



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA
CENTRO MULTIDISCIPLINAR DE LUÍS EDUARDO MAGALHÃES
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA

FRANCISCA FERNANDA BENTA DE OLIVEIRA LEITE

AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DE TEMPERATURA POR DEGRAU
NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA VHG

LUÍS EDUARDO MAGALHÃES - BA
SETEMBRO - 2024

FRANCISCA FERNANDA BENTA DE OLIVEIRA LEITE

**AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DE TEMPERATURA POR DEGRAU
NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA VHG**

Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso II
apresentado ao curso de Engenharia de Biotecnologia
da Universidade Federal do Oeste da Bahia como
requisito parcial para a obtenção do grau de
Engenheira de Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Kaio César da Silva Rodrigues

LUÍS EDUARDO MAGALHÃES - BA

SETEMBRO – 2024

FICHA CATALOGRÁFICA

L533 Leite, Francisca Fernanda Benta de Oliveira.

Avaliação da redução de temperatura por degrau na fermentação alcoólica VHG.
Francisca Fernanda Benta de Oliveira Leite, 2024.

37 f.; il.

Orientador: Prof. Dr. Kaio César da Silva Rodrigues.
Trabalho de Conclusão de Curso: (Graduação em Engenharia de Biotecnologia) –
Universidade Federal do Oeste da Bahia. Centro Multidisciplinar de Luís Eduardo Magalhães,
Luís Eduardo Magalhães, BA, 2024.

1. Biocombustíveis -Etanol. 2. Fermentação – Processos biotecnológicos. 3. Energia renovável.

I. Rodrigues, Kaio César da Silva. II. Universidade Federal do Oeste da Bahia – Centro Multidisciplinar de Luís Eduardo Magalhães. III. Título.

CDD: 662.8

BIBLIOTECAS UFOB - Biblioteca Universitária de Luís Eduardo Magalhães




UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA
Centro Multidisciplinar de Luís Eduardo Magalhães - CMLEM
Colegiado do Curso de Engenharia de Biotecnologia - CEB

Ata da Apresentação de Trabalho de Conclusão de Curso II do Colegiado do Curso de Engenharia de Biotecnologia


Aos vinte dias do mês de setembro de 2024 (dois mil e vinte e quatro), às 13h58min (treze horas e cinquenta e oito minutos), em sala virtual do Google Meet, reuniu-se a banca examinadora da defesa de Trabalho de Conclusão de Curso II (TCC II), formada pelo docente orientador e presidente da banca, Prof. Dr. Kaio César da Silva Rodrigues, e pelos membros, Prof. Dr. Felipe da Silva Figueira e Prof. Dr. Jorge Luiz Silveira Sonego, para avaliar o TCC II intitulado “**AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DE TEMPERATURA POR DEGRAU NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA VHG**”, apresentado por **FRANCISCA FERNANDA BENTA DE OLIVEIRA LEITE** como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia. Após análise do trabalho, da apresentação e da arguição, a banca atribuiu média igual a **9,0** e, assim, considerou a discente **APROVADA**. E nada mais havendo, às 15h41min, eu, Kaio Césas da Silva Rodrigues, lavrei a presente ata que depois de lida será assinada por quem de direito. Luís Eduardo Magalhães, 20 de setembro de 2024.

Documento assinado digitalmente

 **KAIO CESAR DA SILVA RODRIGUES**
Data: 20/09/2024 15:46:22-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Professor orientador e presidente
da banca examinadora

Documento assinado digitalmente

 **FELIPE DA SILVA FIGUEIRA**
Data: 24/09/2024 14:17:26-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Membro da banca examinadora

Documento assinado digitalmente

 **JORGE LUIZ SILVEIRA SONEGO**
Data: 23/09/2024 14:22:18-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro da banca examinadora

Documento assinado digitalmente

 **FRANCISCA FERNANDA BENTA DE OLIVEIRA LEITE**
Data: 22/09/2024 09:05:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Aluno

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a todas as mulheres que assim como eu dispuseram boa parte de sua trajetória à produção científica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família por todo apoio que recebi ao escolher a graduação como caminho. Aos meus pais Francisco Wilson e Renilde por me mostrarem desde muito cedo através do amor que a educação era o melhor caminho. A minha avó Cecília por ser um dos meus maiores exemplos de resistência e força, ao meu avô Miguel por ter me apoiado sempre que precisei. As minhas irmãs Kédima Naiane por seu amor incondicional e Caline Cecília por me mostrar que tudo isso era possível e me levantar todas as vezes que pensei em desistir. A Marília Gabriela por sua amizade, carinho e presença nos momentos importantes.

Aos amigos universitários, os quais não posso agradecer nominalmente para evitar o erro de deixar alguém de fora. O carinho e amizade de todos foram fundamentais para me manter firme durante esses seis anos de engenharia. A equipe do CMLEM que me acolheu com muito carinho e dedicação, principalmente Anizia Pareja, Thauana de Almeida, Vanessa Carneiro, Adriana Caxiado e Elen Coutinho. A UFOB além de possuir um ensino de excelência também possui uma equipe de excelência, sempre vou amar todos vocês.

Aos queridos professores que colocaram de pé cada tijolo que me moldaram como engenheira, esse trabalho também faz parte de vocês. Aos matemáticos, físicos, químicos, biólogos, beletristas, administradores e engenheiros. Ao meu orientador Kaio Cesar da Silva Rodrigues por me conduzir em uma das partes mais fascinantes dos processos biológicos, a fermentação alcoólica. Sou grata por todas as horas dedicadas ao meu aprendizado, foram essenciais para nutrir a minha paixão pela Engenharia de Biotecnologia.

A nossa incrível equipe de pesquisa: Francyslayne por sua dedicação e paciência em me ajudar, a Lara por sua amizade e apoio e a Tawa por todas as horas que passou comigo em laboratório. Cada perrengue superado durante o processo de pesquisa foi mais fácil de lidar porque estávamos juntas.

A banca avaliadora Prof. Dr. Felipe da Silva Figueira e Prof. Dr. Jorge Luiz Silveira Sonego pelo tempo dedicado em avaliar esse trabalho. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pelo auxílio financeiro (Termo de Outorga n° PPP0008/2024).

E a mim por ter resistido a todo esse processo sem perder a minha essência e princípios, e por continuar acreditando que conseguiria chegar até aqui apesar de todas as dores.

Muito obrigada!

RESUMO

O bioetanol se apresenta como uma alternativa aos combustíveis fósseis por ser uma fonte renovável de energia. O dióxido de carbono liberado na sua queima é captado pelas plantas usadas como biomassa na sua produção. Porém, os custos associados ao processo produtivo e a elevada eficiência energética da gasolina colocam o bioetanol em segundo plano. Uma forma de aumentar a competitividade é obter maiores concentrações de etanol ao final da fermentação, sendo este um desafio ainda a ser superado no processo industrial. Nesse ponto, a fermentação em altíssima gravidade (VHG - sigla em inglês para *very high gravity*), processo normalmente conduzido em baixas temperaturas, se apresenta como uma alternativa. No entanto, fermentações VHG possuem alguns gargalos, como a baixa produtividade em etanol e o elevado consumo de água de resfriamento para manutenção da fermentação em baixas temperaturas. Esse projeto teve como objetivo avaliar se fermentações VHG conduzidas inicialmente em alta temperatura (34 °C - valor comumente utilizado em fermentações industriais) e finalizadas em baixa temperatura (28 °C - valor comumente utilizado em fermentações VHG) proporcionaria maiores desempenhos em comparação a fermentações VHG convencionais conduzidas a temperaturas constantes. Assim, foi avaliada a aplicação de degraus de temperatura (redução abrupta) em diferentes concentrações de etanol, visando encontrar o melhor momento para redução da temperatura. Com isso, foi possível verificar, com base nas velocidades instantânea e específica de produção de etanol, que o melhor momento para aplicação de degrau é no início da inibição gerada pelo produto, em uma concentração de etanol de 40 g·L⁻¹. Esse resultado representa bases científicas para o melhoramento dos processos fermentativos VHG para produção de bioetanol.

Palavras-chaves: bioetanol; fermentação em altíssima gravidade; degrau de temperatura; melhoramento de processos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da via metabólica da fermentação alcoólica realizada pela levedura <i>S. cerevisiae</i>	16
Figura 2 – Hidrólise da sacarose em meio aquoso através da ação da enzima invertase. ...	16
Figura 3 – Esquema ilustrativo da condução do processo.....	20
Figura 4 – Perfis das concentrações de células (C_X) nos diferentes ensaios. As linhas tracejadas indicam o momento da aplicação do degrau de temperatura de 34 para 28 °C..	28
Figura 5 – Perfis das concentrações de substrato (C_S) nos diferentes ensaios. As linhas tracejadas indicam o momento da aplicação do degrau de temperatura de 34 para 28 °C..	29
Figura 6 – Perfis das concentrações de etanol (C_E) nos diferentes ensaios. As linhas tracejadas indicam o momento da aplicação do degrau de temperatura de 34 para 28 °C..	30
Figura 7 – Velocidade instantânea de formação de etanol nos diferentes ensaios.....	31
Figura 8 – Velocidade específica de formação de etanol nos diferentes ensaios.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Condições que foram avaliadas nos diferentes ensaios fermentativos.	19
Tabela 2 – Principais resultados obtidos nas fermentações: concentração de final de etanol (C_{EF}); produtividade em etanol (P_E); conversão de substrato ao final do processo (X_{SF}); coeficiente de rendimento de substrato em células ($Y_{X/S}$); e coeficiente de rendimento de substrato em produto ($Y_{P/S}$).	26

LISTA DE SÍMBOLOS

- C_{ST} : concentração de substrato total do processo ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
- C_{ED} : concentração de etanol para aplicação de degrau ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
- V_0 : volume inicial (L)
- C_{S0} : concentração inicial de glicose ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
- C_{X0} : concentração inicial de células ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
- $V(t)$: volume da fase líquida no tempo “t” (L)
- $C_{S(t)}$: concentração de glicose variando no tempo ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
- $C_{X(t)}$: concentração de células variando no tempo ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
- $C_{E(t)}$: concentração de etanol variando no tempo ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
- C_{SP1} : concentração de substrato do primeiro pulso ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
- V_{P1} : volume do primeiro pulso (L)
- C_{SP2} : concentração de substrato do segundo pulso ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
- V_{P2} : volume do segundo pulso (L)
- $m_{CO_2(t)}$: massa de CO_2 liberada no tempo (g)
- MM_{etanol} : massa molar do etanol ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
- MM_{CO_2} : massa molar do CO_2 ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
- $m_{branco(t)}$: perda de massa do branco no tempo (g)
- ρ : densidade do meio de cultura ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
- $Y_{P/S}$: coeficiente de rendimento de substrato em produto ($\text{g}_p\cdot\text{g}_s^{-1}$)
- $Y_{X/S}$: coeficiente de rendimento de substrato em célula ($\text{g}_x\cdot\text{g}_s^{-1}$)
- C_{EF} : concentração final de etanol ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
- V_F : volume final da fase líquida (L)
- C_{SF} : concentração final de substrato ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
- C_{XF} : concentração final de células ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
- P_E : produtividade em etanol ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
- X_{SF} : conversão de substrato ao final do processo (%)
- t_F : tempo final da fermentação (h)
- t_0 : tempo inicial da fermentação (h)
- r_E : velocidade de formação de etanol ($\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$)
- m_E : massa de etanol (g)
- μ_E : velocidade específica de formação de etanol (h^{-1})

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	10
2.	OBJETIVOS.....	11
	2.1 OBJETIVO GERAL.....	11
	2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3.	REVISÃO DE LITERATURA	12
	3.1 PRODUÇÃO DE BIOETANOL NO BRASIL.....	12
	3.2 MODOS DE OPERAÇÃO DOS PROCESSOS FERMENTATIVOS	13
	3.3 FERMENTAÇÃO VHG.....	14
	3.4 BIOQUÍMICA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	15
	3.5 EFEITOS INIBITÓRIOS DA TEMPERATURA E ETANOL NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	17
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
	4.1 PREPARO DO MEIO DE CULTURA	18
	4.2 FERMENTAÇÕES VHG.....	18
	4.3 METODOLOGIAS ANALÍTICAS	20
	4.3.1 Concentração celular	20
	4.3.2 Concentração de etanol.....	20
	4.3.3 Concentração de glicose	22
	4.4 OBTENÇÃO DOS COEFICIENTES DE RENDIMENTO.....	22
	4.5 OBTENÇÃO DOS PERFIS DE CONCENTRAÇÃO	23
	4.6 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DAS FEMENTAÇÕES.....	24
	4.6.1 Parâmetros de desempenho do processo	24
	4.6.2 Avaliação da cinética de produção de etanol.....	25
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
	REFERÊNCIAS	34

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que em 2022, 82% do consumo de energia mundial adveio de combustíveis fósseis, valor que pode ser justificado pelo fato desses combustíveis possuírem grande eficiência energética (Energy Institute, 2023). O petróleo é o recurso mais utilizado, principalmente para produção de gasolina para o abastecimento de veículos (ANP, 2023). A queima de combustíveis fósseis para obtenção de energia representa uma parcela considerável da liberação de gases poluentes na atmosfera (SEEG, 2023).

O etanol advindo de biomassa, denominado bioetanol, é uma alternativa para diminuir os impactos da poluição gerada pela queima dos combustíveis fósseis. Este constitui uma fonte de energia proveniente de matérias-primas orgânicas, como o milho e cana-de-açúcar, sendo considerado renovável. A sua queima para produção de energia e locomoção de automóveis resulta na liberação de dióxido de carbono, a qual é compensada pela captação que as plantas realizam durante seu crescimento (Chuck-Hernández *et al.*, 2011). No Brasil a legislação exige que de 23 a 25% do volume total da gasolina vendida nos postos de abastecimento seja de etanol. Além de aumentar a octanagem e resistência a compressão, essa prática visa diminuir os impactos gerados pela queima do combustível fóssil (ANP, 2023).

O quarto relatório da safra 2022/23 da produção de cana-de-açúcar apresentou um crescimento de 3,6% na produção nacional de etanol se comparado a safra anterior, e um aumento de 14% em relação ao etano anidro, etanol adicionado à gasolina (CONAB, 2023). O aumento da demanda nacional mostra que processos de produção do bioetanol mais eficientes, que proporcionem maiores concentrações finais de etanol no caldo fermentativo e maiores produtividades, são desejáveis.

Industrialmente a produção de etanol possui uma grande limitação: a inibição pelo produto que a *Saccharomyces cerevisiae* sofre durante a fermentação (Gomes, 2020). Esse efeito está relacionado diretamente com a temperatura, que em elevadas faixas aumenta a fluidez da membrana celular, possibilitando o fluxo de substâncias tóxicas para o meio intracelular (Phisalaphong; Srirattana; Tanthapanichakoon, 2006). Esse processo inibitório dificilmente gera vinhos com teor alcoólico superior a 80 g·L⁻¹ (10°GL) (Velooso *et al.*, 2019).

Em condições de baixas temperaturas é viável aumentar a concentração de substrato no mosto para obter vinhos mais concentrados (Rivera; Yamakawa; Saad, 2017). O processo conduzido nesses termos é conhecido como fermentação em altíssima gravidade (VHG -

sigla em inglês para *very high gravity*), vantajoso pela economia energética na recuperação do etanol e geração de menor volume de vinhaça (Cruz; Resende; Ribeiro, 2021).

Mesmo solucionando o problema da inibição gerada pelo substrato, a fermentação VHG possui uma desvantagem associada à baixa produtividade em etanol devido ao lento metabolismo celular em temperaturas baixas (Veloso, 2019). A literatura apresenta poucos estudos que visam contornar esse gargalo do processo.

Diante disso, este trabalho irá avaliar a redução da temperatura durante o processo fermentativo VHG como uma alternativa para melhorar o processo. A hipótese experimental a ser testada é a de que um processo conduzido inicialmente em temperatura maior acelera o metabolismo celular, e a subsequente redução da temperatura quando o etanol inibe o metabolismo da levedura possibilita a continuidade do processo, resultando em um melhor desempenho em comparação a fermentações VHG convencionais em que a temperatura é mantida constante durante todo o processo.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a aplicação de degrau para redução de temperatura na fermentação alcoólica VHG em batelada alimentada por pulso de substrato, visando um aumento da produtividade em bioetanol no processo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para alcançar tal objetivo foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar o desempenho da fermentação VHG a 34 e 28°C em termos de concentração e produtividade de etanol e conversão de substrato; e
- Avaliar o desempenho da fermentação VHG com a aplicação de degrau de temperatura de 34°C para 28°C em diferentes concentrações de etanol.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 PRODUÇÃO DE BIOETANOL NO BRASIL

Nos últimos 50 anos, o Brasil despontou como uma grande potência na produção agrícola, o que se deve principalmente à grande disponibilidade de terras agricultáveis e água, boa incidência solar e investimentos em pesquisa agrícola (EMBRAPA, 2018).

O plantio de cana-de-açúcar para a indústria sucroalcooleira nacional chegou à marca de 610,1 milhões de toneladas na safra 2022/23, um aumento de 5,4% em relação ao período anterior. A produção de etanol se beneficiou desses números com um aumento da produção no Nordeste, além do crescimento do etanol de milho que chegou à marca de 3,97 bilhões de litros (CONAB, 2023).

De acordo com dados da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), em 2022 a produção de etanol no Brasil foi de 30,7 bilhões de litros, uma alta de 2,5% em relação ao ano anterior. A média anual no aumento da produção entre os anos de 2013 a 2022 é de 1,1%, valor ainda baixo para um combustível que pretende substituir uma importante fonte de energia não renovável (ANP, 2023).

Dentre as regiões da federação, a Sudeste lidera a produção de etanol com uma parcela de 49,2%, um total de 15,1 bilhões de litros. O estado de São Paulo produziu sozinho 12 bilhões de litros, 39% do volume da produção nacional. Na ordem de produção, tem-se Centro-Oeste com 40,7% (12,5 bilhões de litros), Nordeste com 5,7% (1,8 bilhões de litros), Sul com 3,5% (1,1 bilhões de litros) e Norte com 0,9% do total, correspondente a 269,8 milhões de litros (ANP, 2023).

Ainda segundo o relatório anual da ANP, o volume total de exportação do etanol brasileiro foi de 2,4 bilhões de litros. O etanol nacional foi destinado principalmente para as regiões da Ásia-Pacífico (906,2 milhões de litros), Europa (867,9 milhões de litros) e América do Norte (470,5 milhões de litros). O país que recebeu o maior volume de exportação foi a Coreia do Sul, com 739,5 milhões de litros. As importações atingiram o volume de 315,9 milhões de litros, sendo que 67,1% desse volume originam-se dos Estados Unidos (ANP, 2023).

No mercado internacional, os Estados Unidos lideram a produção de etanol. Em 2022, o país produziu 58,3 bilhões de litros, isso representa 55% da produção mundial. No ranking de produção, o Brasil ocupa o segundo lugar com 27% da produção mundial. O terceiro

colocado, a União Europeia, detém 5% dessa produção, o que evidencia a importância do Brasil na produção do biocombustível (RFA, 2023).

3.2 MODOS DE OPERAÇÃO DOS PROCESSOS FERMENTATIVOS

O processo em que os açúcares fermentescíveis são transformados em álcool etílico se chama fermentação alcoólica (Basso, 2004.). Esse processo ocorre em biorreatores, que são reatores químicos onde os processos são catalisados por biocatalisadores. As variações decorrentes das diversas possibilidades de condução de um biorreator se devem as características do microrganismo, o meio de cultivo e os objetivos do processo que se deseja executar (Hambor, 2012).

Os modos de operação empregados em um biorreator são três: descontínuo, contínuo e descontínuo alimentado. As particularidades de cada um podem ser adaptadas para abranger o processo que se deseja conduzir por meio de um biorreator. A principal diferença entre eles se apresenta pela forma como o substrato é adicionado e o caldo fermentado é retirado no processo (Larroche *et al.*, 2016).

O descontínuo, conhecido também como batelada, se caracteriza pela utilização de mosto esterilizado inoculado no início do processo e durante toda a fermentação nada é adicionado ou retirado. O caldo fermentado é retirado somente após a finalização do processo. Caso não ocorra perda de líquido por evaporação durante a fermentação, o volume permanece constante (Sonego, 2016). Nessas condições de operação, os riscos de contaminação são menores, contudo, os rendimentos podem ser baixos devido à inibição que o substrato pode apresentar (Schmidell *et al.*, 2021).

No processo contínuo ocorre entrada e saída simultâneas de meio contendo substrato e caldo fermentado, respectivamente, visando manter o volume constante dentro do biorreator (Veloso, 2019). Com isso é possível conduzir processos em estado estacionário por longos períodos. No entanto, a condição estacionária do processo exige maiores investimentos de instalação, aumenta a possibilidade de mutações genéticas e possíveis contaminações (Larroche *et al.*, 2016).

O processo descontínuo alimentado ou batelada alimentada consiste na alimentação gradual de meio de cultivo ou nutrientes durante o processo. Industrialmente, sua aplicação visa diminuir a inibição pelo substrato que as células podem sofrer ao decorrer do processo (Carvalho e Sato, 2001). O fluxo de alimentação do substrato pode ser contínuo ou intermitente, possibilitando o controle de sua concentração no mosto e o acúmulo de um

produto a partir do deslocamento do metabolismo celular para tal finalidade (Schmidell *et al.*, 2021).

Em fermentações alcoólicas o substrato é considerado inibitório em concentrações acima de $150 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Thatipamala; Rohani; Hill, 1992). Em processos que visam o menor gasto energético possível e grandes volumes de produção, a alimentação contínua evita condições inibitórias, otimizando o processo. O substrato presente no mosto alimentado ao longo do processo é constantemente convertido pela levedura em álcool e dióxido de carbono, o que o mantém em níveis menores, evitando a inibição (Schmidell *et al.*, 2021).

Cerca de 85% das destilarias brasileiras atuam com o modo de operação em batelada alimentada. O mosto é adicionado à suspensão de células, chamada de pé-de-cuba, durante um intervalo de tempo até que se atinja o volume útil da dorna (Velo, 2019). Em seguida, o processo continua até o consumo completo dos açúcares. Como o substrato é adicionado aos poucos, as células diminuem seu tempo de adaptação e reprodução se comparado à batelada, o que resulta em uma economia de açúcar e conseqüentemente um rendimento elevado em etanol (Tosetto, 2002).

3.3 FERMENTAÇÃO VHG

Com o objetivo de aumentar o teor de etanol no caldo para 15% (v.v-1) ou mais, na década de 1990 começou-se a usar mostos com concentração de 25% ($\text{m}\cdot\text{m}^{-1}$) açúcares redutores totais (ART) (Bayrock; Ingledew, 2001). Esse processo é conhecido como fermentação alcoólica em altíssima gravidade, ou VHG (sigla em inglês para *very high gravity*). Essa abordagem além de aumentar o teor de etanol no vinho também reduz o consumo de vapor na destilação, a produção de vinhaça e os custos associados aos equipamentos (Velo *et al.*, 2019).

As fermentações podem ser categorizadas em NG (*normal gravity*), HG (*high gravity*) e VHG, dependendo da concentração de substrato. Fermentações NG são realizadas com até $180 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ART, enquanto fermentações HG empregam de 180 a $250 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ART, e fermentações VHG utilizam mais de $250 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ART. Nessa última, empregam-se baixas temperaturas durante a fermentação para minimizar o efeito inibitório do etanol, possibilitando a utilização de mostos com concentrações mais elevadas de ART (Rivera; Yamakawa; Saad, 2017).

O uso de temperaturas mais baixas em fermentações VHG resulta na obtenção de vinhos mais concentrados em etanol. Entretanto, essa estratégia apresenta uma limitação

importante, especificamente, uma produtividade volumétrica em etanol mais baixa em comparação com fermentações convencionais ($9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) (Sonego *et al.*, 2016; Veloso *et al.*, 2019). Além disso, é relevante destacar que a manutenção da fermentação em temperaturas inferiores ao longo de todo o processo está frequentemente associada ao consumo de grandes volumes de água de resfriamento (Veloso *et al.*, 2023).

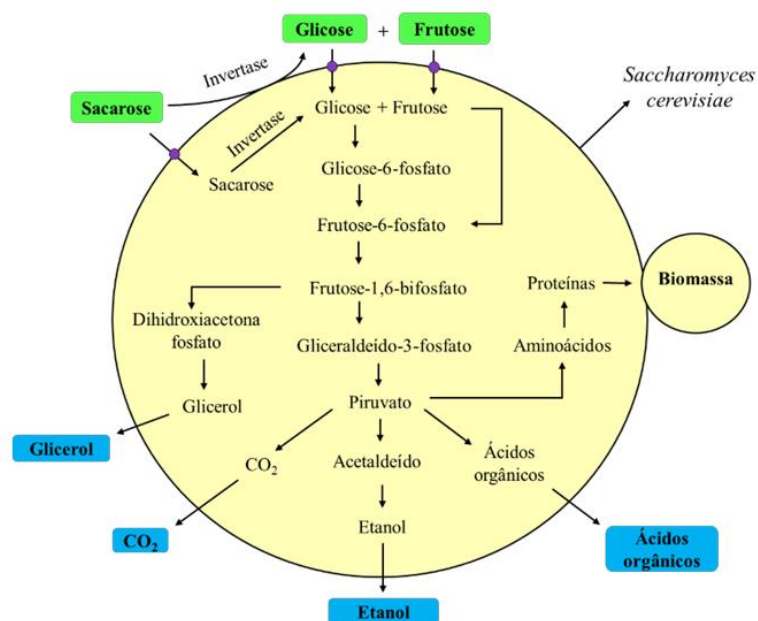
Dada a influência da temperatura na fermentação alcoólica, a redução da temperatura durante o processo pode ser uma estratégia interessante para superar as limitações mencionadas. Desta forma, busca-se favorecer a velocidade de produção de etanol ao empregar temperaturas mais elevadas no início do processo e, subsequentemente, reduzir a toxicidade do etanol utilizando temperaturas mais baixas apenas na fase final da fermentação.

3.4 BIOQUÍMICA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

A produção de etanol ocorre por meio do metabolismo celular da *Saccharomyces cerevisiae* que em condições anaeróbicas converte glicose em dióxido de carbono e etanol (Bastos, 2010). A levedura consome açúcares para conseguir energia na forma de Adenosina Trifosfato (ATP) suficiente para o seu ciclo de vida. O etanol é apenas um subproduto desse processo, não possuindo nenhuma utilidade para o microrganismo, e por isso é excretado (Amorim; Basso; Alves, 1996).

O processo biológico ocorre no citoplasma celular em uma sequência ordenada de reações químicas conduzidas por enzimas glicolíticas (Lima; Basso; Amorim, 2001). A Figura 1 apresenta um esquema simplificado da via metabólica do processo de produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*.

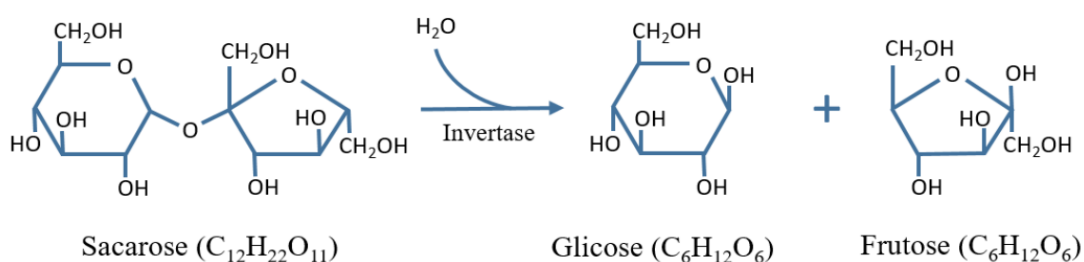
Figura 1 – Representação esquemática da via metabólica da fermentação alcoólica realizada pela levedura *S. cerevisiae*.



Fonte: Rodrigues (2019).

O processo de produção alcoólica a partir da cana-de-açúcar ocorre primeiramente com a quebra da sacarose à glicose e frutose, feita pela ação da enzima invertase, como é possível observar na Figura 2.

Figura 2 – Hidrólise da sacarose em meio aquoso através da ação da enzima invertase.



Fonte: Veloso (2019).

Com os monossacarídeos disponíveis, a levedura realiza a fermentação. Em condições anaeróbicas, a produção de álcool etílico e dióxido de carbono ocorre de acordo com a Equação 1 (Lopes; Borges, 2009).



Respectivamente, as massas molares de hexose, etanol e dióxido de carbono são 180, 42 e 44 g·mol⁻¹. De acordo com a estequiometria da reação, 1 mol de hexose (180 g) é convertido em 2 mols de etanol (92 g) e 2 mols de dióxido de carbono (88 g). Isso resulta nos coeficientes de rendimento teórico de substrato para etanol e para CO₂ de 0,511 g·g⁻¹ e 0,489 g·g⁻¹, respectivamente. Entretanto, na prática, a célula usa parte do substrato para suprir outras funções celulares, resultando em produção de glicerol, ácidos orgânicos e biomassa. Nas destilarias, o rendimento em etanol obtido varia entre 89 e 91,5% do teórico (Dias *et al.*, 2015).

3.5 EFEITOS INIBITÓRIOS DA TEMPERATURA E ETANOL NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Na fermentação alcoólica, o etanol produzido atua como o principal inibidor do metabolismo da levedura. Quando sua concentração no caldo ultrapassa 40 g·L⁻¹, o metabolismo da levedura é afetado, resultando em uma redução na velocidade de formação do produto. Reporta-se que em concentrações acima de 90 g·L⁻¹, o metabolismo pode ser completamente inibido, especialmente em fermentações conduzidas a 34 °C (Maiorella *et al.* 1983). Além de inibir o crescimento celular, o acúmulo de etanol no caldo fermentativo provoca a desativação de algumas enzimas, resultando em uma redução na viabilidade celular (Basso; Basso; Basso, 2020).

Na produção de etanol, a faixa de temperatura considerada ideal encontra-se entre 26 °C e 35 °C. No entanto, não é incomum que a temperatura nas destilarias alcance 38 °C. À medida que a temperatura aumenta, a velocidade da fermentação também aumenta, mas isso pode favorecer a contaminação bacteriana. Além disso, as leveduras tornam-se mais sensíveis à toxicidade do próprio etanol (Lima, 2019). Isso ocorre porque temperaturas elevadas resulta em maior fluidez da membrana celular, o que, por sua vez, facilita o fluxo de substâncias tóxicas para o interior da célula (Madeira *et al.*, 2010). A presença do etanol também contribui para alterações da composição da membrana citoplasmática. Como consequência, a permeabilidade dessa membrana para certos íons, como os íons de hidrogênio, aumenta significativamente (Alexandre, 1994).

Ao reduzir a temperatura da fermentação, observa-se um aumento na resistência da levedura ao etanol, bem como uma diminuição na formação de subprodutos indesejados durante o processo. Isso ocorre devido a menores níveis de estresse em condições de menor

temperatura (Lora; Venturi, 2012). Portanto, esta pode ser uma alternativa para fermentações alcoólicas VHG, visando a obtenção de vinhos com alto teor de etanol, que apresentam diversas vantagens. Eles possibilitam a redução do consumo de água, por meio da menor diluição do mosto, e diminuem o gasto energético durante a etapa de destilação, contribuindo para a sustentabilidade do processo industrial. Nas destilarias, o teor final de etanol é limitado pela tolerância da linhagem utilizada no processo (Basso; Basso; Rocha, 2011). Por outro lado, a produtividade em etanol em processos conduzidos em temperaturas menores tende a diminuir como consequência da redução das velocidades do metabolismo (Torija et al., 2003).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PREPARO DO MEIO DE CULTURA

O meio de cultura foi formulado com base no meio proposto por Sonego *et al.* (2016) com a seguinte composição: glicose (concentração total de $260 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), KH_2PO_4 ($6,72 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($1,68 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), extrato de levedura ($8,16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e ureia ($6,38 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). O pH do meio de cultura foi ajustado para 4,6 através da adição de ácido clorídrico (HCl) na concentração de 1M.

4.2 FERMENTAÇÕES VHG

Nos ensaios fermentativos, foi avaliada a mudança de temperatura de 34 para 28°C, na forma de degrau (redução abrupta), em condições de altíssima gravidade (VHG). Foram realizados dois ensaios controles conduzidos inteiramente nas temperaturas de 34 e 28°C. O primeiro está dentro da faixa amplamente usada industrialmente para as fermentações alcoólicas em batelada alimentada (Basso *et al.*, 2011). O segundo é uma condição VHG comumente reportada na literatura e foi utilizada para comparação com as fermentações VHG com degrau (Veloso *et al.*, 2019). A redução de temperatura foi avaliada em diferentes concentrações de etanol no caldo, visando avaliar qual o melhor momento para aplicar o degrau. Na Tabela 1 estão apresentados os ensaios fermentativos realizados e as condições experimentais.

Tabela 1– Condições que foram avaliadas nos diferentes ensaios fermentativos.

Ensaio	Temperatura (°C)	C _{ST} (g·L ⁻¹)	C _{ED} (g·L ⁻¹)
1	28	260	-
2	34	260	-
3	34 - 28	260	40
4	34 - 28	260	60
5	34 - 28	260	80

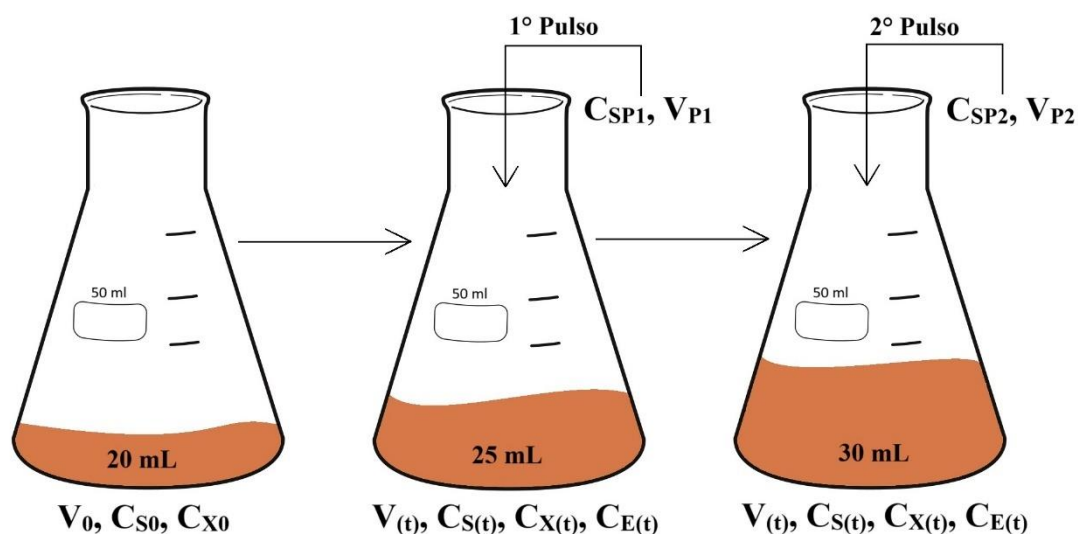
C_{ST}: concentração de substrato total do processo; C_{ED}: concentração de etanol para aplicação de degraú.

Todos os ensaios foram conduzidos em batelada alimentada com dois pulsos de solução de glicose. Os ensaios foram iniciados com 130 g·L⁻¹ de glicose (C_{S0}) em um volume inicial de caldo fermentativo de 20 mL (V₀) e, posteriormente, foram adicionados dois pulsos de solução de glicose de 5 mL (V_{P1} e V_{P2}) com concentração de 520 g·L⁻¹, (C_{SP1} e C_{SP2}) completando o volume total do processo de 30 mL e a concentração total de substrato de 260 g·L⁻¹. Os pulsos foram adicionados em momentos diferentes quando a concentração de glicose alcançou aproximadamente 20 g·L⁻¹. Os ensaios foram realizados em triplicata.

As fermentações foram realizadas utilizando uma linhagem comercial liofilizada de *Saccharomyces cerevisiae*. A levedura foi previamente hidratada em água destilada e, em seguida, inoculada (6 mL) em uma concentração de 30 g·L⁻¹ (C_{X0}) no meio de cultura (14 mL), o qual foi distribuído em frascos Erlenmeyer de 50 mL. Após a inoculação, os frascos foram cobertos com filme de PVC com um pequeno furo para permitir a saída dos gases e evitar a entrada de ar no sistema. Em seguida, os frascos foram pesados em balança analítica, para obtenção da massa inicial, e transferidos para uma mesa incubadora rotativa com controle de temperatura e frequência de 120 rotações por minuto. As fermentações foram conduzidas até 12,5 horas de processo, e a cada intervalo de 30 minutos, os frascos foram pesados para determinação da concentração de etanol.

A Figura 3 apresenta de forma esquemática como o processo foi conduzido.

Figura 3 – Esquema ilustrativo da condução do processo.



Fonte: Acervo pessoal da autora. Legenda: V_0 = volume inicial; C_{S0} = concentração inicial de glicose; C_{X0} = concentração inicial de células; $V(t)$ = volume da fase líquida variando no tempo; $C_{S(t)}$ = concentração de glicose variando no tempo; $C_{X(t)}$ = concentração de células variando no tempo; $C_{E(t)}$ = concentração de etanol variando no tempo; C_{SP1} = concentração de substrato do primeiro pulso; V_{P1} = volume do primeiro pulso; C_{SP2} = concentração de substrato do segundo pulso; V_{P2} = volume do segundo pulso.

4.3 METODOLOGIAS ANALÍTICAS

4.3.1 Concentração celular

A concentração de células foi determinada no início e no final das fermentações por método gravimétrico, mesmo utilizado por Sonego *et al.* (2016). As amostras passaram por centrifugação e as duas fases foram separadas. Na sequência, foi adicionada água destilada à fase de fundo, a qual foi submetida mais uma vez à centrifugação. Por fim, a fase de fundo foi colocada em estufa a 70 °C por 48 horas para obtenção da concentração em base seca.

4.3.2 Concentração de etanol

A concentração de etanol ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) foi determinada com base na metodologia proposta por Mesquita (2021). A perda de massa de CO_2 nos biorreatores foi acompanhada a cada intervalo de 30 minutos por meio da pesagem dos frascos de fermentação. Dessa maneira, foi possível determinar a evolução da concentração de etanol ($C_{E(t)}$) ao longo do tempo,

empregando a relação estequiometria, 1 mol de etanol/1 mol de CO₂, da reação de fermentação alcoólica (Equação 1), conforme a Equação 2. Note que a Equação 2 considera os novos valores de volume após a aplicação dos pulsos.

$$C_{E(t)} = \frac{MM_{etanol} \cdot m_{CO_2(t)}}{MM_{CO_2} \cdot V_{(t)}} \quad (2)$$

em que:

$m_{CO_2(t)}$ = massa de CO₂ liberada no tempo “t” (g);

MM_{etanol} = massa molar do etanol (g·mol⁻¹);

MM_{CO_2} = massa molar do CO₂ (g·mol⁻¹);

$V_{(t)}$ = volume da fase líquida no tempo “t” (L).

Na Equação 2, para obtenção da massa de CO₂ liberada com o tempo em cada ensaio, foi medida a perda de massa nos frascos de fermentação e, simultaneamente, a perda de massa em um frasco contendo apenas meio de cultura ($m_{branco(t)}$), denominado branco. Assim, $m_{CO_2(t)}$ foi calculada a partir da diferença entre a perda de massa na fermentação e a perda de massa no branco.

O volume da fase líquida ao longo do tempo, na Equação 2, foi calculado conforme a seguinte equação:

$$V_{(t)} = V_0 + V_{P1} + V_{P2} - \frac{m_{branco(t)}}{\rho} \quad (3)$$

em que:

$m_{branco(t)}$ = perda de massa do branco no tempo “t” (g);

ρ = densidade do meio de cultura (g·L⁻¹) (considerou-se a densidade da água).

Na Equação 3, o termo V_{P1} é igual a zero até a aplicação do primeiro pulso e o termo V_{P2} igual a zero até a aplicação do segundo pulso. Os valores de densidade foram alterados de acordo com a temperatura do processo.

4.3.3 Concentração de glicose

As concentrações iniciais e finais de glicose em todos os ensaios fermentativos foram determinadas por meio de método colorimétrico adaptado de Miller (1959), utilizando o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) como agente oxidante. A solução foi composta por 75 g de Tartarato, 4 g de NaOH e 2,5 g de DNS, todos dissolvidos em 250 mL de água destilada. Durante a determinação da concentração, amostras de cada ensaio nos pontos inicial e final da fermentação foram cuidadosamente diluídas em tubos de amostra, totalizando volume final de 500 μL .

Em seguida, foi adicionado um volume equivalente (500 μL) de solução DNS a cada tubo. As soluções resultantes dessa mistura foram então aquecidas em banho-maria a 100°C por cinco minutos e, posteriormente, resfriadas em banho de gelo. Após esse processo, 5 mL de água destilada foram adicionados a cada tubo, e a leitura da absorbância foi realizada a 540 nm. Os resultados obtidos foram relacionados com as concentrações de glicose através de uma curva padrão construída seguindo os mesmos passos mencionados anteriormente, com concentrações padronizadas de glicose de 0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

4.4 OBTENÇÃO DOS COEFICIENTES DE RENDIMENTO

A determinação do coeficiente de rendimento de substrato em produto ($Y_{P/S}$) e o coeficiente de rendimento de substrato em célula ($Y_{X/S}$) foi realizada separadamente para cada ensaio considerando que eles podem variar nas diferentes condições do processo. No início de cada fermentação, foram determinadas as concentrações de células e substrato e, no final, as concentrações de etanol (a partir da perda de massa de CO_2), substrato e células.

A partir dos dados, o $Y_{P/S}$ foi calculado a partir da seguinte equação:

$$Y_{P/S} = \frac{C_{EF} \cdot V_F}{C_{S0} \cdot V_0 + C_{SP1} \cdot V_{P1} + C_{P2} \cdot V_{P2} - C_{SF} \cdot V_F} \quad (4)$$

em que:

C_{EF} = concentração final de etanol ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$);

V_F = volume final da fase líquida (L);

C_{S0} = concentração de substrato no início da fermentação ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$);

- V_0 = volume inicial da fase líquida (L);
 C_{SP1} = concentração de substrato no primeiro pulso ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$);
 V_{P1} = volume do primeiro pulso (L);
 C_{SP2} = concentração de substrato no segundo pulso ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$);
 V_{P2} = volume do segundo pulso (L);
 C_{SF} = concentração final de substrato ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

No mesmo sentido, foi possível obter o $Y_{X/S}$ aplicando a equação:

$$Y_{X/S} = \frac{C_{XF} \cdot V_F - C_{X0} \cdot V_0}{C_{S0} \cdot V_0 + C_{SP1} \cdot V_{P1} + C_{P2} \cdot V_{P2} - C_{SF} \cdot V_F} \quad (5)$$

em que:

- C_{XF} = concentração final de células ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$);
 C_{X0} = concentração inicial de células ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

4.5 OBTENÇÃO DOS PERFIS DE CONCENTRAÇÃO

Os valores de concentrações de substrato ($C_{S(t)}$) e células ($C_{X(t)}$) ao longo do tempo nas fermentações VHG em batelada alimentada por pulso foram determinados a partir dos coeficientes $Y_{P/S}$ e $Y_{X/S}$, respectivamente, conforme as Equações 5 e 6.

$$C_{S(t)} = C_{S0} \cdot \frac{V_0}{V(t)} + C_{SP1} \cdot \frac{V_{P1}}{V(t)} + C_{SP2} \cdot \frac{V_{P2}}{V(t)} - \frac{1}{Y_{P/S}} \cdot C_{E(t)} \quad (6)$$

$$C_{X(t)} = Y_{X/S} \cdot \left(C_{S0} \cdot \frac{V_0}{V(t)} + C_{SP1} \cdot \frac{V_{P1}}{V(t)} + C_{SP2} \cdot \frac{V_{P2}}{V(t)} - C_{S(t)} \right) + C_{X0} \cdot \frac{V_0}{V(t)} \quad (7)$$

em que:

o termo $\left(C_{SP1} \frac{V_{P1}}{V(t)}\right)$ é igual a zero até a aplicação do primeiro pulso e o termo $\left(C_{SP2} \frac{V_{P2}}{V(t)}\right)$ igual a zero até a aplicação do segundo pulso.

4.6 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DAS FEMENTAÇÕES

4.6.1 Parâmetros de desempenho do processo

O desempenho dos processos foi delimitado a partir de dois importantes parâmetros, a produtividade em etanol (P_E) e a conversão de substrato ao final do processo (X_{SF}).

A produtividade em etanol foi determinada pela relação entre a quantidade total de etanol produzido e o tempo de fermentação, utilizando a equação:

$$P_E = \frac{C_{EF} - C_{E0}}{t_F - t_0} \quad (8)$$

em que:

- C_{EF} = concentração de etanol no final da fermentação ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$);
- C_{E0} = concentração de etanol no início da fermentação ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$);
- t_F = tempo final da fermentação (h); e
- t_0 = tempo inicial da fermentação (h).

A conversão de substrato ao final do processo, é fundamental para fins de comparação entre diferentes condições de processo, porque estabelece o quanto de substrato, em termos percentuais, foi consumido durante todo o processo. A seguinte equação foi utilizada para sua determinação:

$$X_{SF} = \frac{(C_{S0} \cdot V_O + C_{SP1} \cdot V_{P1} + C_{P2} \cdot V_{P2}) - C_{SF} \cdot V_F}{C_{S0} \cdot V_O + C_{SP1} \cdot V_{P1} + C_{P2} \cdot V_{P2}} \cdot 100 \quad (9)$$

4.6.2 Avaliação da cinética de produção de etanol

A evolução dos valores de concentração de etanol com o tempo no processo possibilita a avaliação da cinética de produção etanol a partir das suas velocidades. A velocidade instantânea de formação de produto para um processo em batelada alimentada pode ser determinada a partir da variação da massa de produto formado ao longo do tempo, conforme a seguinte equação:

$$r_E = \frac{1}{V_{(t)}} \cdot \frac{dm_E}{dt} \quad (10)$$

em que:

$$\begin{aligned} r_E &= \text{velocidade de formação de etanol (g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}\text{);} \\ \frac{dm_E}{dt} &= \text{derivada da massa de etanol em relação ao tempo (g}\cdot\text{h}^{-1}\text{).} \end{aligned}$$

Para a resolução da derivada foi usado o método da diferença dividida finita centrada, para a primeira derivada (Chapra; Canale, 2016). Dessa forma a aproximação da equação que descreve o comportamento da derivada é dada da seguinte forma:

$$\frac{dm_E}{dt} \approx \frac{m_E(t_{i+1}) - m_E(t_{i-1}))}{t_{i+1} - t_{i-1}} \quad (11)$$

Para o ponto experimental inicial foi aplicado o método da diferença dividida finita progressiva, e para o ponto experimental final o método da diferença dividida finita regressiva (Chapra; Canale, 2016). As Equações (12) e (13) apresentam respectivamente como isso foi feito.

$$\frac{dm_E}{dt} \approx \frac{m_E(t_{i+1}) - m_E(t_i)}{t_{i+1} - t_i} \quad (12)$$

$$\frac{dm_E}{dt} \approx \frac{m_E(t_i) - m_E(t_{i-1}))}{t_i - t_{i-1}} \quad (13)$$

Levando em consideração que as variações nas concentrações de células afetam a formação de etanol no processo, é viável relacionar a velocidade instantânea com a concentração de células em um dado momento e encontrar a velocidade específica de formação de etanol (μ_E , h^{-1}):

$$\mu_E = r_E \cdot \frac{1}{C_{X(t)}} \quad (14)$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 apresenta comparativamente os principais resultados obtidos para os ensaios nas diferentes condições de temperatura. Os desvios padrões das medidas em triplicata dos parâmetros também são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Principais resultados obtidos nas fermentações: concentração de final de etanol (C_{EF}); produtividade em etanol (P_E); conversão de substrato ao final do processo (X_{SF}); coeficiente de rendimento de substrato em células ($Y_{X/S}$); e coeficiente de rendimento de substrato em produto ($Y_{P/S}$).

Ensaio	C_{EF} ($g \cdot L^{-1}$)	P_E ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)	X_{SF} (%)	$Y_{X/S}$ ($g_X \cdot g_S^{-1}$)	$Y_{P/S}$ ($g_P \cdot g_S^{-1}$)
1	$76,11 \pm 0,79$	$6,09 \pm 0,06$	$67,59 \pm 1,45$	$0,036 \pm 0,004$	$0,451 \pm 0,010$
2	$78,58 \pm 0,67$	$6,29 \pm 0,05$	$65,68 \pm 0,72$	$0,026 \pm 0,006$	$0,476 \pm 0,010$
3	$76,88 \pm 0,73$	$6,15 \pm 0,06$	$68,89 \pm 1,70$	$0,034 \pm 0,003$	$0,459 \pm 0,005$
4	$73,51 \pm 3,04$	$5,88 \pm 0,24$	$66,56 \pm 1,00$	$0,025 \pm 0,005$	$0,463 \pm 0,020$
5	$78,02 \pm 0,28$	$6,24 \pm 0,02$	$66,01 \pm 0,31$	$0,019 \pm 0,004$	$0,484 \pm 0,005$

1: fermentação a 28°C; 2: fermentação a 34°C; 3: fermentação com degrau de temperatura em $C_{ED} = 40 g \cdot L^{-1}$; 4: fermentação com degrau de temperatura em $C_{ED} = 60 g \cdot L^{-1}$; 5: fermentação com degrau de temperatura em $C_{ED} = 80 g \cdot L^{-1}$. Os valores a direita indica o desvio da média das medidas em triplicada.

Observando os desvios dos dados tabelados, verifica-se que não houve expressivas diferenças entre os valores dos parâmetros de desempenho C_{EF} , P_E , X_{SF} obtidos nas fermentações realizadas considerando o tempo de 12,5 horas de fermentação. Cabe salientar que, devido às limitações de tempo do processo, não foi possível observar claramente os efeitos das diferentes condições de temperatura nos resultados de desempenho.

Possivelmente, se as fermentações fossem conduzidas por mais tempo, os efeitos inibitórios gerados pelo produto no consumo de substrato e na produção de seriam mais pronunciados.

Com relação ao coeficiente de rendimento de substrato em células, observou-se maior valor na fermentação conduzida à temperatura constante de 28 °C em comparação à fermentação de 34 °C. Estudos da literatura reportaram um comportamento similar (Riveira *et al.*, 2017; Veloso *et al.*, 2019; Cruz, 2019). A baixa temperatura permite o acúmulo de massa celular no processo, resultando em um elevado valor de $Y_{X/S}$.

Para as fermentações com degrau de temperatura, onde o a aplicação de degrau demorou mais tempo para ocorrer (C_{ED} de 60 e 80 $g \cdot L^{-1}$) o comportamento de $Y_{X/S}$ foi similar ao ensaio conduzido inteiramente a 34°C. No ensaio em que a temperatura foi reduzida na menor concentração de etanol (C_{ED} de 40 $g \cdot L^{-1}$), o valor de $Y_{X/S}$ foi mais próximo da fermentação conduzida inteiramente a 28°C.

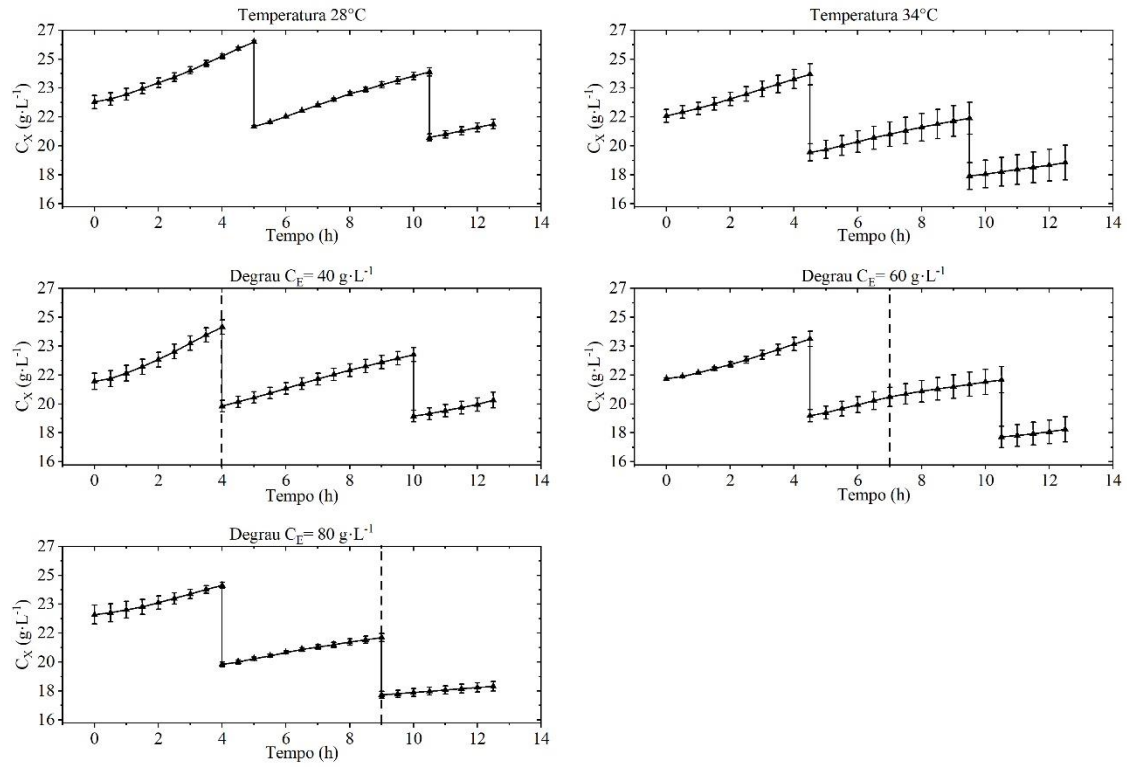
No que diz respeito ao coeficiente de rendimento de substrato em etanol, o comportamento foi inverso ao de $Y_{X/S}$, com o menor valor sendo observado na fermentação a 28 °C e o maiores valores para as fermentações a 34 °C e com degrau em C_{ED} de 80 $g \cdot L^{-1}$. Para as outras condições de degrau, os valores obtidos para o parâmetro $Y_{P/S}$ foram intermediários.

Fermentações em temperaturas e concentrações de etanol elevados, interferem na fluidez e permeabilidade da membrana plasmática, isso exige uma maior quantidade de energia na forma de ATP (adenosina trifosfato) para manutenção celular. Neste caso, aumentam-se, portanto, os custos energéticos para produção de biomassa (Basso; Basso; Basso, 2020). A mudança brusca de temperatura nas condições de degraus representa uma condição de estresse, exige uma nova adaptação da levedura ao meio e, portanto, também implica em maior gasto energético para manutenção celular. Portanto, nas condições de maiores temperaturas e estresse térmico devido ao degrau associado com maiores concentrações de etanol, o metabolismo celular se desloca para a produção de energia e conseqüentemente para uma maior conversão de substrato em etanol (Basso; Basso; Basso, 2020). Tal fato justifica tanto o comportamento de $Y_{X/S}$ como de $Y_{P/S}$ nas fermentações, além dos valores de C_{EF} ligeiramente superiores nas fermentações a 34 °C e com degrau em C_{ED} de 80 $g \cdot L^{-1}$.

As Figuras de 4-6 apresentam os perfis de concentração de células (C_X), concentração de substrato (C_S) e concentração de etanol (C_E), para os ensaios de 1 a 5. Os desvios padrões das medidas obtidas em triplicatas foram adicionados como barras de erro.

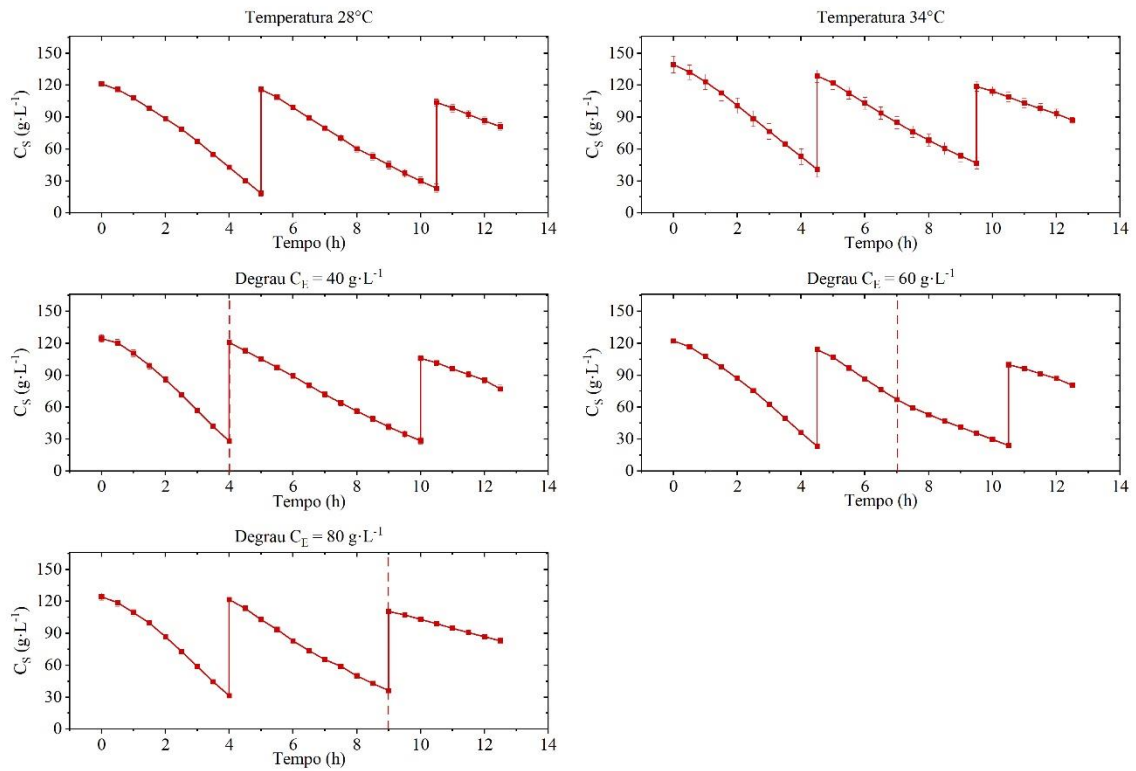
Os pontos experimentais onde não é possível visualizar as barras apresentaram desvios padrões muito pequenos para serem representados graficamente.

Figura 4 – Perfis das concentrações de células (C_X) nos diferentes ensaios. As linhas tracejadas indicam o momento da aplicação do degrau de temperatura de 34 para 28 °C.



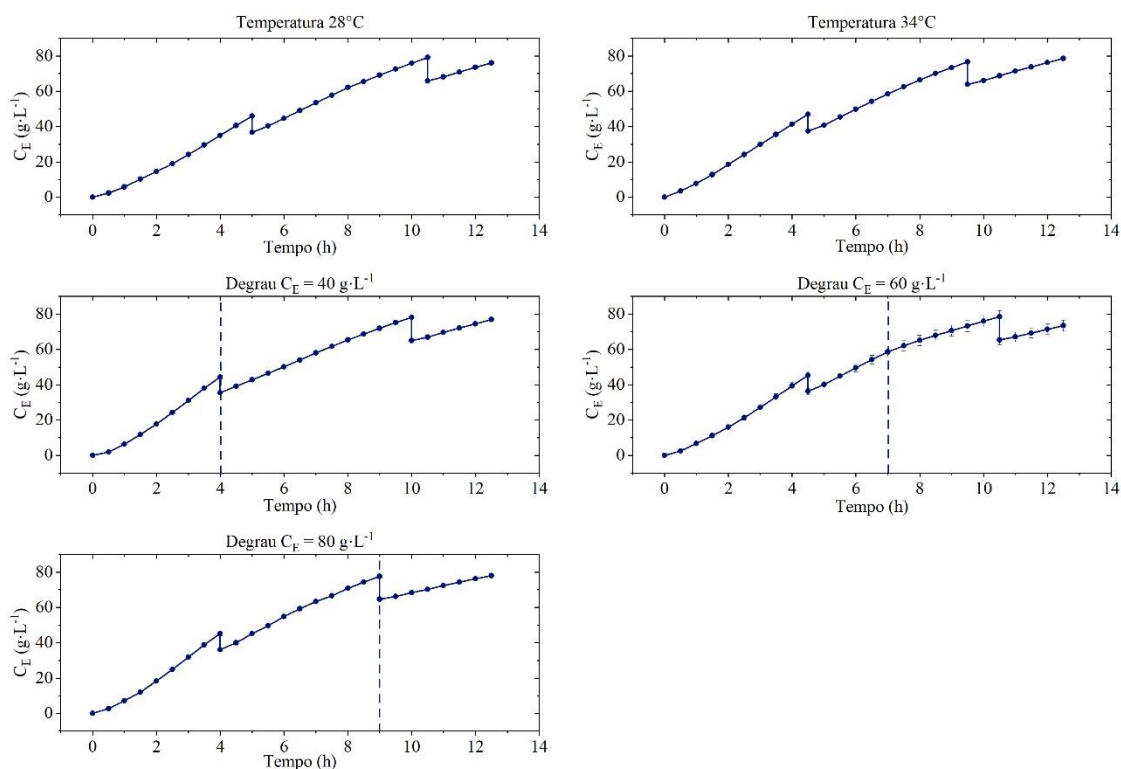
Fonte: Acervo pessoal da autora.

Figura 5 – Perfis das concentrações de substrato (C_S) nos diferentes ensaios. As linhas tracejadas indicam o momento da aplicação do degrau de temperatura de 34 para 28 °C.



Fonte: Acervo pessoal da autora.

Figura 6 – Perfis das concentrações de etanol (C_E) nos diferentes ensaios. As linhas tracejadas indicam o momento da aplicação do degrau de temperatura de 34 para 28 °C.



Fonte: Acervo pessoal da autora.

Os perfis apresentados pelas figuras acima ratificam o argumento em relação à produção de biomassa. As condições de degraus que permaneceram mais tempo em maior temperatura, bem como o ensaio conduzido totalmente à 34 °C, resultaram em menores concentrações celulares ao decorrer do ensaio.

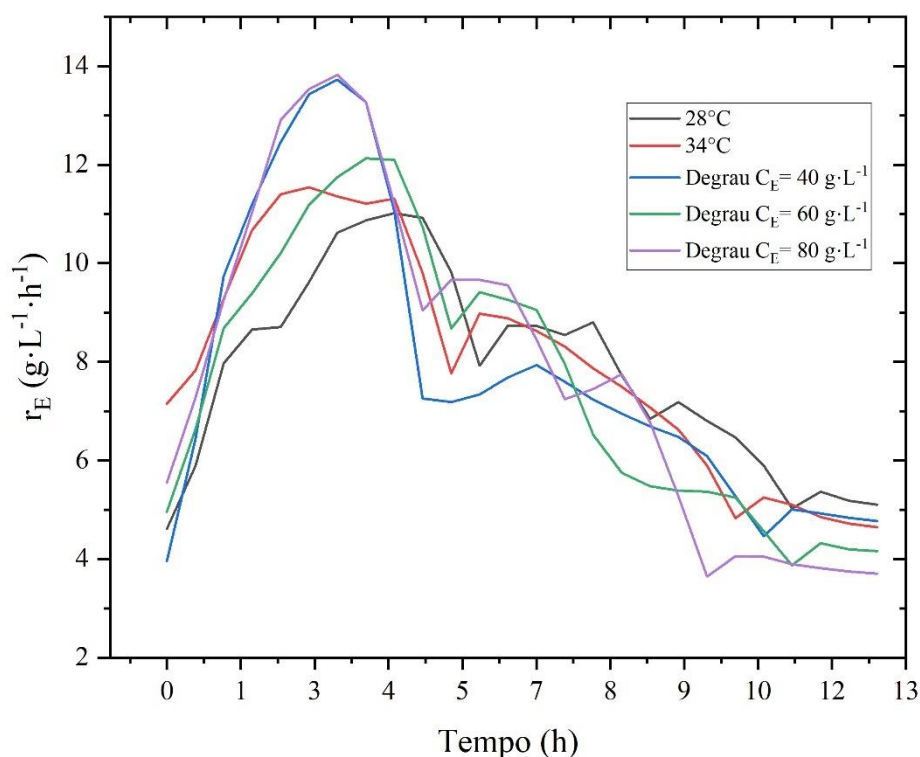
Visando cumprir os objetivos comparativos desse trabalho foi interessante avaliar a cinética das velocidades de produção de etanol. A Figura 9 apresenta as velocidades instantâneas de produção de etanol (r_E) nos diferentes ensaios.

Comparando primeiramente as fermentações em temperaturas constantes, observa-se que os valores de r_E foram maiores na fermentação a 34 °C no início dos ensaios, mas a partir de 4 h, os valores foram similares para as duas condições, e nas três últimas horas de fermentação esses valores foram superados pela fermentação a 28 °C. Tal comportamento se justifica pelo fato de que as velocidades do metabolismo da levedura são, normalmente, maiores em temperaturas maiores, mas são afetadas negativamente na medida em que o etanol se acumula no caldo fermentativo, devido à sua toxicidade. Em menores temperaturas, por outro lado, a levedura apresenta maior tolerância ao etanol, o que reflete

em uma menor queda das velocidades no metabolismo na medida em o que o etanol se acumula (Velooso *et al.*, 2019; Tosseto, 2002).

Com relação às fermentações com degraus, foi notório que a aplicação do degrau nas concentrações de 60 e 80 g·L⁻¹, resultou na redução da velocidade de formação de etanol para valores inferiores àqueles obtidos para as fermentações constantes nas últimas horas de processo, contrapondo a hipótese do presente trabalho. Por outro lado, quando o degrau foi aplicado na concentração de etanol de 40 g·L⁻¹, embora os valores de r_E tenham reduzido, ao final da fermentação os valores foram similares aos valores das fermentações em temperaturas constantes, indicando que esta foi a melhor condição de degrau.

Figura 7 – Velocidade instantânea de formação de etanol nos diferentes ensaios.

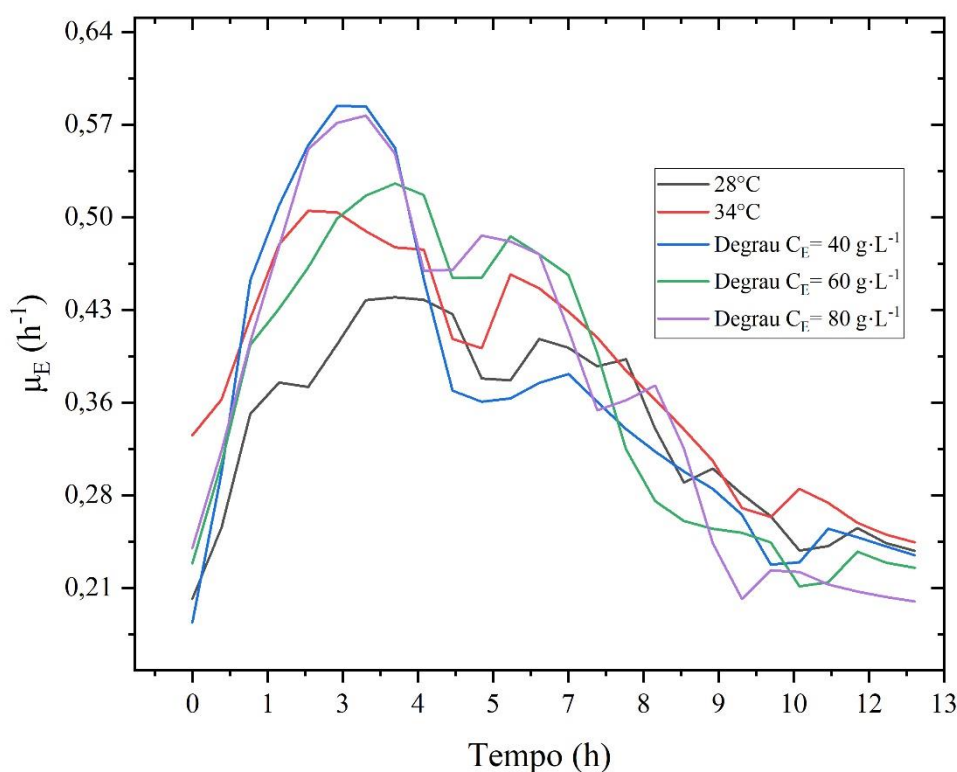


Fonte: Acervo pessoal da autora.

Tendo em vista que os valores de concentração da biomassa oscilaram em decorrência das características de temperatura em cada processo, foi importante avaliar a velocidade específica de produção de etanol (μ_E) para as respectivas concentrações de células.

A Figura 10 apresenta o comportamento de μ_E para cada ensaio. Como é possível observar, os resultados de μ_E vão ao encontro dos resultados de r_E , confirmando a queda de desempenho das fermentações com degrau em comparação às fermentações constantes, e o melhor desempenho da fermentação com degrau na concentração de etanol de $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ frente as outras condições de degrau (concentração de etanol de $60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $80 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).

Figura 8 – Velocidade específica de formação de etanol nos diferentes ensaios.



Fonte: Acervo pessoal da autora.

Portanto, diante dos resultados das velocidades, foi possível observar que não é compensatório a aplicação tardia de degraus de temperatura. O estresse gerado pela queda abrupta de temperatura e pela inibição pelo etanol pode ser mitigado quando o degrau é aplicado no início do processo de inibição. A condição em que o degrau foi aplicado com $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de etanol apresentou velocidades satisfatórias, principalmente na parte final do tempo de fermentação. Deve ser mencionado que as fermentações não foram conduzidas até o consumo completo de substrato e que o prolongamento do processo até o alcance desse consumo total proporcionaria resultados de desempenho mais claros para comparação dos

ensaios. Contudo, o comportamento das velocidades são um bom indício de que a estratégia de aplicação de degrau durante o processo fermentativo, se realizada no momento certo, pode ser promissora para fermentações VHG. Outros testes serão necessários em trabalhos futuros, utilizando, por exemplo, biorreatores e o modo de operação aplicado industrialmente, para consolidação da estratégia.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os experimentos propostos por esse trabalho possuíam o objetivo de avaliar o desempenho de fermentações VHG em diferentes condições de temperatura, tal proposta foi devidamente cumprida. A hipótese defendida é a de que a aplicação de degrau de temperatura na fermentação VHG, gera melhor desempenho se comparada à fermentação VHG em temperatura constante. Nas condições experimentais utilizadas no presente trabalho (modo de operação, tempo de processo e escala), embora os resultados obtidos não mostraram melhor produtividade em etanol com aplicação de degraus, foi possível verificar a partir da análise das velocidades de produção de etanol, que a melhor estratégia de aplicação de degrau é no início do processo de inibição pelo etanol. Os resultados aqui apresentados são promissores e contribuem para a melhoria de fermentações VHG, visando um menor consumo de água de resfriamento do processo e maiores velocidades de produção e produtividade em etanol.

REFERÊNCIAS

ALEXANDRE, H. Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 124, p. 17-22, 1994.

AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G. **Processo de produção de álcool – controle e monitoramento**. FERMENTEC, Piracicaba, 1996.

ANP - Agência Nacional Do Petróleo, Gás Natural E Biocombustíveis. **Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis**. Rio de Janeiro, 2023.

BASSO, L. C. Fisiologia e ecologia da fermentação alcoólica. Trabalho apresentado no I Workshop Tecnológico sobre Produção de Etanol, Piracicaba, 2004.

BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation. *Biofuel Production-Recent Developments and Prospects*, v. 1530, p. 85–100, 2011.

BASSO, L. C.; BASSO, T. P.; BASSO, T. O. Aspectos fisiológicos e bioquímicos da fermentação etanólica nas destilarias brasileiras. In: ALTERTHUM F.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; MORAES, I. O. **Biotecnologia industrial: fundamentos**. São Paulo: Editora Blucher, 2020. p. 243-279. *E-book*. ISBN 9788521218975. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788521218975/>. Acesso em: 10 set. 2024.

BASTOS, R. G. **Tecnologia das Fermentações: Fundamentos de Bioprocessos**. EdUFSCar, 2010.

BAYROCK, D. P.; INGLEDEW, W. **Application of multistage continuous fermentation for production of fuel alcohol by very-high-gravity fermentation technology**. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 27, n. 2, p. 87-93, 2001.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação Descontínua. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. In: *Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica*. v. 2. Editora Edgard Blucher. São Paulo, cap. 9, p. 193-204, 2001.

CHAPRA, Steven C.; CANALE, Raymond P. **Métodos numéricos para engenharia**. Porto Alegre: Grupo A, 2016. *E-book*. ISBN 9788580555691. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788580555691/>. Acesso em: 08 set. 2024.

CHUCK-HERNÁNDEZ, C.; PÉREZ-CARRILLO, E.; HEREDIA-OLEA, E.; SERNASALDÍVAR, S. O. **Sorgo como un cultivo multifacético para la producción de bioetanol en México: tecnologías, avances y áreas de oportunidad**. *Revista mexicana de ingeniería química*, v. 10, n. 3, p. 529-549, 2011.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar 2022/23**. Brasília – DF. 4 abril 2023.

CRUZ, M. L. Avaliação de condições operacionais na fermentação alcoólica VHG empregando diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. 2019. 119 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

CRUZ, M. L.; DE RESENDE, M. M.; RIBEIRO, E. J. **Improvement of ethanol production in fed-batch fermentation using a mixture of sugarcane juice and molasse under very high-gravity conditions**. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 44, n. 3, p. 617-625, 2021.

DIAS, M. O. S. *et al.* **Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil**. *Environmental Development*, v. 15, p. 35-51, 2015.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Visão 2030: O futuro da agricultura brasileira**. Brasília, DF, 2018.

ENERGY INSTITUTE. **Statistical Review of World Energy**, 2023.

GOMES, B. C. **Análise térmica da fermentação alcoólica convencional e extrativa com arraste por dióxido de carbono**. 87 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2020.

HAMBOR, John E. Bioreactor design and bioprocess controls for industrialized cell processing. **BioProcess Int**, v. 10, n. 6, p. 22-33, 2012.

LARROCHE, Christian *et al.* (Ed.). **Current developments in biotechnology and bioengineering: bioprocesses, bioreactors and controls**. Elsevier, 2016.

LIMA, Urgel de A. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Editora Blucher, 2019. *E-book*. ISBN 9788521214588. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788521214588/>. Acesso em: 10 set. 2024.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de Etanol. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial – Processos Fermentativos e Enzimáticos**. v. 3, cap. 1, p. 1-43, 2001.

LOPES, C. H.; BORGES, M. T. M. R. **Controle na fabricação de álcool**. São Carlos, SP, Ed. UFSCar, 95 p., 2009.

LORA, E. E. S.; VENTURI, O. J. **Biocombustíveis**. Rio de Janeiro: Interciência, v. 1, 2012.

MADEIRA, Ana *et al.* Effect of ethanol on fluxes of water and protons across the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research*, v. 10, n. 3, p. 252-258, 2010.

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

MESQUITA, T. J. B. **Estruturas de controle de biorreator baseadas em Fluxos metabólicos para fermentações microaeradas.** Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 169 p., 2021.

MILLER, G. L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** Analytical Chemistry Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

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

RIVERA, E. C.; YAMAKAWA, C. K.; SAAD, M. B. W.; *et al.* **Effect of temperature on sugarcane ethanol fermentation: Kinetic modeling and validation under very-high-gravity fermentation conditions.** Biochemical Engineering Journal, v. 119, p. 42–51, 2017.

RFA - Renewable Fuels Association. **Annual Ethanol Production. U.S. and World Ethanol Production.** Disponível em: <<https://ethanolrfa.org/markets-and-statistics/annual-ethanol-production>>. Acesso em 26 nov. 2023.

SCHMIDELL, W. *et al.* Biotecnologia industrial: Engenharia bioquímica. Blucher. v. 2, ed. 1. São Paulo, SP, 2001.

SCHMIDELL, Willibaldo. Biotecnologia Industrial - Vol. 2: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Editora Blucher, 2021.

SEEG - Sistema de Estimativas de Emissões e Remoções de Gases de Efeito Estufa. Disponível em: <<https://plataforma.seeg.eco.br/sectors/energia>>. Acesso em 01 nov. 2023.

SONEGO, J. L. S. *et al.* **Extractive batch fermentation with CO₂ stripping for ethanol production in a bubble column bioreactor: experimental and modeling.** Energy & Fuels, v. 28, n. 12, p. 7552-7559, 2014.

SONEGO, J. L. S. *et al.* **Extractive fed-batch ethanol fermentation with CO₂ stripping in a bubble column bioreactor: experiment and modeling.** Energy & Fuels, v. 30, n. 1, p. 748-757, 2016.

THATIPAMALA, R.; ROHANI, S.; HILL, G. A. **Effects of high product and substrate inhibitions on the kinetics and biomass and product yields during ethanol batch fermentation.** Biotechnology and bioengineering, v. 40, n. 2, p. 289-297, 1992.

TORIJA, M. J. *et al.* Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. International journal of food microbiology, v. 80, n. 1, p. 47-53, 2003.

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

VELOSO, I. I. K. *et al.* **Fed-batch ethanol fermentation at low temperature as a way to obtain highly concentrated alcoholic wines: Modeling and optimization.** Biochemical Engineering Journal, v. 141, p. 60-70, 2019.

VELOSO, I. I. K. **Modelagem e otimização da fermentação alcoólica em batelada alimentada a baixa temperatura.** 2019. 88 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2019.

VELOSO, I. I. K. *et al.* **Thermal Analysis of Conventional and Extractive Fed-Batch Ethanol Fermentation at Different Temperatures.** BioEnergy Research, p. 1-12, 2023.