizou-se a validação experimental das condições otimizadas. A modelagem da fermentação extrativa em diferentes temperaturas foi realizada utilizando os parâmetros apresentados no **Quadro 7.1**. No entanto, o modelo não foi capaz de descrever o comportamento dos dados experimentais com precisão (dados não mostrados). Isso ocorreu porque, no processo de *stripping*, apesar de remover o inibidor do caldo, as leveduras ficam expostas à elevadas concentrações de etanol por um período longo. Ressalta-se que o modelo utiliza parâmetros empíricos, como o parâmetro n que tem como função ponderar a inibição pelo etanol. Na modelagem da fermentação alcoólica em batelada alimentada, os valores de n encontrados na literatura não levam em conta o tempo de exposição da levedura em altas concentrações de etanol. Fica difícil, portanto, representar com um só valor as diferentes formas que o etanol afeta o microrganismo. Rodrigues (2019) reportou a necessidade de reajustar o parâmetro n na modelagem da fermentação alcoólica extrativa, pois nesse processo a levedura permaneceu durante 7 h em concentrações elevadas de etanol. Dessa forma, para todas as fermentações extrativas, o parâmetro n foi estimado para ajustar o modelo aos dados experimentais. Os valores de n para as fermentações extrativas às

temperaturas de 28, 30, 32 e 34 °C foram de 0,82, 0,63, 0,59 e 0,61, respectivamente. Os demais parâmetros estão descritos no **Quadro 7.1**. A **Figura 7.3** mostra os perfis simulados e experimentais de C_X , C_{VX} , C_S e C_E das fermentações extrativas em diferentes temperaturas nas condições otimizadas. Como observado, o modelo proposto no presente estudo foi capaz de descrever o comportamento dinâmico da fermentação alcoólica extrativa em condições com altas densidade celular (HCD) e concentração de substrato (VHG), nas diferentes temperaturas estudadas (28, 30, 32 e 34 °C).

Figura 7.3 – Perfis simulados (linhas) e experimentais (símbolos) das concentrações de substrato (círculos), etanol (triângulos), células viáveis (quadrados) e células totais (losangos) das fermentações extrativas por arraste gasoso com CO₂: (a) 28 °C, (b) 30 °C, (c) 32 °C e (d) 34 °C. As barras verticais representam o desvio padrão da média para cada ponto.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Nas fermentações extrativas, o monitoramento em tempo real por FT-MIR foi imprescindível para iniciar o *stripping* no momento em que a concentração de etanol atingiu os valores previstos na otimização de cada condição. Além disso, o uso do FT-MIR permitiu saber o momento exato do término de cada fermentação, dando mais exatidão nos cálculos das

produtividades. Além das fermentações extrativas, fermentações convencionais (sem *stripping*) foram realizadas para comparação em termos de produtividade volumétrica em etanol. A concentração celular inicial (C_{X0}) utilizada nas fermentações foi 100 g L^{-1} . As demais condições experimentais e os principais resultados obtidos nas fermentações convencionais (CF) e extrativas (EF) são apresentadas na **Tabela 7.2**.

Tabela 7.2 – Condições e principais resultados das fermentações convencionais e extrativas.

Fermentação	F (L h^{-1})	C_{Sm} (g L^{-1})	C_{ES} (g L^{-1})	C_{Ef} (g L^{-1})	C_{Etotal} (g L^{-1})	t_s (h)	t_f (h)	P_E ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$)
CF ₂₈		295,0	-	96,4	-	-	9,5	10,15
CF ₃₀		296,8	-	96,2	-	-	9,0	10,69
	0,280							
CF ₃₂		296,0	-	98,4	-	-	8,0	12,30
CF ₃₄		296,4	-	98,1	-	-	8,0	12,26
EF ₂₈		432,0	60	111,2	142,1	4,0	14,8	9,60
EF ₃₀		434,6	55	106,1	143,0	3,0	13,4	10,67
	0,175							
EF ₃₂		434,3	50	101,8	142,9	2,0	12,2	11,71
EF ₃₄		431,6	45	90,1	142,0	1,5	12,1	11,73

F é a vazão de alimentação do mosto, C_{Sm} é a concentração de substrato no mosto, C_{ES} é a concentração de etanol a partir da qual inicia-se o *stripping*, C_{Ef} é a concentração final de etanol no caldo, C_{Etotal} é a concentração total de etanol calculada a partir do C_{Sm} de cada fermentação e considerando $Y_{E/S}=0,47 \text{ g}_E \text{ g}_S^{-1}$, t_s é o tempo de início do *stripping*, t_f é o tempo final da fermentação e P_E é a produtividade volumétrica em etanol. CF refere-se à fermentação convencional (sem *stripping*) e EF refere-se à fermentação extrativa. Os números subscritos em CF e EF referem-se à temperatura (em °C) de cada fermentação.

É importante observar que as fermentações convencionais foram conduzidas nas mesmas condições de operação, variando apenas a temperatura. Dessa forma, o efeito da temperatura pode ser observado na produtividade. A mesma estratégia foi utilizada nas fermentações extrativas, fixando todas as condições como vazão de alimentação, concentração celular, concentração de substrato no mosto e vazão de CO_2 , variando apenas a temperatura.

Observa-se nas fermentações convencionais que as maiores produtividades foram obtidas nas fermentações CF_{32} e CF_{34} , enquanto as fermentações CF_{30} e CF_{28} alcançaram 87,7 e 82,5% da máxima produtividade observada dentre as fermentações convencionais. Isso mostra que mesmo para baixas temperaturas foi possível obter altas produtividades, devido à alta densidade celular.

Em relação às fermentações extrativas, quando comparadas com as convencionais nas respectivas temperaturas, observa-se que as produtividades alcançaram valores entre 94 a 100% das convencionais nas respectivas temperaturas. É importante ressaltar que o cálculo da produtividade levou em consideração a concentração de etanol total (etanol no vinho + arrastado). O etanol arrastado pode ser recuperado por diversas técnicas, como absorção, adsorção, condensação, permeação a vapor, entre outros. Rodrigues (2019) utilizou monoetilenoglicol (MEG) para absorver o etanol arrastado em fermentações extrativas por arraste gasoso com CO_2 recuperando 98,3% do valor arrastado. Sonogo *et al.* (2018) realizaram fermentações convencionais com $C_{Sm}=257$ g L⁻¹ (condição de referência) e extrativas com $C_{Sm}=434$ g L⁻¹, ambas a 34 °C e com $C_{X0}=50$ g L⁻¹. Os autores compararam as produtividades e observaram que a produtividade da fermentação VHG alcançou 94% da produtividade de referência, corroborando os resultados do presente trabalho. No trabalho de Veloso *et al.* (2019) foram realizadas fermentações convencionais em batelada alimentada em diferentes temperaturas. Na fermentação a 28 °C, $C_{X0}=50$ g L⁻¹ e $C_{Sm}=432$ g L⁻¹, foram produzidos 135 g L⁻¹ de etanol em 27 h, resultando em uma produtividade de 5,0 g L⁻¹ h⁻¹. No **Capítulo V** foi realizada uma fermentação convencional nessas mesmas condições, porém com $C_{X0}=112$ g L⁻¹ em que foram obtidos 135 g L⁻¹ de etanol em 25 h, resultando em uma produtividade de 5,4 g L⁻¹ h⁻¹. Isso mostra que mesmo com o aumento de células, a produtividade não foi significativamente maior, em condições de inibição pelo etanol. No entanto, quando o *stripping* é empregado em associação com alta densidade celular há uma diferença significativa no tempo do processo, refletindo em alta produtividade, conforme se observa nos resultados da fermentação EF_{28} (**Tabela 7.2**).

Como observado na **Tabela 7.2**, o tempo de duração do *stripping* ficou em torno de 10 h para todas as fermentações. Porém, a quantidade de etanol arrastado foi maior em temperaturas maiores. Rodrigues *et al.* (2018) estudaram o arraste do etanol em solução hidroalcoólica nas temperaturas de 30 a 34 °C e relataram que as constantes de remoção de

etanol e água aumentaram com a temperatura, ou seja, o arraste dessas substâncias é favorecido com o aumento da temperatura, devido ao aumento da pressão de vapor tanto do etanol quanto da água. Mesmo o arraste gasoso sendo desfavorecido em temperaturas mais baixas, altas produtividades foram obtidas, uma vez que as concentrações de etanol no caldo ficaram abaixo da concentração máxima que a levedura tolera, em todas as fermentações. Portanto, a técnica de *stripping* mostrou-se eficaz quando aplicada na fermentação alcoólica em diferentes temperaturas, visto que à medida que o arraste é desfavorecido (redução da temperatura), o microrganismo por sua vez consegue tolerar mais o etanol.

Os resultados mostraram que foi possível obter elevada concentração de etanol produzido (140 g L^{-1} ou $18 \text{ }^\circ\text{GL}$) em todas as fermentações extrativas realizadas. Quanto menor a temperatura, maior foi a concentração final de etanol no caldo. Comparando as fermentações extrativas, na fermentação EF_{28} obteve-se um vinho com $14 \text{ }^\circ\text{GL}$, enquanto na fermentação EF_{34} o teor alcoólico no vinho foi de $11,4 \text{ }^\circ\text{GL}$. Numa eventual etapa de destilação haveria menos gasto energético para destilar um vinho com maior teor alcoólico. Além disso, como na fermentação EF_{28} menos etanol foi arrastado, menor seriam os gastos na etapa de recuperação. Supondo um processo de recuperação por absorção em MEG, quando comparadas as fermentações EF_{28} e EF_{34} , um volume menor de absorvente seria necessário no processo de recuperação do etanol arrastado na fermentação EF_{28} e, conseqüentemente, menor a dimensão do absorvedor. Em relação à vinhaça, o mesmo volume seria obtido, uma vez que o cálculo do volume desse subproduto leva em conta a produção total de etanol, que foi igual nos dois cultivos ($18 \text{ }^\circ\text{GL}$). Além dos benefícios citados, vinhos com elevado teor alcoólico, resultam em economia de insumos na etapa de fermentação, com menores gastos com ácido sulfúrico (tratamento do inóculo) e com antibióticos, uma vez que a contaminação bacteriana é menor devido à elevada quantidade de etanol. Dessa forma, fica evidenciado que as fermentações extrativas a baixas temperaturas podem aliar elevada produtividade e elevado teor alcoólico no vinho, resultando em diversos benefícios econômicos. Vale ressaltar que no presente trabalho foi avaliada uma única concentração de mosto nas fermentações extrativas a baixas temperaturas. Portanto, nas fermentações EF_{28} e EF_{30} , outras concentrações poderiam ser avaliadas, pois a concentração final de etanol no vinho ficou distante da concentração máxima de etanol suportada pela célula.

7.4. CONCLUSÕES

A otimização de cada condição de fermentação alcoólica extrativa por arraste gasoso com CO₂, em diferentes temperaturas (28, 30, 32 e 34 °C) e com elevadas densidade celular e concentração de substrato no mosto, encontrou a máxima concentração de etanol a partir da qual deve-se iniciar o *stripping* (C_{ES}) para se obter a maior produtividade. Quanto maior a temperatura, menor o valor de C_{ES} foi obtido devido à inibição pelo etanol ser mais pronunciada. A validação experimental das condições otimizadas resultou em altas produtividades. Na fermentação extrativa a 28 °C foram obtidos 142,1 g L⁻¹ (18 °GL) de etanol em 14,8 h, resultando em uma produtividade volumétrica em etanol de 9,6 g L⁻¹ h⁻¹. Além disso, a concentração de etanol no vinho foi elevada (14 °GL), uma vez que o arraste de etanol com CO₂ é menor em temperaturas mais baixas. Portanto, a estratégia de utilizar o *stripping* em fermentações a baixa temperatura mostrou-se promissora, pois resultou em elevada produtividade associada aos inúmeros benefícios econômicos resultantes da obtenção de vinhos com elevado teor alcoólico, como redução de vapor na destilação, menores gastos na etapa de recuperação do etanol arrastado e menores gastos com insumos na fermentação (ácido sulfúrico e antibióticos).

Capítulo VIII

CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

8.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados apresentados na presente tese, conclui-se que:

- A técnica FT-MIR usando regressão PLS com dados de cultivos em diferentes temperaturas pode ser utilizada em aplicações industriais, pois considera uma ampla gama de relações entre os principais compostos da fermentação alcoólica, resultantes das flutuações térmicas do processo, e possibilita a aquisição rápida de dados precisos. Dessa forma, pode-se reduzir custos e tempo de análise, auxiliando na rápida tomada de decisão no controle do processo. A metodologia desenvolvida para o monitoramento em tempo real da fermentação, quando conduzida em escala laboratorial, foi imprescindível para iniciar o *stripping* no momento em que a inibição de etanol se torna mais pronunciada e para cálculos de produtividades mais precisos.
- O volume da célula deve ser considerado na modelagem da fermentação alcoólica em batelada com alta densidade celular (HCD), especialmente sob condições VHG. O modelo intrínseco desenvolvido melhorou a predição do perfil de substrato para este tipo de processo em comparação com um modelo convencional não intrínseco.
- O modelo cinético híbrido que contempla inibições por substrato, etanol e células foi capaz de prever a dinâmica comportamental da fermentação alcoólica em batelada alimentada em amplas faixas de temperatura (28–34 °C), concentração de substrato no mosto (258–436 g L⁻¹), tamanho do inóculo (50–125 g L⁻¹) e concentração de etanol (80–135 g L⁻¹).
- A fermentação alcoólica extrativa por arraste gasoso com CO₂ foi modelada a partir dos balanços de massa e energia. Simulações permitiram a análise energética do processo com diferentes vazões de CO₂ e tempo de *stripping*, resultando em condições de operação que minimizaram o volume de água utilizado no controle da temperatura do caldo. Validações experimentais comprovaram a precisão do modelo. Na fermentação extrativa VHG a 28 °C um teor alcoólico total de 15,2 °GL foi obtido e a quantidade de água utilizada para controle da temperatura foi 61,9% menor do que a condição controle.

- A otimização da fermentação alcoólica VHG extrativa em diferentes temperaturas encontrou a máxima concentração de etanol a partir da qual deve-se iniciar o *stripping* para obter a máxima produtividade. Na fermentação extrativa a 28 °C foram obtidos 142,1 g L⁻¹ de etanol total (18 °GL) e produtividade volumétrica em etanol de 9,6 g L⁻¹ h⁻¹. Além disso, a concentração de etanol no vinho foi elevada (14 °GL), uma vez que o arraste de etanol com CO₂ é menor em temperaturas mais baixas.
- De forma geral, toda a modelagem matemática desenvolvida no presente trabalho, contribuiu para a otimização da fermentação alcoólica extrativa em condições de VHG e HCD em diferentes temperaturas. A estratégia de utilizar o *stripping* em fermentações a baixas temperaturas mostrou-se promissora, pois resultou em elevada produtividade, e ecologicamente amigável no que diz respeito à economia de água. Além disso, o elevado teor alcoólico obtido contribuiu para inúmeros benefícios, como redução de vapor na destilação, menores gastos na etapa de recuperação do etanol arrastado e menores gastos com insumos na fermentação (ácido sulfúrico e antibióticos).

8.2. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Sugerem-se as seguintes propostas de trabalhos futuros:

- Avaliar a fermentação alcoólica extrativa VHG a baixas temperaturas com concentrações de substrato no mosto superiores às do presente estudo.
- Avaliar a variação da temperatura e da vazão de CO₂ ao longo da fermentação alcoólica extrativa.
- Analisar a viabilidade técnico-econômica da fermentação extrativa em diferentes temperaturas.
- Estudar a fermentação extrativa em altas temperaturas utilizando leveduras termotolerantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIBA, S.; SHODA, M.; NAGATANI, M. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 10, no. 6, p. 845–864, 1968. .

ALDIGUIER, A. S.; ALFENORE, S.; CAMELEYRE, X.; GOMA, G.; URIBELARREA, J. L.; GUILLOUET, S. E.; MOLINA-JOUVE, C. Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, vol. 26, no. 4, p. 217–222, 2004.

ALMEIDA, L. P.; SILVA, C. R.; MARTINS, T. B.; PEREIRA, R. D.; ESPERANÇA, M. N.; CRUZ, A. J. G.; BADINO, A. C. Heat transfer evaluation for conventional and extractive ethanol fermentations: Saving cooling water. **Journal of Cleaner Production**, vol. 304, p. 127063, 2021.

ALVARADO, C. S. M.; GARCIA, C. Comparison of Statistical Metrics and a New Fuzzy Method for Validating Linear Models Used in Model Predictive Control Controllers. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, vol. 57, no. 10, p. 3666–3677, 2018.

ALVES, L. A.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, J. B. A. E.; SILVA, S. S.; PRATA, A. M. R. Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, vol. 70–72, p. 89–98, 1998.

AMILLASTRE, E.; URIBELARREA, J.; ALFENORE, S.; GUILLOUET, S. E. Bioresource Technology Dynamic model of temperature impact on cell viability and major product formation during fed-batch and continuous ethanolic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **BIORESOURCETECHNOLOGY**, vol. 117, p. 242–250, 2012.

AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, J. V. C.; BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 91, no. 5, p. 1267–1275, 2011.

AMORIM, H V; BASSO, L C; ALVES, D M G. **Processos de produção de álcool - Controle e monitoramento, Piracicaba, SP, p. 103, 1996.** Editora Fe. Piracicaba, SP, 1996.

AMORIM, H. V. **Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia.** Piracicaba: Fermentec, 2005.

ANA - Agência Nacional de Águas. Manual de conservação e reuso de água na agroindústria sucroenergética. Agência Nacional de águas: Federação das indústrias do estado de São Paulo; União da indústria da cana-de-açúcar; Centro de tecnologia canavieira. Brasília, 2009. .

ANDREWS, J. F. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 10, no. 6, p. 707–723, 1968.

ANDRIETTA, S R. Modelagem, simulação e controle de Fermentação alcoólica contínua em escala industrial. **Tese (Doutorado).** Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994. .

ANDRIETTA, S R; MIGLIARI, P C; ANDRIETTA, M G S. Classificação de cepas de levedura de processos industriais de fermentação alcoólica utilizando capacidade fermentativa. **STAB-Açúcar Álcool e Subprodutos**, vol. 17, p. 54–59, 1999. .

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Evolução da produção de etanol. 2021. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Disponível: <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiZWU1MTc0ZjYtMjVhYi00YTEwLWJhODMtODQ0MDdhNmJiMWYwIiwidCI6IjQ0OTlmNGZmLTI0YTYtNGI0Mi1iN2VmLTEyNGFmY2FkYzIxMyJ9&pageName=ReportSection8aa0cee5b2b8a941e5e0%22>. Acesso em 20 de janeiro de 2023.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis RenovaBio. 2020. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Disponível: <https://www.gov.br/anp/pt-br/assuntos/renovabio>. Acesso em 18 de dezembro 2022.

ANSANAY-GALEOTE, V.; BLONDIN, B.; DEQUIN, S.; SABLAYROLLES, J. M. Stress effect of ethanol on fermentation kinetics by stationary-phase cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, vol. 23, no. 9, p. 677–681, 2001.

ATALA, D. I. P. Kinetics of Ethanol Fermentation with High Biomass Concentration Considering the Effect of Temperature. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. vol. 91, p. 353–365, 2001.

AVBELJ, M.; ZUPAN, J.; KRANJC, L.; RASPOR, P. Quorum-Sensing Kinetics in *Saccharomyces cerevisiae*: A Symphony of ARO Genes and Aromatic Alcohols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry produce**. vol. 63, p. 8544–8550, 2015.

BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation. *In*: BERNARDES M. A. S. (ed.). **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**. Intech, 2011.

BASTOS, R. G. **Tecnologia das fermentações: fundamentos de bioprocessos**. Edufscar, 2010.

BERMEJO, P. M.; BADINO, A.; ZAMBERLAN, L.; RAGHAVENDRAN, V.; BASSO, T. O.; GOMBERT, A. K. Ethanol yield calculations in biorefineries. **FEMS Yeast Research**, vol. 21, no. 8, 2021. .

BONOMI, A.; SCHMIDELL, W. Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos. *In*: SCHMIDELL, W; LIMA, U A; AQUARONE, E; BORZANI, W (eds.). **Biotecnologia Industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, vol. 2, p. 123–178, 2001.

BORZANI, W. Calculation of fermentation parameters from the results of a fed-batch test taking account of the volume of biomass in the fermenting medium. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, vol. 51, no. 3, p. 441–446, 2008.

BORZANI, W.. Correction of Results Obtained in Laboratory-Scale Studies of Batch Fermentation Kinetics. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 25, no. 5, p. 3201–3206, 1983. .

BOYNE, J A; WILLIAMSON, A G. Enthalpies of Mixing of Ethanol and Water. **Journal of Chemical and Engineering Data**, vol. 3, p. 318, 1967. .

BRERETON, R G. **Applied Chemometrics for Scientists**. West Sussex, England: John Wiley & Sons, Ltd., 2007. vol. 4, .

CAMARGOS, C. V.; MORAES, V. D.; OLIVEIRA, L. M. High Gravity and Very High Gravity Fermentation of Sugarcane Molasses by Flocculating *Saccharomyces cerevisiae*: Experimental Investigation and Kinetic Modeling. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 193, p. 807–821, 2020.

CAMPOS, B. G.; VELOSO, I. I. K.; RIBEIRO, M. P. A.; BADINO, A. C.; CRUZ, A. J. G. Thermal analysis of extractive fed-batch ethanol fermentation with CO₂ stripping: Modeling and simulation. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, vol. 182, no. June, p. 109-185, 2022.

CARTÓN, A; BENITO, G G; REY, J A; FUENTE, M. Selection of Adsorbents to be used in an Ethanol Fermentation Process. Adsorption Isotherms and Kinetics. **Bioresource Technology**, vol. 66, p. 75–78, 1998.

CERVERA, A. E.; PETERSEN, N.; LANTZ, A. E.; LARSEN, A.; GERNAEY, K. V. Application of near-infrared spectroscopy for monitoring and control of cell culture and fermentation. **Biotechnology Progress**, vol. 25, no. 6, p. 1561–1581, 2009.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Avaliação do Potencial Poluidor da Agroindústria Sucroalcooleira na 7ª Zona Hidrográfica do Estado de São Paulo. , p. 88, 1986. .

CHANG, H. N.; YANG, J. W.; PARK, Y. S.; KIM, D. J.; HAN, K. C. Extractive ethanol production in a membrane cell recycle bioreactor. **Journal of Biotechnology**, vol. 24, no. 3, p. 329–343, 1992.

CHAPANYA, P.; RITTHIRUANGDEJ, P.; MUEANGMONTRI, R. Temperature Compensation on Sugar Content Prediction of Molasses by Near-Infrared Spectroscopy (NIR). **Sugar Tech**, vol. 21, no. 1, p. 162–169, 2019.

CHAVEZ-RODRIGUEZ, M. F.; MOSQUEIRA-SALAZAR, K. J.; ENSINAS, A. V.; NEBRA, S. A. Water reuse and recycling according to stream qualities in sugar-ethanol plants. **Energy for Sustainable Development**, vol. 17, no. 5, p. 546–554, 2013.

CHEN, Y.; REN, H.; LIU, D.; ZHAO, T.; SHI, X.; CHENG, H.; ZHAO, N.; LI, Z.; LI, B.; NIU, H.; ZHUANG, W.; XIE, J.; CHEN, X.; WU, J.; YING, H. Enhancement of n-butanol production by in situ butanol removal using permeating-heating-gas stripping in acetone-butanol-ethanol fermentation. **Bioresource Technology**, vol. 164, p. 276–284, 2014.

CHEN, S.; XU, Y. Adaptive evolution of *Saccharomyces cerevisiae* with enhanced ethanol tolerance for Chinese rice wine fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 173, no. 7, p. 1940–1954, 2014.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Boletim da safra de cana-de-açúcar. 2023. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>. Acesso em: 18 de janeiro de 2023.

CONTOIS, D. E. Kinetics of Bacterial Growth: Relationship between Population Density and Specific Growth Rate of Continuous Cultures. **Journal of General Microbiology**, vol. 21, no. 1, p. 40–50, 1959.

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**, vol. 44, no. 3, 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)**. Universidade Federal de Uberlândia, 2015.

CRUZ, M L; RESENDE, M. M.; RIBEIRO, E. J. Evaluation of process conditions in the performance of yeast on alcoholic fermentation. **Chemical Engineering Communications**, vol. 205, no. 6, p. 846–855, 2018.

CYSEWSKI, G. R; WILKE, C. R. Process Design and Economic Studies of Alternative Fermentation Methods for the Production of Ethanol. **Biotechnology and Bioengineering**. vol. 20, p. 1421–1444, 1978.

DE VRIJE, T.; BUDDE, M.; VAN DER WAL, H.; CLAASSEN, P. A.M.; LÓPEZ-CONTRERAS, A. M. “In situ” removal of isopropanol, butanol and ethanol from fermentation broth by gas stripping. **Bioresource Technology**, vol. 137, p. 153–159, 2013.

DEED, R. C.; DEED, N. K.; GARDNER, R. C. Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to low temperature during wine fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek**, vol. 107, no. 4, p. 1029–1048, 2015.

DIAS, M. O. S.; JUNQUEIRA, T. L.; ROSSELL, C. E. V.; MACIEL, R. F.; BONOMI, A. Evaluation of process configurations for second generation integrated with first generation bioethanol production from sugarcane. **Fuel Processing Technology**, vol. 109, p. 84–89, 2013.

DIAS, M. O.S.; JUNQUEIRA, T. L.; JESUS, C. D.F.; ROSSELL, C. E.V.; MACIEL FILHO, R.; BONOMI, A. Improving bioethanol production - Comparison between extractive and low temperature fermentation. **Applied Energy**, vol. 98, p. 548–555, 2012.

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. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 19, p. 595–603, 2003. .

FAN, S.; CHEN, S.; TANG, X.; XIAO, Z.; DENG, Q.; YAO, P.; SUN, Z.; ZHANG, Y.; CHEN, C. Kinetic model of continuous ethanol fermentation in closed-circulating process with pervaporation membrane bioreactor by *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, vol. 177, p. 169–175, 2015.

FAYOLLE, P.; PICQUE, D.; PERRET, B.; LATRILLE, E.; CORRIEU, G. Determination of Major Compounds of Alcoholic Fermentation by Middle-Infrared Spectroscopy: Study of Temperature Effects and Calibration Methods. **Applied Spectroscopy**, vol. 50, no. 10, p. 1325–1330, 1996. .

FERNANDES, A. P. F. V. Leveduras isoladas de produtos frutícolas: capacidade fermentativa e estudos sobre a H⁺-ATPase da membrana plasmática. **Tese (Doutorado)**. Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, , p. 177, 2008. .

FROHMAN, C. A.; DE ORDUÑA HEIDINGER, R. M. The substratostat an automated near-infrared spectroscopy-based variable-feed system for fed-batch fermentations of grape musts. **Oeno One**, vol. 52, no. 4, p. 264–274, 2018.

GARCIA-JARES, C. M.; MÉDINA, B. Application of multivariate calibration to the simultaneous routine determination of ethanol, glycerol, fructose, glucose and total residual sugars in botrytized-grape sweet wines by means of near-infrared reflectance spectroscopy. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, vol. 357, no. 1, p. 86–91, 1997.

GARCIA, A.; IANNOTTI, E. L.; FISCHER, J. L. Butanol fermentation liquor production and separation by reverse osmosis. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 28, no. 6, p. 785–791, 1986.

GROOT, W J; VAN DER LANS, R G J; LUYBEN, K Ch A M. Batch and continuous butanol fermentations with free cells: integration with product recovery by gas-stripping. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 32, p. 305–308, 1989. .

GUIDINI, C. Z.; DINIZ, L.; MARQUEZ, S.; SILVA, H. A.; RESENDE, M. M. Alcoholic Fermentation with Flocculant *Saccharomyces cerevisiae* in Fed-Batch Process. **Applied Biochemistry Biotechnology**, p. 1623–1638, 2014.

HASHI, M.; TEZEL, F. H.; THIBAUT, J. Ethanol recovery from fermentation broth via carbon dioxide stripping and adsorption. **Energy and Fuels**, vol. 24, no. 9, p. 4628–4637, 2010.

HAYNES, W.M. **Handbook of chemistry and physics**. 95th ed. Boca Raton: CRC Press, 2015.

HOPPE, G K; HANSFORD, G S. Ethanol inhibition of continuous anaerobic yeast growth. **Biotechnology Letters**, vol. 4, no. 1, p. 39–44, 1982. .

HVALA, N.; STRMČNIK, S.; ŠEL, D.; MILANIČ, S.; BANKO, B. Influence of model validation on proper selection of process models - An industrial case study. **Computers and Chemical Engineering**, vol. 29, no. 7, p. 1507–1522, 2005.

JARZĘBSKI, A. B.; MALINOWSKI, J. J.; GOMA, G. Modeling of ethanol fermentation at high yeast concentrations. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 34, no. 9, p. 1225–1230, 1989.

KUMAR, M.; PRASAD, D.; GIRI, B. S.; SINGH, R. S. Temperature control of fermentation bioreactor for ethanol production using IMC-PID controller. **Biotechnology Reports**, vol. 22, p. e00319, 2019.

LALUCE, C.; TOGNOLLI, J. O.; OLIVEIRA, K. F.; SOUZA, C. S.; MARAIS, M. R. Optimization of temperature, sugar concentration, and inoculum size to maximize ethanol production without significant decrease in yeast cell viability. **Applied Microbiology Biotechnology**, p. 627–637, 2009.

LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S. G.; LICHWA, J.; ANTAL, M. J.; LYND, L. R. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**, vol. 81, no. 1, p. 33–44, 2002.

LEE, J. M.; POLLARD, J. F.; COULMAN, G. A. Ethanol Fermentation with Cell Recycling : Computer Simulation. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 25, p. 497–511, 1983. .

LEE, S. S.; ROBINSON, F M; WANG, H Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology and bioengineering symposium**, vol. 11, p. 641–649, 1981. .

LEMOS, D. A; SONEGO, J. L S; CRUZ, A. J G; BADINO, A. C. Improvement of ethanol production by extractive fed - batch fermentation in a drop column bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, vol. 43, no. 12, p. 2295–2303, 2020.

LEVENSPIEL, O. The monod equation: A revisit and a generalization to product inhibition situations. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 22, no. 8, p. 1671–1687, 1980.

LIBNAU, F. O.; TOFT, J.; CHRISTY, A. A.; KVALHEIM, O. M. Structure of Liquid Water Determined from Infrared Temperature Profiling and Evolutionary Curve Resolution. **Journal of the American Chemical Society**, vol. 116, no. 18, p. 8311–8316, 1994.

LIMA, U A; BASSO, L C; AMORIM, H V. Produção de Etanol. *In*: LIMA, U A; AQUARONE, E; BORZANI, W; SCHMIDELL, W (eds.). **Biotecnologia Industrial – Processos Fermentativos e Enzimáticos**. Edgard Blucher Ltda, 2001. vol. 3, p. 1–43.

LOPES, M. L.; PAULILLO, S. C. L.; GODOY, A.; CHERUBIN, R. A.; LORENZI, M. S.; GIOMETTI, F. H. C.; BERNARDINO, C. D.; AMORIM, H. B.; AMORIM, H. V. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 47, p. 64–76, 2016.

LÓPEZ, A.; SECANELL, P. A simple mathematical empirical model for estimating the rate of heat generation during fermentation in white-wine making. **International Journal of Refrigeration**, vol. 15, no. 5, p. 276–280, 1992.

LORA, E E S; VENTURINI, O J. **Biocombustíveis**. 1st ed. Interciência, 2012.

LOURENÇO, N D; LOPES, J A; ALMEIDA, C F; PINHEIRO, H M. Bioreactor monitoring with spectroscopy and chemometrics : a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, p. 1211–1237, 2012.

LUONG, J. H. T.; VOLESKY, B. Heat Evolution During the Microbial Process — Estimation, Measurement, and Applications. **Microbial Activities**, , p. 1–40, 2022.

LUONG, J. H.T.; YERUSHALMI, L.; VOLESKY, B. Estimating the maintenance energy and biomass concentration of *Saccharomyces cerevisiae* by continuous calorimetry. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 5, no. 4, p. 291–296, 1983.

MAIORELLA, B.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 25, no. 1, p. 103–121, 1983.

MARTINS, T. B. Estudo do desempenho de eliminadores de névoa fermentação alcoólica extrativa. **Tese (Doutorado)**. Universidade Federal de São Carlos, p. 158, 2021.

MENEZES, T J B. **Etanol, o combustível do Brasil**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980.

MOHANA, S.; ACHARYA, B. K.; MADAMWAR, D. Distillery spent wash: Treatment technologies and potential applications. **Journal of Hazardous Materials**, vol. 163, no. 1, p. 12–25, 2009.

MONBOUQUETTE, H. G. Modeling high-biomass-density cell recycle fermentors. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 39, no. 5, p. 498–503, 1992.

MONBOUQUETTE, H. G. Models for high cell density bioreactors must consider biomass volume fraction: Cell recycle example. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 29, no. 9, p. 1075–1080, 1987.

- MONOD, J. The growth of bacterial cultures. **Annual Reviews in Microbiology**, vol. 3, no. 10, p. 371–394, 1949.
- MOON, M. H.; RYU, J.; CHOENG, Y. H.; HONG, S. K.; KANG, H. A.; CHANG, Y. K. Enhancement of stress tolerance and ethanol production in *saccharomyces cerevisiae* by heterologous expression of a trehalose biosynthetic gene from *streptomyces albus*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, vol. 17, no. 5, p. 986–996, 2012.
- MORANDIN, M.; TOFFOLO, A.; LAZZARETTO, A.; MARÉCHAL, F.; ENSINAS, A. V.; NEBRA, S. A. Synthesis and parameter optimization of a combined sugar and ethanol production process integrated with a CHP system. **Energy**, vol. 36, no. 6, p. 3675–3690, 2011.
- MOSER, H. The dynamics of bacterial population maintained in the chemostat. Washington: Carnegie Institute of Washington, 1958.
- MURRAY-SMITH, D. J. Methods for the external validation of continuous system simulation models: A review. **Mathematical and Computer Modelling of Dynamical Systems**, vol. 4, no. 1, p. 5–31, 1998.
- NASCIMENTO, R. J.A.; MACEDO, G. R.; SANTOS, E. S.; OLIVEIRA, J. A. Real time and in situ near-infrared spectroscopy (nirs) for quantitative monitoring of biomass, glucose, ethanol and glycerine concentrations in an alcoholic fermentation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, vol. 34, no. 2, p. 459–468, 2017.
- ONU - Organização das Nações Unidas. Department of Economic and Social Affairs Sustainable Development. **United Nations**, vol. 6, p. 2022.
- NGUYEN, V. D.; AURESENIA, J.; KOSUGE, H.; TAN, R. R.; BRONDIAL, Y. Vacuum fermentation integrated with separation process for ethanol production. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 55, no. 3, p. 208–214, 2011.
- PENG, J.; JI, W.; MA, Z.; LI, S.; CHEN, S.. ScienceDirect Predicting total dissolved salts and soluble ion concentrations in agricultural soils using portable visible near-infrared and mid-infrared spectrometers. **Biosystems Engineering**, , p. 1–10, 2016.

PEREIRA, A. P.; MENDES-FERREIRA, A.; OLIVEIRA, J. M.; ESTEVINHO, L. M.; MENDES-FAIA, A. High-cell-density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* for the optimisation of mead production. **Food Microbiology**, vol. 33, no. 1, p. 114–123, 2013.

PEREIRA, R. D.; RODRIGUES, K. C. S.; SONEGO, J. L. S.; CRUZ, A. J. G.; BADINO, A. C. A New Methodology to Calculate the Ethanol Fermentation Efficiency at Bench and Industrial Scales. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, vol. 57, no. 48, p. 16182–16191, 2018.

PERRY, R H; GREEN, D W; MALONEY, J O. **Perry's Chemical Engineers' Handbook**. 7th ed., 1999.

PETRE, E.; SELIȘTEANU, D.; ROMAN, M. Advanced nonlinear control strategies for a fermentation bioreactor used for ethanol production. **Bioresource Technology**, vol. 328, 2021.

PHAM, C. B.; MOTOKI, M.; MATSUMURA, M.; KATAOKA, H. Simultaneous ethanol fermentation and stripping process coupled with rectification. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, vol. 68, no. 1, p. 25–31, 1989.

PHISALAPHONG, M.; SRIRATTANA, N.; TANTHAPANICHAKOON, W. Mathematical modeling to investigate temperature effect on kinetic parameters of ethanol fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 28, no. 1, p. 36–43, 2006.

PINTO, A. S.S.; PEREIRA, S. C.; RIBEIRO, M. P.A.; FARINAS, Cristiane S. Monitoring of the cellulosic ethanol fermentation process by near-infrared spectroscopy. **Bioresource Technology**, vol. 203, p. 334–340, 2016.

PULIGUNDLA, P.; SMOGROVICOVA, D.; SARATHI, V.; OBULAM, R.; KO, S. Very high gravity (VHG) ethanolic brewing and fermentation : a research update. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, , p. 1133–1144, 2011.

QURESHI, N.; MADDOX, I. S.; FRIEDL, A. Application of Continuous Substrate Feeding to the ABE Fermentation: Relief of Product Inhibition Using Extraction, Perstraction, Stripping, and Pervaporation. **Biotechnology Progress**, vol. 8, no. 5, p. 382–390, 1992.

RATHORE, S. S. S.; PAULSEN, M. R.; SHARMA, V.; SINGH, V. Use of near-infrared spectroscopy for monitoring fermentation in a corn dry grind ethanol process. **Transactions of the ASABE**, vol. 50, no. 6, p. 2337–2344, 2007. .

RFA - Renewable Fuels Association. Annual Ethanol Production. 2022. Disponível em: <https://ethanolrfa.org/markets-and-statistics/annual-ethanol-production>. Acesso em: 8 de dezembro de 2022.

RIVERA, E. C.; YAMAKAWA, C. K.; SAAD, M. B.W.; ATALA, D.I I.P.; AMBROSIO, W. B.; BONOMI, A.; JUNIOR, J.; ROSSELL, C. E.V. Effect of temperature on sugarcane ethanol fermentation: Kinetic modeling and validation under very-high-gravity fermentation conditions. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 119, p. 42–51, 2017.

RODRIGUES, K. C. S. Fermentação Alcoólica Extrativa com Remoção de Etanol por Arraste com CO₂ e Recuperação por Absorção. **Tese (Doutorado)**. Universidade Federal de São Carlos, p. 148, 2019. .

RODRIGUES, K. C. S.; SONEGO, J. L. S.; BERNARDO, A.; RIBEIRO, M. P. A.; CRUZ, A. J. G.; BADINO, A. C. Real-Time Monitoring of Bioethanol Fermentation with Industrial Musts Using Mid-Infrared Spectroscopy. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 2017.

RODRIGUES, K. C. S.; SONEGO, J. L. S.; CRUZ, A. J. G.; BERNARDO, A.; BADINO, A. C. Modeling and simulation of continuous extractive fermentation with CO₂stripping for bioethanol production. **Chemical Engineering Research and Design**, vol. 132, p. 77–88, 2018.

RODRIGUES, K. C. S.; VELOSO, I. I.K.; CRUZ, A. J.G.; BERNARDO, A.; BADINO, A. C. Ethanol Recovery from Stripping Gas Mixtures by Gas Absorption: Experimental and Modeling. **Energy and Fuels**, vol. 33, no. 1, p. 369–378, 2019.

RUIZ, L. Economia de milhões de reais. **Cana online: a vez da vinhaça**. Fermentec, São Paulo: Paiva e Baldin: n. 25, 71-77 p. 2015.

SAEYS, W.; MOUAZEN, A. M.; RAMON, H. Potential for onsite and online analysis of pig manure using visible and near infrared reflectance spectroscopy. **Biosystems Engineering**, vol. 91, no. 4, p. 393–402, 2005.

SANTOS, M. V. Estudo do Processo Integrado de Fermentação Alcoólica Extrativa com CO₂ com Desidratação por Adsorção e Recuperação por Absorção. **Tese (Doutorado)**. Universidade Federal de São Carlos, 2022.

SCHALK, R.; GEOERG, D.; STAUBACH, J.; RAEDLE, M.; METHNER, F. J.; BEUERMANN, T. Evaluation of a newly developed mid-infrared sensor for real-time monitoring of yeast fermentations. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, vol. 123, no. 5, p. 651–657, 2017.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. Biorreatores e Processos Fermentativos. *In*: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (eds.). **Biotecnologia Industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, vol. 2, p. 179–192, 2001.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess engineering: Basic concepts**. Nova York: Prentice Hall PTR, p. 553, 2002.

SILVA, C. R.; ESPERANÇA, M. N.; CRUZ, A. J.G.; MOURA, L. F.; BADINO, A. C. Stripping of ethanol with CO₂ in bubble columns: Effects of operating conditions and modeling. **Chemical Engineering Research and Design**, vol. 102, p. 150–160, 2015.

SKOOG, D; WEST, D; HOLLER, J; CROUCH, S. Fundamentos de Química Analítica. ed. 8, p. 1124, 2006.

SONEGO, J. L. S. Estudo da produção de etanol de sacarose por fermentação extrativa utilizando arraste com dióxido de carbono. **Tese (Doutorado)**. Universidade Federal de São Carlos, p. 1–142, 2016. .

SONEGO, J. L. S.; LEMOS, D. A.; PINTO, C. E. M.; CRUZ, A. J. G.; BADINO, A. C. Extractive Fed-Batch Ethanol Fermentation with CO₂ Stripping in a Bubble Column Bioreactor: Experiment and Modeling. **Energy and Fuels**, vol. 30, no. 1, p. 748–757, 2016.

SONEGO, J. L. S.; LEMOS, D A; CRUZ, A J G; BADINO, A C. Optimization of Fed-Batch Fermentation with in Situ Ethanol Removal by CO₂ Stripping. **Energy and Fuels**, vol. 32, no. 1, p. 954–960, 2018.

SONEGO, J. L. S.; LEMOS, D. A.; RODRIGUEZ, G. Y.; CRUZ, A. J. G.; BADINO, A. C. Extractive Batch Fermentation with CO₂ Stripping for Ethanol Production in a Bubble Column Bioreactor: Experimental and Modeling. **Energy & Fuels**, vol. 28, no. 12, p. 7552–7559, 2014.

SOUTO, G. D'A. B.; POVINELLI, J. Lixiviado de aterros sanitários brasileiros - estudo de remoção do nitrogênio amoniacal por processo de arraste com ar ("stripping"). **Tese (Doutorado)**. Universidade de São Paulo, São Carlos, p. 371, 2009.

SOUZA, C. S. Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *S. cerevisiae*. **Tese (Doutorado)**. Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT 2009.

STRODS, M.; MEZULE, L. Alcohol recovery from fermentation broth with gas stripping: System experimental and optimisation. **Agronomy Research**, vol. 15, no. 3, p. 897–904, 2017.

TAYLOR, F.; KURANTZ, M. J.; GOLDBERG, N.; CRAIG, J. C. Effects of ethanol concentration and stripping temperature on continuous fermentation rate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 48, no. 3, p. 311–316, 1997.

TAYLOR, F.; KURANTZ, M. J.; GOLDBERG, N.; CRAIG, J. C. Continuous Fermentation and Stripping of Ethanol. **Biotechnology Progress**, vol. 11, no. 6, p. 693–698, 1995.

TAYLOR, F.; KURANTZ, M. J.; GOLDBERG, N.; CRAIG, J. C. Control of packed column fouling in the continuous fermentation and stripping of ethanol. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 51, no. 1, p. 33–39, 1996.

TAYLOR, F.; MARQUEZ, M. A.; JOHNSTON, D. B.; GOLDBERG, N. M.; HICKS, K. B. Continuous high-solids corn liquefaction and fermentation with stripping of ethanol. **Bioresource Technology**, vol. 101, no. 12, p. 4403–4408, 2010.

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**, vol. 40, no. 2, p. 289–297, 1992.

THEERARATTANANOON, K.; LIN, Y. H.; PENG, D. Y. Metabolic heat evolution of *Saccharomyces cerevisiae* grown under very-high-gravity conditions. **Process Biochemistry**, vol. 43, no. 11, p. 1253–1258, 2008.

TORIJA, M. J.; ROZÈS, N.; POBLET, M.; GUILLAMÓN, J. M.; MAS, A. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 80, no. 1, p. 47–53, 2003.

TRUONG, K. N.; BLACKBURN, J. W. The stripping of organic chemicals in biological treatment processes. **Environmental Progress**, vol. 3, no. 3, p. 143–152, 1984.

TÜRKER-KAYA, S.; HUCK, C. W. A review of mid-infrared and near-infrared imaging: Principles, concepts and applications in plant tissue analysis. **Molecules**, vol. 22, no. 1, 2017.

URTUBIA, A.; PIZARRO, F.; AGOSIN, E.; PÉREZ-CORREA, J. R.. Exploring the applicability of MIR spectroscopy to detect early indications of wine fermentation problems. vol. 19, p. 382–388, 2008.

VELOSO, I. I. K. Modelagem e otimização da fermentação alcoólica em batelada alimentada a baixa temperatura. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Federal de São Carlos, 2019.

VELOSO, I. I. K.; RODRIGUES, K. C. S.; SONEGO, J. L. S.; CRUZ, A. J. G.; BADINO, A. C. Fed-batch ethanol fermentation at low temperature as a way to obtain highly concentrated alcoholic wines: Modeling and optimization. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 141, no. August 2018, p. 60–70, 2019.

WANDERLEY, M T. Estudo da termo-tolerância e parâmetros cinéticos da *Saccharomyces cerevisiae*. **Tese (Doutorado)**. Universidade Estadual de Campinas, 1994. .

WARREN, R. K.; HILL, G. A.; MACDONALD, D. G. Improved Bioreaction Kinetics for the Simulation of Continuous Ethanol Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Progress**, vol. 6, no. 5, p. 319–325, 1990.

WESTMAN, J. O; FRANZÉN, C. J. Current progress in high cell density yeast bioprocesses for bioethanol production. **Biotechnology Journal**, p. 1185–1195, 2015.

WHEALS, A. E.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G.; AMORIM, H. V. Fuel ethanol after 25 years. **Focus**, vol. 17, no. December, p. 482–487, 1999. .

- WILLIAMS, P. Implementation of Near-Infrared Technology. *In*: WILLIAMS, P; NORRIS, K (eds.). **Near-infrared technology in the agricultural and food industries**. Saint Paul, Minnesota: American Association of Cereal Chemists, 1987. p. 143–167.
- WU, Y. C.; HAO, O. J.; OU, K. C.; SCHOLZE, R. J. Treatment of leachate from a solid waste landfill site using a two-stage anaerobic filter. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 31, no. 3, p. 257–266, 1988.
- XUE, C.; DU, G. Q.; SUN, J. X.; CHEN, L. J.; GAO, S. S.; YU, M. L.; YANG, S. T.; BAI, F. W. Characterization of gas stripping and its integration with acetone-butanol-ethanol fermentation for high-efficient butanol production and recovery. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 83, p. 55–61, 2014.
- YAMAKAWA, C. K.; CCOPA, E.; KWON, H.; HERRERA, W. E.; SAAD, M. B. W.; LEAL, J.; ROSSELL, C. E. V.; BONOMI, A.; MACIEL, R. Study of influence of yeast cells treatment on sugarcane ethanol fermentation: Operating conditions and kinetics. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 147, no. August 2018, p. 1–10, 2019.
- YAO, L.; SETHARES, W. A. Nonlinear Parameter Estimation via the Genetic Algorithm. **IEEE Transactions on Signal Processing**, vol. 42, no. 4, p. 927–935, 1994.
- YOU, K. M.; ROSENFELD, C. L.; KNIPPLE, D. C. Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 69, no. 3, p. 1499–1503, 2003.
- ZHANG, Y; YANG, Y. Cross-validation for selecting a model selection procedure. **Journal of Econometrics**, vol. 187, no. 1, p. 95–112, 2015.