

UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA - UFOB  
CENTRO MULTIDISCIPLINAR DO CAMPUS DE LUÍS EDUARDO MAGALHÃES  
ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA

GUSTAVO FRANCINI MAZETTO

**MODELAGEM E SIMULAÇÃO DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO COM ALTA  
CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCAR EM BATELADA ALIMENTADA**

LUÍS EDUARDO MAGALHÃES - BA

2019

GUSTAVO FRANCINI MAZETTO

MODELAGEM E SIMULAÇÃO DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO COM ALTA  
CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCAR EM BATELADA ALIMENTADA

Trabalho apresentado à Universidade Federal do Oeste da Bahia como requisito de avaliação da disciplina TCC II, sob orientação do Professor Dr. Pedro Dias Pinto e coorientação do Professor Dr. Jorge Silveira Sonogo.

LUÍS EDUARDO MAGALHÃES - BA

2019

## FICHA CATALOGRÁFICA

---

M476 Mazetto, Gustavo Francini.

Modelagem e simulação do processo de fermentação com alta concentração de açúcar em-batelada alimentada / Gustavo Francini Mazetto. – 2019.

45 f.; il.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Dias Pinto.

Trabalho de Conclusão de Curso: (Graduação em Engenharia de Biotecnologia) – Universidade Federal do Oeste da Bahia. Centro Multidisciplinar do Campus de Luís Eduardo Magalhães, Luís Eduardo Magalhães, BA, 2019.

1. Energia renovável – Biocombustíveis - Etanol. 2. Fermentação - Processos. 3. Métodos de Simulação.

I. Pinto, Pedro Dias. II. Universidade Federal do Oeste da Bahia – Centro Multidisciplinar do Campus 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 do *Campus* de Luís Eduardo Magalhães - CMCLEM  
Colegiado do Curso de Engenharia de Biotecnologia - CEB

**Ata da Defesa de Trabalho de Conclusão de Curso do Colegiado do Curso de  
Engenharia de Biotecnologia**

1      **Aos vinte e quatro dias do mês de julho de 2019 (dois mil e dezenove)**, as 09h00min  
2      (nove horas), na sala 03 da sede da Universidade Federal do Oeste da Bahia, UFOB,  
3      localizada na rua Itabuna esquina com a rua Juazeiro, quadra 97B, nº 1278, Santa Cruz, Luís  
4      Eduardo Magalhães-BA, reuniu-se a banca examinadora de defesa de Trabalho de  
5      Conclusão de Curso II de 2019.1, sob a presidência do professor orientador, professor **Pedro**  
6      **Dias Pinto**, com o professor **Bruno Motta Oliveira**, 2º Membro Docente, e o professor  
7      **Samuel Mazzinghy Alvarenga**, 3º Membro Docente, para avaliar o trabalho de conclusão  
8      de curso (TCC) intitulado **MODELAGEM E SIMULAÇÃO DO PROCESSO DE**  
9      **FERMENTAÇÃO COM ALTA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCAR EM BATELADA**  
10     **ALIMENTADA**, apresentado por **Gustavo Francini Mazetto** como requisito para obtenção  
11     do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia. Após análise do trabalho, da  
12     apresentação e da arguição, a banca atribuiu média igual a 3,7 e, assim, considerou o  
13     trabalho aprovado. E nada mais havendo às 10:52, eu, Felipe da Silva,  
14     coordenador de TCC do curso de Engenharia de Biotecnologia, lavrei a presente ata que  
15     depois de lida será assinada por quem de direito.

**Dr. Pedro Dias Pinto – UFOB/LEM**

**Dr. Bruno Motta Oliveira – UFOB/LEM**

**Dr. Samuel Mazzinghy Alvarenga – UFOB/LEM**

**Gustavo Francini Mazetto**

*Dedico este trabalho aos meus queridos pais,  
Maria Eliane Francini Mazetto e João Carlos  
Mazetto.*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, pelo contínuo incentivo aos estudos, por todos os ensinamentos, pela sabedoria e pelo grandioso exemplo. À minha irmã, pelas conversas, pelo companheirismo, risadas e brigas. A todo o restante da família que, de alguma forma, contribuíram na minha formação.

Ao professor Jorge Silveira Sonogo, que prontamente acatou o pedido de desenvolver este projeto. Obrigado pelos conhecimentos fornecidos e pelo engajamento que, mesmo à distância, continuou auxiliando na construção deste trabalho.

Ao professor Pedro Dias Pinto, que aceitou participar deste projeto com ele já em andamento, e, mesmo assim, contribuiu com excelentes ideais e discussões que enriqueceram o trabalho. Agradeço também pelos três anos de iniciação científica, por todos os ensinamentos compartilhados, pela paciência, pela excelência das aulas e pelas boas conversas que abrangiam temas que iam desde filosofia estóica a investimentos imobiliários.

Aos professores Bruno Motta Oliveira e Samuel Mazzinghy Alvarenga, pelo excelente trabalho realizado à frente da banca de avaliação. Agradeço às valiosas correções e sugestões feitas que, sem dúvida, contribuíram fortemente para o aumento da qualidade do texto final.

Aos demais professores do CMCLEM, em especial aos professores Raphael, Felipe, Climério e Alex, sinônimos de competência e dedicação no cotidiano acadêmico.

Aos amigos Benedito e Bruno Mito, figuras máximas dos ensinamentos sociais e amorosos. A todos os outros amigos que estiveram comigo nestes cinco anos de graduação.

À Universidade Federal do Oeste da Bahia, por ter me dado a oportunidade de vivenciar tudo isso.

Obrigado!

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>11</b>
2.1 Objetivo geral .....	11
2.2 Objetivos específicos .....	11
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>12</b>
3.1 Produção de Etanol no Brasil.....	12
3.2 Formas de condução dos processos fermentativos .....	13
3.2.1 Processo em Batelada .....	13
3.2.2 Processo em batelada alimentada ( <i>Fed-batch</i> ) .....	14
3.2.3 Processo contínuo .....	15
3.3 Processo fermentativo industrial.....	16
3.4 Bioquímica da fermentação alcoólica .....	17
3.5 Fatores que afetam a fermentação alcoólica.....	18
3.5.1 Etanol.....	18
3.5.2 Temperatura.....	19
3.5.3 Substrato .....	19
3.5.4 pH .....	20
3.5.5 Contaminação bacteriana.....	20
3.6 Fermentação com alta concentração de açúcar (ACA).....	20
3.7 Modelagem matemática da fermentação em batelada alimentada .....	22
3.7.1 Modelos cinéticos .....	22
3.7.2 Balanço de massa para fermentação batelada alimentada .....	24
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>26</b>
4.1 Simulações computacionais.....	26
4.2 Procedimento das simulações .....	27
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>29</b>
5.1 Efeito do tempo de enchimento da dorna no processo fermentativo .....	29
5.2 Efeito da concentração de açúcar no mosto no processo fermentativo .....	30
5.3 Análise dos processos simulados em escalas de tempos definidas.....	33
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>37</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>38</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>43</b>

## RESUMO

Nos últimos anos, a consolidação do etanol no cenário energético mundial tem feito com que a indústria deste biocombustível busque tecnologias capazes de solucionar os principais gargalos apresentados pelas técnicas convencionais de fermentação alcoólica. Os principais fatores a serem contornados são a grande quantidade de energia requerida no processo, a baixa produtividade em etanol e o alto volume de água consumida durante as operações. De maneira geral, os processos fermentativos tradicionais geram estes problemas porque utilizam baixas concentrações de açúcar no mosto, já que os efeitos de inibição por substrato e etanol sentidos pela levedura impedem que sejam utilizadas concentrações maiores de açúcar. Uma vez que as concentrações de açúcar no mosto são baixas, o processo resultará em concentrações baixas de etanol, com grande volume de água no fermentador, sendo necessário despender grande quantidade de energia na etapa de destilação. Neste contexto, a fermentação com alta concentração de açúcar (ACA) surge como uma técnica capaz de aumentar a concentração de substrato no mosto, esperando, com isso, aumentar a concentração final de etanol. Para isso, a técnica consiste em suplementar o meio de fermentação com compostos à base de nitrogênio e fósforo com o objetivo de tornar a célula de levedura mais resistente às ações inibitórias exercidas pelo substrato e pelo etanol. Uma maneira de analisar os ganhos oferecidos pela técnica é através da utilização integrada de modelos matemáticos e da simulação computacional que, juntos, são capazes de prever o comportamento da fermentação sob vários parâmetros e condições diferentes. Com a utilização destas duas ferramentas, o processo de fermentação alcoólica em batelada alimentada foi analisado para diferentes concentrações de açúcar no mosto, sendo possível analisar a influência desta condição nos demais parâmetros do processo. Os resultados mostraram que, como era de se esperar, a fermentação ACA foi bem sucedida em garantir concentrações maiores de etanol quando comparadas a situações que simulavam as condições tradicionais de fermentação. Porém, para concentrações muito altas de substrato no mosto, o alto tempo de fermentação pode representar um fator limitante para fins industriais.

**Palavras-chave:** Fermentação com alta concentração de açúcar (ACA); Modelagem matemática; Simulação computacional.

## ABSTRACT

In recent years, the ethanol consolidation in the world energy scenario has been making the industry of this biofuel use tools to solve the main bottlenecks presented by the techniques used for alcoholic fermentation. The main factors to be circumvented are the large amount of energy required in the process, a low rate of ethanol produced and the high volume of water consumed during operations. In general, traditional fermentation processes generate these problems because they use low concentrations of sugar in substrate because the inhibitory effects by substrate and ethanol felt by the yeast prevents the use of higher concentrations. Since concentrations of sugar are low, the process results in low concentrations of ethanol with large volume of water in the bioreactor, requiring a large amount of energy to be expended in the distillation step. In this context, the very-high-gravity fermentation (VHG) emerges as a technique capable of increasing substrate concentration, expecting to increase the final concentration of ethanol. For this, the technique consists of supplementing the fermentation medium with nitrogen and phosphorus based compounds in order to make the yeast cell more resistant to the inhibitory actions exerted by the substrate and ethanol. One way to analyze the benefits offered by the technique is to use mathematical models and computational simulation that are able to predict the fermentation behavior at several different levels and conditions. Using these two tools, the process of alcoholic fermentation in fed-batch was analyzed for different concentrations of sugar in substrate, and it was possible to analyze the influence of this condition on the other parameters that describe the process. The results have shown that VHG fermentation was able of ensuring higher ethanol concentrations when compared to situations that simulated the traditional fermentation conditions. However, the time of fermentation presented for the high sugar concentrations can be a limiting factor for industrial purposes.

**Keywords:** Very-high-gravity fermentation (VHG); Mathematical modeling; Computational simulation.

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a diversificação da matriz energética tem sido tema presente nas discussões econômicas e ambientais dos mais variados países ao redor do mundo, dos emergentes aos desenvolvidos. Atualmente, o cenário mundial depende vigorosamente dos combustíveis fósseis para produção de energia, sendo que o carvão, petróleo e gás geram 80% de toda energia produzida (NEWELL et al., 2015).

Além dos conhecidos problemas ambientais gerados pelas emissões de gases poluentes na atmosfera pela queima dos combustíveis fósseis, essa matriz energética está sujeita a variações bruscas de preço em decorrência do aumento da demanda causada pela ascensão industrial de países como China e Índia (UNICA, 2012). Neste contexto, o etanol desponta como um biocombustível que permite fornecer uma alternativa aos combustíveis fósseis e, ao mesmo tempo, satisfazer aos anseios econômicos e ambientais apresentados.

Na safra 2016/2017, a produção de etanol brasileira chegou a 27,80 bilhões de litros (CONAB, 2017). De acordo com o relatório do Plano Decenal de Expansão de Energia (PDE, 2014), o mercado nacional de etanol deverá continuar a crescer nos próximos 10 anos, em decorrência do aumento expressivo da frota de veículos *flex-fuel* esperada para o período. Dessa forma, como a demanda por etanol continuará a crescer nas próximas décadas, evidencia-se a importância de métodos capazes de aumentar a eficiência dos processos industriais de produção do biocombustível.

No Brasil, a produção industrial de etanol ocorre principalmente por via fermentativa através do emprego de leveduras do gênero *Saccharomyces*, que utilizam açúcares como glicose e frutose para realização da glicólise e na sequência a fermentação, obtendo etanol no final do processo. O principal fator limitante da produção do combustível através dos métodos atuais é a baixa tolerância dos microrganismos fermentadores a teores elevados de açúcar no mosto. Além disso, o processo fermentativo também é limitado pelos efeitos de inibição, que podem ocorrer por ação do substrato ou do etanol.

Altas concentrações de açúcar provocam aumento da pressão osmótica e contribuem para a desidratação das células das leveduras, tornando-as incapazes de realizar o processo fermentativo (MAGER et al., 2002). Este fato contribui para o

aumento da quantidade de água envolvida no processo, resultando em um vinho com baixa concentração de etanol fazendo com que seja necessária grande quantidade de vapor na etapa de destilação, além de favorecer a geração de grande volume de vinhaça. Para que estes problemas sejam atenuados, é necessário que se desenvolvam técnicas capazes de produzir um vinho com alta concentração de etanol, de modo que as demandas energéticas e ambientais sejam melhores atendidas.

Para isso, uma técnica de fermentação com alta concentração de açúcar no mosto (ACA) vem sendo estudada visando a obtenção de vinhos com alta concentração de etanol e, conseqüentemente, diminuição dos custos globais do processo e aumento da produtividade em etanol (PULIGUNDLA et al., 2001). A principal diferença de operação da fermentação ACA para a convencional é a concentração de açúcar no mosto, já que a técnica nova permite que a fermentação ocorra com elevadas concentrações de sólidos solúveis no mosto (maiores que  $250\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), enquanto a fermentação seguindo o procedimento tradicional é conduzida com concentrações que não ultrapassam  $200\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (RIVERA et al., 2017).

Sendo assim, essa técnica permite que a resistência celular aos efeitos de inibição seja aumentada e que a quantidade de água necessária para diluição do mosto seja reduzida, possibilitando uma economia de vapor na etapa de destilação e aumento na eficiência do processo de produção de etanol. Além dessas vantagens, essa técnica também barateia os processos de tratamento de efluentes pois será gerado um menor volume de vinhaça, resíduo malcheiroso que quando jogado nos rios representa uma grave fonte de poluição.

De modo geral, os processos fermentativos podem ser descritos através de parâmetros que conferem as peculiaridades de cada tipo de procedimento. Para avaliar a diferença do comportamento destes parâmetros no processo tradicional e na fermentação com alta concentração de açúcar, a modelagem matemática seguida das simulações computacionais representam uma metodologia capaz de fornecer as características fenomenológicas de cada uma das técnicas e, a partir disso, desenvolver ferramentas de otimização e controle do processo fermentativo. Estas simulações representam uma diminuição no custo do desenvolvimento do processo de fermentação alcoólica uma vez que minimiza as práticas experimentais pelo uso da modelagem matemática (WANG, 2000 e RIVERA et al., 2006).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Investigar a aplicação da técnica de fermentação com alta concentração de açúcar para um regime em batelada alimentada, analisando o processo fermentativo por meio de equações que modelam o problema e simulações computacionais.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Simular a fermentação alcoólica para diferentes concentrações de açúcar no mosto.
- Testar a influência do tempo de enchimento da dorna nos resultados do processo fermentativo;
- Medir o ganho teórico proporcionado pela fermentação ACA em comparação com a técnica convencional.
- Analisar os processos fermentativos após intervalos de tempos fixos para cada uma das condições simuladas.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Produção de Etanol no Brasil

Até a década de 70, a matriz energética do Brasil concentrava-se exclusivamente no petróleo. Entretanto, com a crise petrolífera de 1973, o governo brasileiro desenvolveu o projeto Pró-Álcool (OLIVEIRA, 1991), que tinha como objetivo expandir a produção de etanol no país e, com isso, aumentar a renda interna através do aproveitamento da matéria-prima nacional (AMORIM et al., 2011).

Desde então, o país vem aprimorando e desenvolvendo tecnologias em todas as vertentes da indústria sucroalcooleira, permitindo produzir o etanol sob custos baixos quando comparado aos valores praticados nos outros países (GOLDEMBERG e MACEDO, 1994). Com o sucesso do programa Pró-Álcool, o Brasil se consolidou como um país de suma importância no fornecimento do biocombustível no cenário mundial, sendo o maior exportador de etanol do mundo (BASSO et al., 2011). Além disso, o país apresenta a segunda maior produção do combustível em escala global, sendo responsável, junto aos Estados Unidos, por mais de 80% de toda produção mundial de etanol (UNICA, 2012).

No Brasil, a principal fonte utilizada para produção do biocombustível é a cana-de-açúcar, uma vez que o país ostenta o título de maior produtor mundial desta biomassa. Além da grande disponibilidade da matéria-prima, a cana se destaca pela alta oferta de carbono e elevada concentração de açúcar. Há também vantagens no rendimento da produção, já que a cana possui a maior produtividade por área colhida, quando comparada a outras matérias primas (ATALA, 2004). De acordo com levantamento realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento – Conab (2017), a produção de cana-de-açúcar na safra 2016/2017 foi estimada em 657,18 milhões de toneladas, acarretando na geração de 38,69 milhões de toneladas de açúcar e 27,80 bilhões de litros de etanol. Desse volume total de etanol produzido, 11,07 bilhões de litros foram destinados para a produção de etanol anidro, utilizado na mistura com a gasolina, e 16,73 bilhões de litros para a produção de etanol hidratado, combustível utilizado nos veículos *flex-fuel*.

A maior parte das indústrias sucroalcooleiras brasileiras utiliza o processo integrado de produção de açúcar e etanol. Aproximadamente 70% de todas as instalações industriais do setor são constituídas por plantas produtoras de açúcar com destilarias anexas, e apenas 30% das destilarias funcionam de maneira

autônoma. Além da produção de açúcar e etanol, as usinas brasileiras passaram também a produzir energia elétrica dentro das plantas industriais (HENDLER, 2011).

## **3.2 Formas de condução dos processos fermentativos**

Os processos fermentativos podem acontecer em diferentes regimes, que se diferenciam entre si através da forma com que o substrato é adicionado e o produto é retirado do fermentador. Dentre as formas de operação dos processos fermentativos, tem-se a batelada, batelada alimentada e operação contínua (FERREIRA, 2005).

### **3.2.1 Processo em Batelada**

O processo em batelada acontece sem que haja entrada ou saída de massa do fermentador. Dessa forma, o volume reacional permanece constante durante todo o processo. Este processo pode ser operado através do sistema de cortes, que consiste em realizar uma primeira fermentação e dividir o volume do caldo em duas dornas, completando-as com mosto e deixando fermentar até o final; ou pelo sistema de cultura pura (pé-de-cuba), em que cada fermentação utiliza uma nova cultura pura de leveduras, que é adicionada ao mosto até ocupar todo o volume útil do reator (TOSETTO, 2002).

Ao final de cada batelada o reator deve ser limpo, e realimentado com mosto e inóculo para se dar início a um novo processo de fermentação, fazendo com que o processo em batelada se torne lento e com grandes períodos de inatividade. (MAIORELLA et al., 1981).

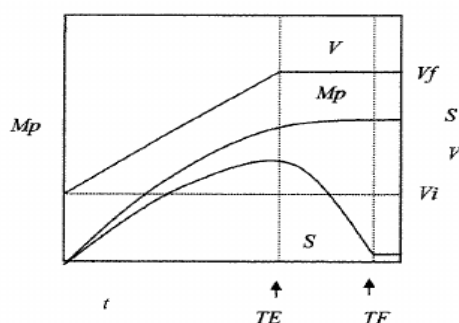
Além disso, uma vez que toda a massa de substrato é adicionada de uma só vez, no início da fermentação, a alta carga de açúcar exercida sobre o microrganismo promove efeitos de inibição ou desvia o metabolismo celular a produtos secundários que não são de interesse, fazendo com que o regime em batelada apresente baixos valores de rendimentos e produtividade (CARVALHO et al., 2001). Desse modo, as várias desvantagens do processo em batelada estimulam o surgimento de outras formas de conduzir o processo fermentativo para produção de etanol (SCHMIDELL et al., 2001).

### 3.2.2 Processo em batelada alimentada (*Fed-batch*)

O processo em batelada alimentada é empregado desde 1900 sendo inicialmente utilizado para regulação do crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* (CARVALHO et al., 2001). Este processo acontece com o fornecimento gradual de um ou mais nutrientes ao fermentador, sem a retirada de produtos até o final da operação. Uma das maiores aplicações deste processo é o controle dos efeitos inibitórios causados pelo excesso de substrato através do controle da vazão de alimentação (SCHMIDELL, 2001).

Essa vazão de alimentação pode ser constante ou variar com o tempo assim como a adição de substrato pode ser contínua ou intermitente. A escolha do perfil é feita de modo que o metabolismo da levedura se desloque para a via de interesse, onde ocorrerá a maior formação de produto. Independente do perfil escolhido, a vazão de alimentação deve ser projetada para que, ao final do processo, o volume útil do fermentador seja completado (CARVALHO e SATO, 2001).

No Brasil, a maior parte das destilarias utiliza um aperfeiçoamento do processo em batelada alimentada, chamado de fermentação Melle-Boinot (LOPES, 1989). Essa inovação se baseia na alimentação contínua e crescente do substrato ao biorreator e no reciclo de células. Após a fermentação, o vinho passa por um processo de centrifugação para separação da massa celular. Depois de serem separadas do vinho, as células são submetidas a um tratamento ácido adequado, visando a redução das contaminações bacterianas, e destinadas para a dorna como inóculo de uma nova fermentação (ALMEIDA, 1960). A **Figura 3.1** mostra os perfis típicos de substrato, do produto e do volume em uma fermentação em batelada alimentada.



**Figura 3.1** – Perfis de substrato, produto e volume de um processo em batelada alimentada. V: volume do meio; S: concentração de substrato; Mp: massa de produto; TE: tempo de enchimento do fermentador; TF: tempo de fermentação. (Fonte: adaptado de Schmidell, 2001)

Segundo Tosetto (2002), o processo de fermentação em batelada alimentada apresenta as seguintes vantagens:

- economia de açúcar devido a menor reprodução celular;
- aumento do rendimento em etanol;
- eliminação de contaminantes pela separação da massa celular;
- fermentação mais pura devido ao tratamento ácido;
- eliminação do emprego de cultura pura no preparo do pé-de-cuba.

### **3.2.3 Processo contínuo**

Este tipo de processo é caracterizado por possuir uma vazão de alimentação constante de mosto, e uma vazão de retirada de meio igual à vazão de alimentação. Dessa forma, mesmo com fluxos contínuos de entrada e saída, o processo ocorre em regime estacionário, em que a massa no interior do fermentador sempre será a mesma, mantendo-se também as demais variáveis que descrevem o sistema, como concentração de células, de substrato limitante e de etanol (SCHMIDELL, 2001).

A produção contínua pode acontecer com tanques ligados em série ou com o emprego de fermentadores individuais, sendo possível operar com ou sem recirculação de células. Em todos estes casos, o sistema de produção tem a capacidade de manter o processo ativo por longos períodos de tempo. Sendo assim, esse tipo de operação pode ser considerado como uma alternativa industrial viável em relação ao processo em batelada alimentada (CARVALHO, 2006).

No regime contínuo não há o fim de um ciclo para o começo de uma nova etapa. Dessa forma, é necessário que haja maior controle sobre os fatores operacionais que descrevem o sistema de fermentação, como pH, temperatura, concentração de substrato, células e produtos (ATALA et al., 2004). Além disso, o processo contínuo fica mais exposto a contaminações bacterianas já que o sistema passará trabalhará sem interrupções por um longo período (CYSEWSKI e WILKIE, 1978).

Para Schmidell (2001), as principais vantagens do modo de operação contínuo são:

- redução de tempos inativos, acarretando o aumento da produtividade;
- obtenção de um meio fermentado mais uniforme;

- maior facilidade no processo de recuperação do produto;
- redução da mão-de-obra;
- maior facilidade na utilização dos controladores das variáveis do processo.

### 3.3 Processo fermentativo industrial

Para produzir etanol, as destilarias brasileiras utilizam mosto preparado pela mistura do caldo de cana-de-açúcar ou água e melaço, de modo que a concentração de açúcares fermentescíveis fique em torno de 20° Brix. (aproximadamente 180  $g.L^{-1}$  de sacarose). O melaço é o principal subproduto da indústria do açúcar, sendo produzido na proporção de 40 a 60 quilos a cada tonelada de cana processada. Além de aminoácidos, vitaminas e minerais, o melaço é majoritariamente constituído por carboidratos fermentescíveis, com 45-60% de sacarose, 5-20% de glicose e frutose. (BASSO et al., 2011).

Em cerca de 85% das destilarias, o processo fermentativo ocorre em batelada alimentada, sendo que apenas os 15% restantes operam em regime contínuo. A fermentação acontece em biorreatores de grande volume com reciclo de leveduras, resultando em uma alta concentração de células na dorna (10-15% m/v) (GODOY et al., 2008). O processo de fermentação ocorre em diferentes fermentadores simultaneamente, dura de 6 a 12 horas, e acontece com temperaturas na faixa de 32 – 35°C. A concentração final de etanol no caldo de fermentação é de cerca de 11°GL (% v/v), o que representa um rendimento médio de 90-92% em comparação com o máximo previsto teoricamente (WHEALS et al., 1999; AMORIM et al., 2011).

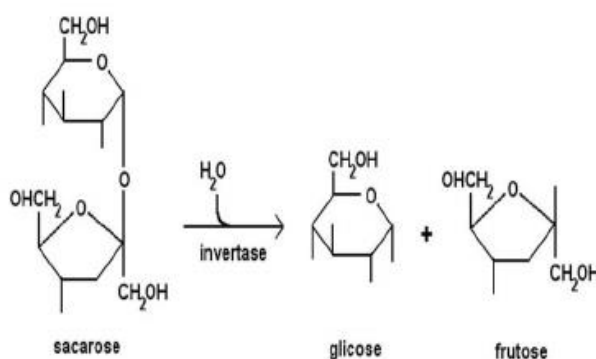
O vinho obtido ao final da fermentação apresenta baixo teor em etanol, contribuindo para a geração de grandes volumes de vinhaça (cerca de 12 a 15 litros para cada litro de etanol) (AMORIM et al., 2011). A vinhaça é o principal resíduo gerado nas destilarias, apresenta elevada demanda de oxigênio (variando de 20.000 a 35.000  $m g.L^{-1}$ ), grande quantidade de matéria orgânica, e altas temperaturas na saída dos destiladores (85 a 90°C). Estas características fazem com que a vinhaça represente um grande vetor de poluição quando descartada sem tratamento na água.

Além do problema ambiental causado pela alta produção de vinhaça, os baixos teores de etanol no vinho geram problemas econômicos uma vez que encarecem o processo de destilação. Atualmente, estima-se que 30% dos custos do

processo de produção do etanol estão situados na etapa de destilação (PULIGUNDLA et al., 2011).

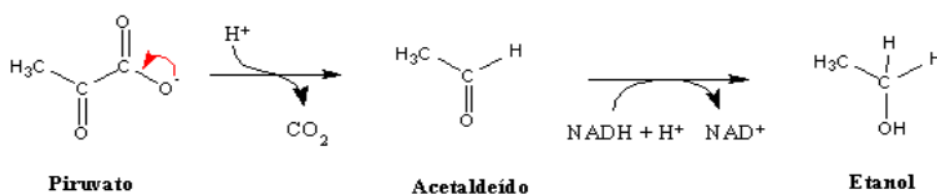
### 3.4 Bioquímica da fermentação alcoólica

O processo fermentativo é realizado principalmente pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* que, em condições anaeróbicas, utiliza monossacarídeos como a glicose e a frutose para realização do processo de glicólise. A obtenção destes açúcares simples se dá pela hidrólise da sacarose presente no caldo de cana-de-açúcar através da enzima invertase expressada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (LOPES e BORGES, 2010), como mostrado na reação da **Figura 3.2**.



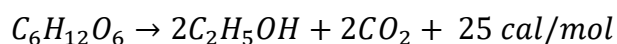
**Figura 3.2** - Reação de hidrólise da sacarose por ação da invertase. (Fonte: TORRES et al., 1999)

Depois que os açúcares simples estão disponíveis no meio, a levedura converte estes açúcares, através da glicólise, em energia celular (ATP) produzindo ácido pirúvico (MADIGAN et al., 2016). A partir do piruvato produzido, o processo continua através de duas etapas **Figura 3.3**. Na primeira delas, o piruvato sofre descarboxilação em uma reação irreversível catalisada pela enzima piruvato descarboxilase, produzindo acetaldeído. A última etapa se dá pela ação da enzima álcool desidrogenase, em que o acetaldeído é reduzido pela NADH a etanol.



**Figura 3.3** – Reações químicas da fermentação alcoólica. (Fonte: VOET et al., 2000)

e maneira geral, desprezando as reações intermediárias, a reação global da fermentação pode ser resumida na conversão de hexoses em etanol e gás carbônico, como mostrado na reação abaixo.



Pela estequiometria da reação acima, o rendimento teórico do processo fermentativo é de 0,511 kg de etanol por kg de hexose consumida e de 0,489 kg de dióxido de carbono por kg de hexose. Na prática, entretanto, os valores observados são menores que os teóricos uma vez que parte da hexose é destinada ao crescimento celular e produção de outros compostos necessários à manutenção da levedura, como glicerol e alcoóis superiores. Dessa forma, uma maneira de se verificar a eficiência do processo industrial é através da comparação do rendimento observado no processo com o valor teórico obtido da reação.

### **3.5 Fatores que afetam a fermentação alcoólica**

Durante o processo fermentativo, alguns fatores podem influenciar no funcionamento das leveduras e prejudicar a produção de etanol. Dentre os principais parâmetros envolvidos estão a concentração de etanol, temperatura, concentração de substrato, pH e contaminação bacteriana.

#### **3.5.1 Etanol**

O etanol produzido durante o processo fermentativo representa o principal componente tóxico à levedura (MAIORELLA et al., 1983). O etanol se instala na parte hidrofóbica da bicamada fosfolipídica onde ocorre as interações entre ácidos graxos insaturados e proteínas. Dessa forma, o etanol suprime estas interações e causa um decréscimo na fluidez da membrana (BANAT et al., 1998). Com isso, é de se esperar que ocorra uma inibição na taxa máxima de absorção de glicose em decorrência das mudanças do ambiente lipídico da membrana plasmática (LEÃO e VAN UDEN, 1982).

Os efeitos de inibição se intensificam à medida que a concentração de etanol aumenta. Em concentrações acima de  $40 \text{ g.L}^{-1}$ , o etanol afeta o crescimento

celular diminuindo, conseqüentemente, a velocidade de produção de etanol (AIBA et al., 1968). Em concentrações maiores que  $63 \text{ g.L}^{-1}$  os efeitos se propagam à organelas (LLOYD et al., 1993; LY et al., 2002) e, para concentrações em torno de  $95 \text{ g.L}^{-1}$  o crescimento celular é totalmente inibido (MAIORELLA et al., 1984).

### 3.5.2 Temperatura

As leveduras são microrganismos mesófilos e, em geral, possuem faixa de atuação entre ótima entre 32-35 °C (WHEALS et al., 1999). Valores superiores podem ser desfavoráveis à fisiologia da célula, resultando em condições propícias ao aparecimento de microrganismos contaminantes e, ao mesmo tempo, torna-se mais suscetível aos efeitos inibitórios gerados pelo etanol (PARAZZI et al., 2008). Por outro lado, temperaturas inferiores àquelas presentes na faixa ótima de atuação fazem com que a atividade da levedura diminua implicando em menores taxas de conversão (CARDOSO, 2006).

### 3.5.3 Substrato

A concentração de substrato também representa um fator de extrema importância na condução do processo fermentativo. Quando a célula é exposta a altas concentrações de substrato, a primeira consequência observada é a perda de água pela sua migração do interior para o exterior da célula, fazendo com que a membrana plasmática sofra um turgor (MAGER et al., 2002). O estresse causado pelas altas concentrações de açúcar age de maneira sinérgica com os efeitos inibitórios gerados pelo etanol, aumentando seu poder tóxico, diminuindo a viabilidade celular e, como resultado, a célula interrompe o seu crescimento. (GRAVES et al., 2007; NGANG et al., 1989).

Os efeitos inibitórios são observados em concentrações maiores que  $150 \text{ g.L}^{-1}$ . Acerca disso, o emprego do regime em batelada alimentada possibilita atenuar este problema já que, na fermentação industrial, a concentração máxima do substrato no reator não excede  $70 \text{ g.L}^{-1}$  (BASSO et al., 2011).

### **3.5.4 pH**

De modo geral, as leveduras possuem mecanismos capazes de controlar as variações de pH no meio intracelular. Entretanto, as variações do pH são capazes de promover alterações na estrutura da membrana celular e afetam o funcionamento das enzimas extracitoplasmáticas, como a invertase, que realiza a hidrólise da sacarose. Dessa maneira, o ajuste dessa variável a valores específicos está diretamente ligado ao rendimento do processo (ABRAHÃO-NETO et al., 1997).

O pH considerado ótimo para o processo fermentativo é de 4,0, onde se observa maior produção da enzima hexoquinase, que desempenha papel importante na glicólise, e maior atividade da invertase, diretamente afetada pela variação no pH extracelular (ABRAHÃO-NETO et al., 1997).

### **3.5.5 Contaminação bacteriana**

A contaminação bacteriana representa um fator decisivo nas taxas de aproveitamento do processo de fermentação. Perturbações na temperatura, acidez e concentração de açúcares, bem como a qualidade da cana e preparação do inóculo e do mosto impróprias podem contribuir para o desenvolvimento de outros microrganismos no fermentador. Esses microrganismos contaminantes irão competir com as leveduras pelo mesmo substrato e, além de reduzir a quantidade de açúcares disponíveis para a fermentação, irão produzir inibidores do crescimento da levedura, diminuindo o rendimento do processo. As principais contaminantes da fermentação são as bactérias lácticas. Estas bactérias produzem ácido lático e acético que tornam o meio estressante para as leveduras, fazendo com que elas produzam menos etanol e mais biomassa (DARÉ, 2008).

### **3.6 Fermentação com alta concentração de açúcar (ACA)**

A técnica de fermentação com alta concentração de açúcar e, por consequência, alta concentração de etanol, é uma tecnologia capaz de potencializar a produtividade, rendimento e capacidade das destilarias sem que haja necessidade de grandes investimentos ou mudanças processuais (BASSO et al., 2008). Os processos industriais com alta concentração de açúcar apresentam importantes vantagens relacionadas ao setor energético, econômico e ambiental.

A fermentação ACA baseia-se no aumento da concentração de substrato no mosto de cana dos atuais 18 a 25% para 30 ou 35%, esperando aumentar a concentração final de etanol que gira em torno de 11% (BASSO et al., 2008; BASSO e PAULILLO, 2003; PIDDOCKE et al., 2009; SOUZA-DIAS et al., 2015). Com o aumento da concentração de etanol e, por consequência, redução de água do vinho fermentado, foi relatado uma diminuição de 4% de energia no processo de destilação quando as concentrações finais de etanol aumentaram de 12% para 18%, em condições de fermentação com alta concentração de açúcar (BELCHER et al., 2005).

O aumento da concentração de etanol, proporcionado pela técnica, provoca um efeito repressor sobre bactérias contaminantes e, com isso, reduz a necessidade de utilização de antibióticos e ácidos empregados no tratamento da massa celular que será reaproveitada (THOMAS et al., 1996).

Para que seja possível o aumento da concentração de substrato no mosto, a técnica funciona com suplementação de compostos à base de nitrogênio e fósforo com o objetivo de tornar a célula da levedura mais resistente às ações inibitórias exercidas pela alta concentração de substrato e etanol. O nitrogênio é um elemento essencial para multiplicação celular, uma vez que é um constituinte de vários compostos determinantes para o funcionamento celular, como proteínas, purinas e piridinas (SHI et al., 2011).

A adição de nitrogênio extracelular é importante para que ocorra uma contínua produção de novas células e para que as leveduras possam obter este elemento dos aminoácidos, sais de amônio, amidas e nitrato. A forma com que o nitrogênio se encontra disponível no meio é determinante para que a célula consiga sua utilização. A forma mais favorável a este aproveitamento é a amoniacal, amídica (uréia) ou amínica (aminoácidos) (BASSO et al., 1996).

A suplementação do meio ACA com uréia ( $0,96 \text{ g.L}^{-1}$ ) equilibrou o mosto em relação à necessidade de nitrogênio durante a fermentação, e fez com que a fase logarítmica de multiplicação da *S. cerevisiae* fosse aumentada, acarretando em maior rendimento em etanol (THEERARATTANANOON et al., 2008).

Já o fósforo é um dos componentes das principais macromoléculas como os ácidos nucléicos, fosfolipídios e ATP. Além disso, o fósforo tem participação em diversas rotas metabólicas envolvidas na obtenção de energia por parte da célula, como acontece na glicólise (HONIG, 1960). Um estudo mostrou que a adição de 20mM de fosfato de diamônio melhorou o processo fermentativo possibilitando obter

15,8% (v/v) de etanol, valor superior aos 12% atualmente produzidos (THOMAS et al., 1996).

Além da utilização de suplementos capazes de aumentar a tolerância celular, a técnica ACA pode se desenvolver com o emprego de linhagens capazes de suportar fermentações com elevados teores alcoólicos, tanto para produção de cerveja (HUUSKONEN et al., 2010) ou álcool (ORTIZ-ZAMORA et al., 2009; STANLEY et al., 2010).

Com base no que foi exposto, fica evidente que a aplicação da fermentação empregando alta concentração de substrato possibilita alcançar melhorias em vários âmbitos do processo fermentativo, desde os aspectos econômicos até os fatores ambientais, uma vez que se obtém melhor rendimento em etanol, facilita e barateia a etapa de destilação e contribui para a diminuição da produção de resíduos ambientalmente prejudiciais.

### 3.7 Modelagem matemática da fermentação em batelada alimentada

#### 3.7.1 Modelos cinéticos

Para se avaliar o processo fermentativo é necessário utilizar expressões que descrevem a cinética das concentrações de células –  $X$  (g/L), substrato –  $S$  (g/L), e etanol (produto) –  $P$  (g/L). Um modelo aplicado ao estudo da fermentação alcoólica está expresso nas três equações diferenciais abaixo (SCHMIDELL et. al, 2001):

$$\frac{dX}{dt} = r_x$$

$$\frac{dS}{dt} = -r_s$$

$$\frac{dP}{dt} = r_p$$

Nas equações acima,  $r_x$ ,  $r_s$  e  $r_p$  representam, respectivamente, o crescimento celular, a taxa de consumo de substrato e a taxa de formação de produto, todas medidas em (g/L.h).

Nos processos fermentativos, a célula é exposta a estresses inibitórios, incluindo estresse osmótico devido à concentração de substrato, estresse pelo etanol ao final da fermentação e alta densidade celular no biorreator. Um dos modelos capazes de avaliar estes efeitos inibitórios sobre a levedura foi o empregado por Rivera et al. (2017), mostrado na equação 3.1:

$$r_x = \mu_{max} \frac{S}{S + K_s} \exp(-K_i S) \left(1 - \frac{P}{P_{max}}\right)^n \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right)^m X \quad (3.1)$$

Na equação,  $\mu_{max}$  representa a taxa de crescimento específica máxima ( $h^{-1}$ ),  $K_s$  denota a constante de saturação de substrato ( $g/L$ ),  $K_i$  é o parâmetro de inibição por substrato ( $g/L$ ),  $X_{max}$  e  $P_{max}$  são, respectivamente, a concentração de células e de etanol nas quais o crescimento celular cessa ( $g/L$ ), e, por fim,  $m$  e  $n$  são parâmetros adimensionais relacionados às inibições por célula e etanol, respectivamente.

Pela Equação 3.1, é possível observar que à medida que  $P$  se aproxima de  $P_{max}$  e  $X$  se aproxima de  $X_{max}$  a taxa de crescimento celular tende a zero. Estes efeitos representam, respectivamente, os efeitos de inibição causados por etanol e por altas densidades celulares. Além disso, a exponencial de argumento negativo,  $\exp(-K_i S)$ , indica que para concentrações altas de substrato a taxa de crescimento celular também tende a zero, fazendo com que este termo represente a inibição por substrato sofrido pelas leveduras.

Dessa forma, o modelo da Equação 3.1, por conseguir abarcar os fenômenos de inibição, foi utilizado por Rivera et al. (2017) para simulação da fermentação com alta concentração de açúcar (RIVERA et al., 2017).

O etanol é produzido pelas células devido às reações metabólicas realizadas para satisfazer às necessidades energéticas de crescimento. Dessa forma, a taxa de formação de produto deve depender de um parâmetro associado ao crescimento, de acordo com a equação proposta por Luedeking e Piret:

$$r_p = Y_{p/x} r_x \quad (3.2)$$

Na equação acima,  $Y_{p/x}$  denota a constante de Luedeking-Piret associada ao crescimento ( $g/g$ ).

De maneira análoga ao que foi feito para a taxa de produção de etanol, o consumo de substrato também deve depender de um parâmetro associado ao crescimento:

$$r_s = \frac{r_x}{Y_x} \quad (3.3)$$

Onde  $Y_x$  é o rendimento celular ( $g/g$ ). O conjunto das Equações (3.1) a (3.3) formam um modelo empregado no estudo de fermentação alcoólica.

Vale ressaltar que estas equações não abarcam os efeitos de todas as variáveis que influenciam o processo fermentativo. A temperatura e o pH, por exemplo, não estão abarcados nas equações acima descritas. Apesar de essas

ausências representarem uma perda de generalização de análise dos processos, pode-se interpretar que as equações simulam a fermentação em situações controladas de pH e temperatura. Para cada condição de temperatura e pH analisada, é de se esperar que exista diferença nos valores numéricos dos parâmetros fenomenológicos embutidos nas equações. Dessa forma, quando se realiza as simulações através destas equações, o processo está sendo analisado para condições fixadas de temperatura e pH.

### 3.7.2 Balanço de massa para fermentação batelada alimentada

Além dos modelos cinéticos que descrevem o comportamento de cada variável envolvida no processo fermentativo, é preciso seja feito um balanço de massa destes compostos para que se consiga simular os efeitos do regime em batelada alimentada. A seguir, será mostrado o balanço de massa para as três componentes, análogo ao mostrado por Schmidell (2001) (SCHMIDELL et. al, 2001).

A taxa de variação da massa celular no interior do reator corresponde à massa celular formada devido ao crescimento microbiano:

$$\left(\frac{dM_x}{dt}\right) = \left(\frac{dM_x}{dt}\right)_c$$

Sendo  $V$  o volume ocupado dentro do reator, temos:

$$\frac{d(V \cdot X)}{dt} = r_x V$$

Expandindo a derivada no primeiro membro da equação acima, obtemos:

$$\frac{dV}{dt} X + \frac{dX}{dt} V = r_x V$$

A variação do volume na dorna deve-se exclusivamente à alimentação  $F$  ( $L/h$ ). Com isso, rearranjando a equação acima obtemos a equação para a taxa de variação da concentração celular para um regime em batelada alimentada:

$$\frac{dX}{dt} = r_x - \frac{F}{V} X \quad (3.4)$$

Já a taxa de variação da massa de substrato na dorna corresponde à diferença entre a massa de substrato adicionada por tempo, vinda da fonte de alimentação com concentração  $S_f$ , e a utilizada para o crescimento e manutenção celular. Dessa forma, temos:

$$\frac{dM_s}{dt} = FS_f - r_s V$$

$$\frac{d(V.S)}{dt} = FS_f - r_s V$$

Expandindo a derivada do primeiro membro, obtemos:

$$\frac{dV}{dt}S + \frac{dS}{dt}V = FS_f - r_s V$$

De novo, A variação do volume na dorna deve-se exclusivamente à alimentação  $F$ . Rearranjando a equação acima, obtemos a equação para a taxa de variação da concentração celular para um regime em batelada alimentada

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F}{V}(S_f - S) - r_s \quad (3.5)$$

Já para o produto, temos que a sua taxa de variação no fermentador depende da massa de etanol formada devido ao metabolismo microbiano:

$$\frac{dM_p}{dt} = \left( \frac{dM_p}{dt} \right)_c$$

$$\frac{d(V.P)}{dt} = r_p V$$

Expandindo a derivada do primeiro termo da equação acima, obtemos:

$$\frac{dV}{dt}P + \frac{dP}{dt}V = r_p V$$

De maneira análoga ao que foi realizado nos modelos para célula e substrato, obtemos a equação que fornece a taxa de variação da concentração de etanol:

$$\frac{dP}{dt} = r_p - \frac{F}{V}P \quad (3.6)$$

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Simulações computacionais

Para avaliar a fermentação com alta concentração de açúcar em batelada alimentada, as Equações (3.1) a (3.3) foram introduzidas nas Equações (3.4) a (3.6), formando o conjunto de equações a seguir:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} \frac{S}{S + K_S} \exp(-K_i S) \left(1 - \frac{P}{P_{max}}\right)^n \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right)^m X - \frac{F}{V} X \quad (4.1)$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F}{V} (S_f - S) - \frac{r_x}{Y_x} \quad (4.2)$$

$$\frac{dP}{dt} = Y_{p/x} r_x - \frac{F}{V} P \quad (4.3)$$

A integração numérica do conjunto das Equações (4.1) a (4.3) foi realizada por meio da aplicação da função *odeint* da biblioteca *SciPy*, em um código de simulação escrito pelo autor em linguagem *Python*, que pode ser encontrado no Anexo deste trabalho. Os valores numéricos dos parâmetros fenomenológicos do conjunto de equações diferenciais, apresentados na **Tabela 4.1**, são os mesmos que os apresentados por Rivera et al. (2017), que obteve estes valores ao analisar uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* submetida às condições que caracterizam a fermentação com alta concentração de açúcar, sob temperatura de 30°C.

**Tabela 4.1** – Valores dos parâmetros utilizados nas simulações computacionais

Parâmetro	Valor
$\mu_{max}$	0,38 h <sup>-1</sup>
$K_S$	4,1 gL <sup>-1</sup>
$K_i$	0,0043 gL <sup>-1</sup>
$P_{max}$	115,1 gL <sup>-1</sup>
$X_{max}$	68,1 gL <sup>-1</sup>
$Y_{p/x}$	6,6 g/g
$Y_x$	0,066 g/g
$m$	1,0
$n$	1,5

Fonte: RIVERA et al. (2017)

Os valores dos parâmetros fenomenológicos foram obtidos por Rivera et al. (2017) através de um procedimento matemático que adéqua as constantes numéricas do modelo de acordo com os dados experimentais obtidos nas fermentações. Deste modo, a utilização dos valores presentes na **Tabela 4.1** simula o comportamento das mesmas linhagens de levedura empregadas no trabalho que obteve os valores destas constantes.

## 4.2 Procedimento das simulações

A fim de avaliar o comportamento da fermentação alcoólica para diferentes concentrações de açúcar no mosto ( $S_m$ ), as Equações (4.1) a (4.3) foram simuladas para concentrações de 180, 200, 220, 240, 260 e 280  $g.L^{-1}$ . Como já discutido anteriormente, as simulações realizadas empregando concentração de 180  $g.L^{-1}$  serão tomadas como grupo controle, uma vez que é esta concentração praticada nas fermentações convencionais.

Além de se avaliar o processo fermentativo para diferentes concentrações de açúcar no mosto, outro parâmetro avaliado nas simulações foi o tempo de enchimento da dorna. Para isso, considerando uma vazão constante, as simulações foram realizadas para tempos de enchimento de 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 horas. O tempo de fermentação representa o instante em que não há mais incremento considerável na concentração de produto. Nas simulações, a concentração de produto atinge o estado estacionário para tempos muito grandes, podendo chegar a 720 horas para concentração de açúcar no mosto igual a 180  $g.L^{-1}$ . Entretanto, para fins práticos, foi considerado que a fermentação chegou ao seu estado final quando a concentração de produto atingiu 99% da concentração máxima para aquela condição.

O volume útil do reator não interfere nas concentrações de substrato e produto, mas, para fins de simulação, foi considerado um biorreator de 1000 litros de volume útil. Foi assumido que o reator começou com 30% do seu volume útil (300L) preenchido com inóculo inicial, sendo que este inóculo, no tempo  $t = 0$ , continha 50  $g.L^{-1}$  de concentração de células ( $X$ ), mesmas condições experimentais utilizadas por SONEGO (2014). Para simular a batelada alimentada, o processo começa com a alimentação da dorna com substrato à vazão ( $F$ ) constante até o tempo de enchimento. Para todas as simulações, a dorna atinge seu volume útil máximo (1000L) ao final do enchimento. Isso significa o volume total

de alimentação deve ser de 700 litros, de modo que se complete o volume total da dorna de 1000L. Desse modo, a vazão ( $F$ ) muda para cada tempo de enchimento ( $t_e$ ) através da Equação 4.4:

$$F = \frac{700}{t_e} \quad (4.4)$$

Ao chegar no tempo de enchimento, a alimentação cessa ( $F = 0$ ) e o processo se desenrola como uma batelada normal, sem que haja mais alimentação de substrato à dorna.

A concentração de açúcar no mosto ( $S_m$ ) está englobada na concentração de açúcar na alimentação ( $S_f$ ), presente na Equação 4.2. A concentração na alimentação deve ser aquela que produzirá a concentração no mosto pretendida. Dessa forma, como a alimentação encherá os 70% restantes do volume da dorna, os dois parâmetros se relacionam através da Equação 4.5:

$$S_f = \frac{S_o}{0,7} \quad (4.5)$$

As variações dos parâmetros  $S_m$  e  $t_e$  nas simulações poderão ser feitas através das equações (4.4) e (4.5).

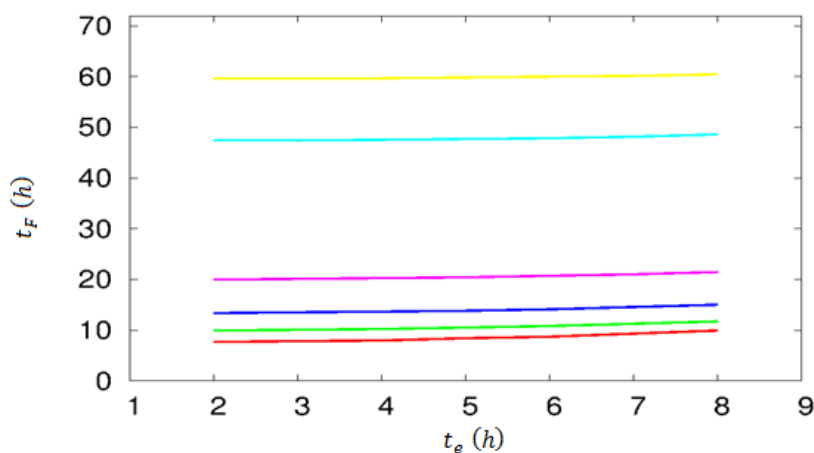
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Utilizando os procedimentos descritos na seção anterior, o processo fermentativo foi avaliado e, nesta seção, serão apresentados os resultados gráficos e numéricos que mostrarão a forma com o tempo de enchimento da dorna e a concentração de açúcar no mosto interferem no processo fermentativo.

### 5.1 Efeito do tempo de enchimento da dorna no processo fermentativo

De modo geral, a se pensar nos interesses industriais, os dois parâmetros mais importantes a serem analisados no final do processo são a concentração final de etanol no biorreator e o tempo necessário para que se atinja estas concentrações. Dessa forma, nesta seção, será analisado a maneira com que os diferentes tempos de enchimento influenciam nos valores destes dois indicadores.

O gráfico da **Figura 5.1** mostra como o tempo de enchimento afeta o tempo de fermentação para as diferentes concentrações de açúcar no mosto.



**Figura 5.1:** Variação do tempo total de fermentação ( $t_F$ ) para diferentes tempos de enchimento da dorna ( $t_e$ ) utilizando concentrações de açúcar no mosto de  $180\text{g.L}^{-1}$  (-);  $200\text{g.L}^{-1}$  (-);  $220\text{g.L}^{-1}$  (-);  $240\text{g.L}^{-1}$  (-);  $260\text{g.L}^{-1}$  (-);  $280\text{g.L}^{-1}$  (-). (Fonte: O autor)

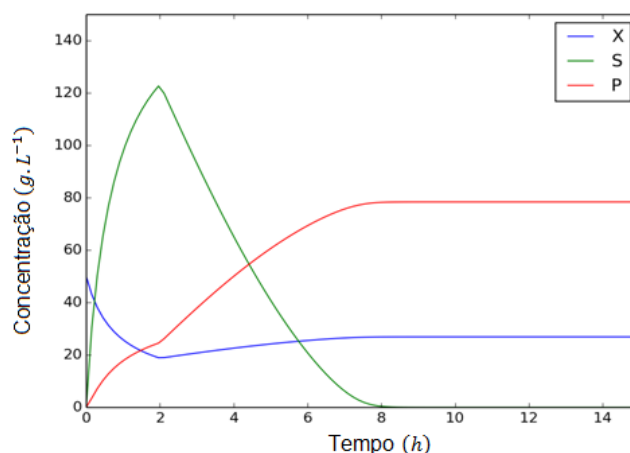
O gráfico acima mostra que o tempo de enchimento tem pouca influência no tempo total de fermentação. Para concentrações altas, esta influência se torna ainda mais imperceptível. Para  $280\text{g.L}^{-1}$ , quando a dorna se enche em 2 horas são necessárias 59,7 horas para que a fermentação se encerre. Para a mesma concentração, o tempo total de fermentação atinge 60,4 horas para tempo de enchimento igual a 8 horas. Para  $260\text{g.L}^{-1}$ , os valores limites para os tempos de fermentação são 47,4 e 48,6h, e para  $240\text{g.L}^{-1}$  estes valores são 19,9 e 21,4 horas.

Entretanto, as diferenças tornam-se mais relevantes quando o processo se dá com concentrações menores de substrato no mosto. Nas simulações feitas com  $220 \text{ g.L}^{-1}$ , são necessárias 13,3 horas para o fim da fermentação para tempo de enchimento de 2 horas. Para o tempo de enchimento de 8 horas, a fermentação se finda após 9 horas. Os menores e maiores valores para as concentrações de 200 e  $180 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente, são: 9,9 – 1,1 horas e 7,6 – 9,9 horas.

Dessa forma, os dados apontam que quanto menor o tempo de enchimento, menor será o tempo de fermentação. Desse modo, as simulações mostradas a seguir, para cada uma das concentrações de substrato no mosto, dizem respeito aos processos desempenhados com tempo de enchimento de 2 horas.

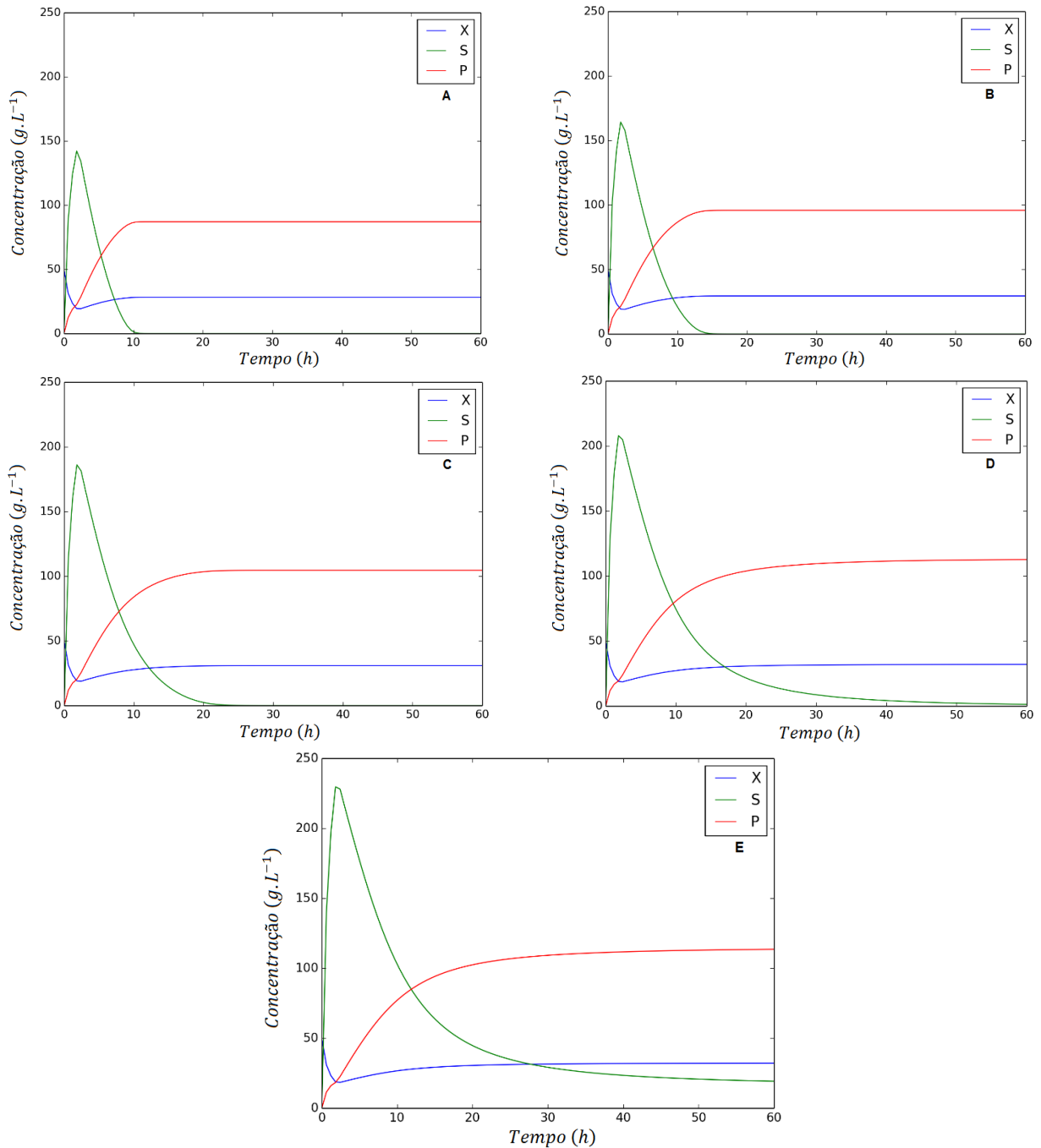
## 5.2 Efeito da concentração de açúcar no mosto no processo fermentativo

Para o grupo controle, com concentração de açúcar no mosto igual a  $180 \text{ g.L}^{-1}$ , as concentrações de célula, substrato e produto ao longo do tempo estão mostradas no gráfico da **Figura 5.2**.



**Figura 5.2:** Concentrações de células (X), substrato (S) e produto (P) no reator ao longo do tempo para fermentação em batelada alimentada com tempo de enchimento de 2 horas para concentração de açúcar no mosto igual a  $180 \text{ g.L}^{-1}$ . (Fonte: O autor)

Para esta concentração, o processo durou 7,6 horas e obteve uma concentração final de etanol de  $77,87 \text{ g.L}^{-1}$ . A concentração máxima de substrato na dorna foi de  $122,55 \text{ g.L}^{-1}$  e não houve açúcar residual ao fim da fermentação. Análogo ao que apresentado para o grupo controle na **Figura 5.2**, a **Figura 5.3** mostra a evolução das concentrações de célula, substrato e etanol no tempo para as demais concentrações de açúcar no mosto simuladas.



**Figura 5.3** - Concentrações de células (X), substrato (S) e produto (P) no reator ao longo do tempo para fermentação em batelada alimentada com tempo de enchimento de 2 horas para concentração de açúcar no mosto igual a 200 g.L<sup>-1</sup> (A); 220 g.L<sup>-1</sup> (B); 240 g.L<sup>-1</sup> (C); 260 g.L<sup>-1</sup> (D) e 280 g.L<sup>-1</sup> (E). (Fonte: O autor)

Para concentração de substrato inicial igual 200 g.L<sup>-1</sup>, o processo durou 9,9h e obteve uma concentração final de etanol de 86,44 g.L<sup>-1</sup>. A concentração máxima de substrato no fermentador foi de 145,26 g.L<sup>-1</sup> e não houve açúcar residual ao fim da fermentação. Para esta condição houve ganho de 11,0% em concentração final de etanol.

Já para concentração de substrato no mosto igual a  $220 \text{ g.L}^{-1}$ , a duração da fermentação foi de 13,3 horas, atingindo  $94,96 \text{ g.L}^{-1}$  de etanol no fim do processo, representando um ganho de 21,9% de etanol no final da fermentação quando comparado ao grupo controle. A concentração de substrato ao fim do enchimento da dorna foi de  $167,88 \text{ g.L}^{-1}$  e não houve açúcar residual no final do processo.

As simulações realizadas com concentração de substrato no mosto igual a  $240 \text{ g.L}^{-1}$  tiveram seu fim em 20,1 horas e alcançaram  $103,56 \text{ g.L}^{-1}$  de etanol, um incremento de 33,0% comparado à fermentação realizada sob as condições convencionais. A concentração de substrato atingiu valor máximo de  $190,40 \text{ g.L}^{-1}$  e o processo não apresentou açúcar residual.

O processo simulado com  $260 \text{ g.L}^{-1}$  de açúcar no substrato precisou de 47,4 horas para chegar ao fim e atingiu  $111,87 \text{ g.L}^{-1}$  de etanol, um incremento de 43,7% comparado à fermentação realizada sob as condições convencionais. A concentração de substrato atingiu valor máximo de  $212,80 \text{ g.L}^{-1}$  e o processo apresentou  $3,21 \text{ g.L}^{-1}$  açúcar residual.

Por fim, para concentração de substrato no mosto igual a  $280 \text{ g.L}^{-1}$ , o tempo de fermentação atingiu 59,7 horas com uma concentração final de etanol igual a  $112,98$ , significando um aumento de 45,0% comparado à fermentação realizada sob as condições convencionais. A concentração de substrato atingiu valor máximo de  $235,06 \text{ g.L}^{-1}$  e o processo apresentou açúcar residual igual a  $20,63 \text{ g.L}^{-1}$ .

**Tabela 5.1** – Dados finais dos processos fermentativos para cada concentração de açúcar no mosto

$S_m$	$t_F$	$P_F$	$X_{res}$
$180,0 \text{ gL}^{-1}$	7,6 h	$77,87 \text{ gL}^{-1}$	$0,0 \text{ gL}^{-1}$
$200,0 \text{ gL}^{-1}$	9,9 h	$86,44 \text{ gL}^{-1}$	$0,0 \text{ gL}^{-1}$
$220,0 \text{ gL}^{-1}$	13,3 h	$94,96 \text{ gL}^{-1}$	$0,0 \text{ gL}^{-1}$
$240,0 \text{ gL}^{-1}$	20,1 h	$103,56 \text{ gL}^{-1}$	$0,0 \text{ gL}^{-1}$
$260,0 \text{ gL}^{-1}$	47,4 h	$111,87 \text{ gL}^{-1}$	$3,21 \text{ gL}^{-1}$
$280,0 \text{ gL}^{-1}$	59,7 h	$112,98 \text{ gL}^{-1}$	$20,63 \text{ gL}^{-1}$

Fonte: O autor

Os valores para as concentrações de etanol mostrados na **Tabela 5.1** apresentam grande proximidade com os obtidos por Phukoetphim et al. (2017), que colheu dados experimentais de fermentações ACA também utilizando várias concentrações de açúcar no mosto, utilizando caldo de sorgo sacarino como

substrato. No trabalho em questão, para concentrações de açúcar no mosto iguais a  $200 \text{ gL}^{-1}$ ,  $240 \text{ gL}^{-1}$  e  $280 \text{ gL}^{-1}$ , foram obtidos, respectivamente,  $93,8 \text{ gL}^{-1}$ ,  $102,2 \text{ gL}^{-1}$  e  $112,5 \text{ gL}^{-1}$  de etanol. Os tempos de fermentação para cada uma das condições foram, respectivamente, 48, 48 e 72 horas.

A **Tabela 5.1** mostra que os processos desenrolados com concentrações de açúcar no mosto iguais a  $200 \text{ gL}^{-1}$  e  $240 \text{ gL}^{-1}$  não obtiveram açúcar residual ao fim da fermentação. Entretanto, para as mesmas concentrações, Phukoetphim et al. (2017) relatou a sobra de 7% de açúcar na dorna ao fim da fermentação. Já para a fermentação realizada  $280 \text{ gL}^{-1}$  de açúcar no mosto, o mesmo trabalho apontou 13,1% de açúcar residual.

Para a condição mais extrema mostrada na **Tabela 5.1**, foi observado que o tempo de fermentação se aproxima das 60 horas. Este tempo alto de fermentação também foi observado em outros trabalhos, que ao aplicar concentrações de açúcar no mosto próximas a  $300 \text{ gL}^{-1}$  tiveram como resultado um tempo de fermentação superior a 70 horas (PRADEEP et al., 2010; SRICHUWONG et al., 2009; THOMAS e INGLEDEW, 1990).

Os resultados acima descritos apontam para o ganho em etanol à medida que se aumenta a concentração de açúcar no mosto. Entretanto, deve-se levar em conta que os tempos analisados são aqueles requeridos para que a fermentação atinja a condição de estado estacionário proposta na metodologia. Contudo, para fins práticos, tempos muito grandes de fermentação podem ser inviáveis sob o ponto de vista industrial. Com isso, para que se consiga comparar cada uma das condições dentro de um contexto industrial, é necessário que cada processo seja analisado dentro da mesma escala de tempo.

### 5.3 Análise dos processos simulados em escalas de tempos definidas

As análises feitas até então, levaram em consideração apenas os estágios finais de cada fermentação. O estudo destes estágios é útil para investigarmos se, de fato, tem havido aumento de produtividade em etanol para cada um dos perfis simulados, assim como previa a fermentação ACA.

Entretanto, estes parâmetros obtidos ao final de cada fermentação podem não ter significados práticos se colocados em um contexto industrial já que o tempo de fermentação deve ser um fator determinante para se avaliar a viabilidade de

execução de certa operação. O ideal é que se consiga altas concentrações de etanol em pequenos tempos de fermentação, sem que haja açúcar residual na dorna.

Entretanto, os dados apontam que o aumento em produtividade de etanol necessita de tempos maiores de fermentação e, em situações extremas de concentração de açúcar no mosto, o processo termina com açúcar residual na dorna. Com isso, a escolha da condição ótima de operação deve ser aquela que melhor integre estes parâmetros sob uma análise econômica de desempenho. Acerca disso, é possível que, para certa condição, o ideal seja parar o processo antes do tempo final de fermentação, uma vez que os ganhos que seriam conseguidos com o incremento na produção de etanol podem ser menores que as perdas geradas pelo longo tempo necessário para atingir estes estágios.

Para deixar a discussão mais restrita, a fermentação foi analisada ao final de 10, 20 e 30 horas, como apresentado nas tabelas (A B e C). As tabelas mostram as concentrações de açúcar no mosto analisadas ( $S_m$ ), os valores das concentrações de etanol ( $P_{10}$ ,  $P_{20}$ ,  $P_{30}$ ) e substrato ( $S_{10}$ ,  $S_{20}$ ,  $S_{30}$ ) ao final de cada intervalo de tempo analisado. Além disso, as tabelas mostram a porcentagem de etanol atingido ao final de cada intervalo de tempo quando comparado às concentrações finais de etanol obtidas em cada condição ( $P_{10/F}$ ,  $P_{20/F}$ ,  $P_{30/F}$ ). Por fim, as tabelas também apresentam o tempo restante de fermentação para cada uma das condições ( $t_{res}$ ), para que seja possível vislumbrar a viabilidade de estender o processo até seu estágio final.

**Tabela 5.2** – Comportamento da fermentação após 10 horas

$S_m$	$P_{10h}$	$S_{10h}$	$P_{10/F}$	$t_{res}$
180,0 $gL^{-1}$	77,87 $gL^{-1}$	0,0 $gL^{-1}$	100,0%	–
200,0 $gL^{-1}$	86,44 $gL^{-1}$	0,0 $gL^{-1}$	100,0%	–
220,0 $gL^{-1}$	86,75 $gL^{-1}$	20,84 $gL^{-1}$	91,3%	3,3h
240,0 $gL^{-1}$	84,04 $gL^{-1}$	47,05 $gL^{-1}$	81,1%	10,1h
260,0 $gL^{-1}$	80,74 $gL^{-1}$	74,63 $gL^{-1}$	72,2%	37,4h
280,0 $gL^{-1}$	77,15 $gL^{-1}$	102,82 $gL^{-1}$	68,3%	49,7h

Fonte: O autor

Ao final de 10 horas, observamos na **Tabela 5.2** que a concentração de açúcar no mosto igual a 200 0  $gL^{-1}$  e 220  $gL^{-1}$  foram as que mais apresentaram produtividade em etanol.

Entretanto, apesar da ligeira vantagem em etanol para a segunda condição, a presença de açúcar residual poderia ser um fator que apontaria para a utilização da concentração no mosto de  $200,0 \text{ gL}^{-1}$ , se o processo tivesse que ser interrompido após 10 horas. Importante ressaltar que, ao final das 10 horas, altas concentrações de açúcar no mosto estão longe do seu maior potencial produtivo, sendo que a condição mais extrema obteve apenas 68,3% da sua produtividade máxima em etanol.

**Tabela 5.3** – Comportamento da fermentação após 20 horas

$S_m$	$P_{20h}$	$S_{20h}$	$P_{20/F}$	$t_{res}$
$180,0 \text{ gL}^{-1}$	$77,87 \text{ gL}^{-1}$	$0,0 \text{ gL}^{-1}$	100%	–
$200,0 \text{ gL}^{-1}$	$86,44 \text{ gL}^{-1}$	$0,0 \text{ gL}^{-1}$	100%	–
$220,0 \text{ gL}^{-1}$	$94,96 \text{ gL}^{-1}$	$0,0 \text{ gL}^{-1}$	100%	–
$240,0 \text{ gL}^{-1}$	$103,50 \text{ gL}^{-1}$	$2,39 \text{ gL}^{-1}$	99,9%	0,1h
$260,0 \text{ gL}^{-1}$	$103,86 \text{ gL}^{-1}$	$21,56 \text{ gL}^{-1}$	92,8%	27,4h
$280,0 \text{ gL}^{-1}$	$102,48 \text{ gL}^{-1}$	$44,72 \text{ gL}^{-1}$	90,7%	39,7h

Fonte: O autor

Após 20 horas, é possível observar na **Tabela 5.3** que as quatro primeiras condições estão praticamente encerradas, sendo que todas elas não possuem concentrações de açúcar significativas no fermentador. Dentre elas, a concentração  $S_m$  que parece ter a melhor performance econômica é a de  $240,0 \text{ gL}^{-1}$ , já que a produtividade em etanol é quase a mesma que da condição seguinte, mas com uma diferença significativa na concentração de açúcar residual.

Ao final destas 20 horas, as duas últimas condições já atingiram mais que 90% de suas capacidades produtivas, e, apesar disso, necessitam de mais 27,4 e 39,7 horas, respectivamente, para alcançarem o final da fermentação. Estas diferenças entre os incrementos em produtividade e em tempo devem ser analisadas de modo que se verifique se estas condições possuem, no sentido prático, boas condições de execução.

Importante ressaltar que após 20 horas, para as duas últimas condições, os altos valores referentes às concentrações de açúcar residual podem inviabilizar a interrupção da fermentação neste estágio de tempo analisado.

**Tabela 5.4** – Comportamento da fermentação após 30 horas.

$S_0$	$P_{30h}$	$S_{30h}$	$P_{30/F}$	$t_{res}$
180,0 $gL^{-1}$	77,87 $gL^{-1}$	0,0 $gL^{-1}$	100%	–
200,0 $gL^{-1}$	86,44 $gL^{-1}$	0,0 $gL^{-1}$	100%	–
220,0 $gL^{-1}$	94,96 $gL^{-1}$	0,0 $gL^{-1}$	100%	–
240,0 $gL^{-1}$	103,56 $gL^{-1}$	0,0 $gL^{-1}$	100%	–
260,0 $gL^{-1}$	109,47 $gL^{-1}$	8,68 $gL^{-1}$	97,8%	17,4h
280,0 $gL^{-1}$	109,24 $gL^{-1}$	29,18 $gL^{-1}$	96,7%	29,7h

Fonte: O autor

Ao final de 30 horas, a **Tabela 5.4** mostra que as últimas duas condições estão com quase todo seu potencial produtivo atingido. A concentração de açúcar no mosto igual 260,0  $gL^{-1}$  tem melhor performance sobre a última, já que tem maior concentração de produto e menos açúcar residual na dorna. Para as duas últimas condições, podemos ver que o a produtividade em etanol já alcançou praticamente todo o seu potencial.

Entretanto, para estas condições, são necessárias 17,4 e 29,7 horas, respectivamente, para que a fermentação termine. Dessa forma, para estas condições, é necessário que se avalie a viabilidade de estender o processo até o final, uma vez que os ganhos em produtividade de etanol podem ser irrelevantes quando comparados ao acréscimo de tempo necessário para atingir estes valores. Concomitante a isso, é necessário que se investigue quais as concentrações de açúcar residual na dorna que inviabilizariam o processo, de modo que seja possível analisar possíveis interrupções no desenrolar da fermentação ao se buscar a condição ótima de operação.

Além das análises individuais de cada tabela, é possível que se faça um confronto de informações entre diferentes escalas de tempo, de modo que seja possível identificar a viabilidade de encerrar um procedimento se os ganhos até a próxima escala de tempo forem insignificantes. Vale ressaltar, contudo, que estas medições referentes a otimizações operacionais devem ser feitas com um conjunto integrado de análises de custos e lucros gerados por cada um dos parâmetros envolvidos no processo.

## 6 CONCLUSÃO

As simulações realizadas neste trabalho, sob diferentes condições operacionais, mostraram que o tempo de enchimento da dorna, sob vazão de alimentação constante, tem pouca influência no tempo total de fermentação. Entretanto, apesar da pouca diferença, tempos menores de enchimento produzem menores tempos de fermentação. Dessa forma, ficou constatado que o ideal é que a dorna se encha na menor duração possível, que nas condições assumidas pelo trabalho foi o tempo de 2 horas.

Os resultados obtidos mostraram que o processo de fermentação com alta concentração de açúcar tem a capacidade de produzir concentrações de etanol mais elevadas que as obtidas tradicionalmente. Foi mostrado que para  $280 \text{ g.L}^{-1}$  de açúcar no mosto, o processo fermentativo se encerrou com  $112,98 \text{ g.L}^{-1}$  de etanol, o que representa um acréscimo de 45,0% em relação ao grupo controle. Entretanto, para a mesma condição, houve a sobra de  $20,63 \text{ g.L}^{-1}$  de açúcar na dorna, o que significa uma perda de substrato além de significar uma condição que dificulta e encarece a etapa de destilação. Para as demais concentrações de açúcar no mosto, não foi observado quantidade significativa de açúcar residual na dorna após a fermentação.

Apesar dos ganhos consideráveis em produção de etanol, foi visto que os tempos necessários para que a fermentação se encerre sobem consideravelmente à medida que as concentrações de açúcar no mosto aumentam. Grandes tempos de fermentação podem significar uma condição limitante para a produção industrial, sendo necessário investigar soluções intermediárias de operação.

Desse modo, as simulações realizadas foram postas em comparação sob escalas de tempo iguais, sendo possível discutir a viabilidade de interromper um processo antes do seu tempo final, uma vez que os ganhos de produtividade seriam insignificantes quando comparados ao longo tempo necessário para atingir estes patamares finais do processo. A integração dos resultados deste trabalho com uma análise criteriosa de custos de todos os parâmetros envolvidos no processo pode ser a chave para encontrar as condições ótimas de operação, que garantirão os melhores desempenhos econômicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHÃO-NETO, J.; INFANTI, P.; VITOLO, M. Influence of pH, temperature and dissolved oxygen concentration on the production of glucose 6-phosphate dehydrogenase and invertase by *Saccharomyces cerevisiae*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 14, 1997.

AIBA, S.; SHODA, M.; NAGATANI, M. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. **Biotechnology and bioengineering**, v. 67, n. 6, p. 671-690, 2000

ALMEIDA, J. R. Processo de recuperação de Levedura ou processo Melle-Boinott. **Semana da fermentação alcoólica**, v. 1, p. 254-262, 1960.

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

ATALA, Daniel Ibraim Pires. Montagem, instrumentação, controle e desenvolvimento experimental de um processo fermentativo extrativo de produção de etanol. **Tese de doutorado**. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 2004.

BANAT, I. M. et al. Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I–Yeasts in general. **world Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, n. 6, p. 809-821, 1998.

BASSO, L. C. et al. Leveduras selecionadas: permanência no processo industrial monitorada pela técnica da cariotipagem. **Relatório Anual de Pesquisas em Fermentação Alcoólica**, n. 16, p. 1-51, 1996.

BASSO, L.C.; PAULILLO, S.C.L. Estudo comparativo entre a levedura "turbo" e a PE-2 para fermentações com elevados teores alcoólicos. In: ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ". **Relatório anual de pesquisas em fermentação alcoólica**. Piracicaba, 2003. p. 12-25.

BASSO, Luiz C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS yeast research**, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008.

BASSO, Luiz Carlos; BASSO, Thiago Olitta; ROCHA, Saul Nitsche. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: **Biofuel production-recent developments and prospects**. InTech, 2011.

BELCHER, Alan et al. The world looks to higher-tech to advance fuel ethanol production into the 21st century. **International sugar journal**, v. 107, n. 1275, p. 196-199, 2005.

CARDOSO, M. das G. et al. Produção de aguardente de cana. **Lavras. Ed. UFLA**, 2006.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação descontínua, biotecnologia industrial: Engenharia Bioquímica. 2001.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da

safrabrasileira. Disponível em: < <http://www.conab.gov.br> > Acessado em Dez. 2018  
CYSEWSKI, Gerald R.; WILKE, Charles R. Process design and economic studies of alternative fermentation methods for the production of ethanol. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 20, n. 9, p. 1421-1444, 1978.

DARÉ, Raul Marcel. Avaliação de coeficientes de rendimento e modelagem do processo fermentativo de produção de etanol. **Tese de doutorado**. Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR, 2008.

DE OLIVEIRA, Adilson. Reassessing the Brazilian alcohol programme. **Energy Policy**, v. 19, n. 1, p. 47-55, 1991.

DE SOUZA DIAS, Marina Oliveira et al. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. **Environmental Development**, v. 15, p. 35-51, 2015.

FERREIRA, Célia et al. A member of the sugar transporter family, Stl1p is the glycerol/H<sup>+</sup> symporter in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 16, n. 4, p. 2068-2076, 2005.

FERREIRA, Erica. Contribuição para o estudo da otimização da fermentação alcoólica operando em batelada-alimentada. 86f. **Dissertação (mestrado)**. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 2005.

GODOY, A.; AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, A. J. Continuous and batch fermentation processes: advantages and disadvantages of these processes in the Brazilian ethanol production. **International Sugar Journal**. v.110 (1311), p 175–181, 2008.

GOLDEMBERG, José. Pesquisa e desenvolvimento na área de energia. **São Paulo em perspectiva**, v. 14, n. 3, p. 91-97, 2000.

GOLDEMBERG, Jose; MACEDO, Isaias C. Brazilian alcohol program: an overview. **Energy for Sustainable Development**, v. 1, n. 1, p. 17-22, 1994.

GRAVES, Tara et al. Interaction effects of lactic acid and acetic acid at different temperatures on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 73, n. 5, p. 1190-1196, 2007.

HENDLER, Bernardo. Construção de um software de simulação e modelagem para processo de fermentação alcoólica em batelada alimentada, considerando diauxia para a glicose e a frutose. **Tese (Mestrado)** – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

HONIG, P. The presence of phosphate in cane juice. **Proceedings**. Amsterdam: Elsevier, p.351-361, 1960.

HUUSKONEN, Anne et al. Selection from industrial lager yeast strains of variants with improved fermentation performance in very-high-gravity worts. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 5, p. 1563-1573, 2010.

LEÃO, Cecilia; VAN UDEN, N. Effects of ethanol and other alkanols on the glucose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and**

**Bioengineering**, v. 24, n. 11, p. 2601-2604, 1982.

LLOYD, David et al. Effects of growth with ethanol on fermentation and membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 9, n. 8, p. 825-833, 1993.

LOPES, C. H.; BORGES, MTMR. Controle na fabricação de álcool. **São Carlos: EdUFSCar**, 2010.

LOPES, Jorge Jose Correa. Balanço de nutrientes minerais no processo Melle-Boinot de fermentação alcoólica. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo – USP, 1989.

LY, Hung V.; BLOCK, David E.; LONGO, Marjorie L. Interfacial tension effect of ethanol on lipid bilayer rigidity, stability, and area/molecule: a micropipet aspiration approach. **Langmuir**, v. 18, n. 23, p. 8988-8995, 2002.

MADIGAN, Michael T. et al. **Microbiologia de Brock-14ª Edição**. Artmed Editora, 2016.

MAGER, Willem H.; SIDERIUS, Marco. Novel insights into the osmotic stress response of yeast. **FEMS yeast research**, v. 2, n. 3, p. 251-257, 2002.

MAIORELLA, B.; WILKE, Ch R.; BLANCH, H. W. Alcohol production and recovery. In: **Bioenergy**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1981. p. 43-92.

MARZZOCO, Anita; TORRES, Bayardo Baptista. Bioquímica básica. In: **Bioquímica básica**. 1999.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA – EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. **Plano Decenal de Expansão de Energia 2024**. Brasília, 2014.

NEWELL, Richard G.; QIAN, Yifei; RAIMI, Daniel. **Global energy outlook 2015**. National Bureau of Economic Research, 2016.

NGANG, JJ Essia; LETOURNEAU, F.; VILLA, P. Alcoholic fermentation of beet molasses: effects of lactic acid on yeast fermentation parameters. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 125-128, 1989.

OLIVEIRA, Adilson. Reassessing the Brazilian alcohol programme. **Energy Policy**, p.47-55, 1991.

ORTIZ-ZAMORA, O. et al. Isolation and selection of ethanol-resistant and osmotolerant yeasts from regional agricultural sources in Mexico. **Journal of food process engineering**, v. 32, n. 5, p. 775-786, 2009.

PARAZZI, Clóvis et al. Avaliação e caracterização dos principais compostos químicos da aguardente de cana-de-açúcar envelhecida em tonéis de carvalho (*Quercus* sp.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, 2008.

PARAZZI, Clóvis et al. Avaliação e caracterização dos principais compostos químicos da aguardente de cana-de-açúcar envelhecida em tonéis de carvalho (*Quercus* sp.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 193-199, 2008.

PHUKOETPHIM, Niphaphat et al. Improvement of ethanol production from sweet sorghum juice under batch and fed-batch fermentations: Effects of sugar levels, nitrogen supplementation, and feeding regimes. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 26, p. 84-92, 2017.

PIDDOCKE, Maya P. et al. Physiological characterization of brewer's yeast in high-gravity beer fermentations with glucose or maltose syrups as adjuncts. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 84, n. 3, p. 453, 2009.

PRADEEP, Puligundla; GOUD, Gangaraju K.; REDDY, Obulam VS. Optimization of very high gravity (VHG) finger millet (ragi) medium for ethanolic fermentation by yeast. **Chiang Mai J Sci**, v. 37, n. 1, p. 116-123, 2010.

PULIGUNDLA, Pradeep et al. Very high gravity (VHG) ethanolic brewing and fermentation: a research update. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 38, n. 9, p. 1133-1144, 2011.

RIVERA, Elmer Ccopa 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.

RIVERA, Elmer Ccopa et al. Evaluation of optimization techniques for parameter estimation: Application to ethanol fermentation considering the effect of temperature. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 7, p. 1682-1687, 2006.

SCHMIDELL, W. et al. *Biocnologia Industrial: Engenharia Bioqumica*. **Edgard Blucher, São Paulo**, 2001.

SHI, Liguang et al. Effect of elemental nano-selenium on feed digestibility, rumen fermentation, and purine derivatives in sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v. 163, n. 2-4, p. 136-142, 2011.

SOUZA-DIAS, Marina Oliveira de et al. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. **Environmental Development**, v. 15, p. 35-51, 2015.

SRICHUWONG, Sathaporn et al. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of very high gravity (VHG) potato mash for the production of ethanol. **Biomass and bioenergy**, v. 33, n. 5, p. 890-898, 2009.

STANLEY, Dragana et al. Generation and characterisation of stable ethanol-tolerant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 139-149, 2010.

THEERARATTANANOON, Karnnalin; LIN, Yen-Han; PENG, Ding-Yu. Metabolic heat evolution of *Saccharomyces cerevisiae* grown under very-high-gravity conditions. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 11, p. 1253-1258, 2008.

THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Practical and theoretical considerations in the production of high concentrations of alcohol by fermentation. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 4, p. 321-331, 1996.

THOMAS, Kolothumannil C.; INGLEDEW, W. M. Fuel alcohol production: effects of free amino nitrogen on fermentation of very-high-gravity wheat mashes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, n. 7, p. 2046-2050, 1990.

TOSETTO, Gisele Mantei. Influência da matéria-prima no comportamento cinético de levedura na produção de etanol. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 2002.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE. AÇÚCAR (UNICA). Potencial e Desafios para o Crescimento do Setor Sucroenergético Eduardo Leão. **Relatório anual**. São Paulo, 2012.

VOET, Donald; VOET, Judith G.; PRATT, Charlotte W. **Fundamentos de Bioquímica-: A Vida em Nível Molecular**. Artmed Editora, 2014.

WANG, Feng-Sheng; SHEU, Jyh-Woei. Multiobjective parameter estimation problems of fermentation processes using a high ethanol tolerance yeast. **Chemical Engineering Science**, v. 55, n. 18, p. 3685-3695, 2000.

WHEALS, Alan E. et al. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in biotechnology**, v. 17, n. 12, p. 482-487, 1999.

## ANEXO

## Código de simulação

**#Bibliotecas utilizadas**

```
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
from scipy.integrate import odeint
```

**# Constantes fenomenológicas**

```
umax = 0.38
Ks = 4.1
Ki = 0.0043
Pmax = 115.1
n = 1.5
Xmax = 68.1
m = 1.0
Ypx = 6.6
Yx = 0.066
```

**#Condições operacionais**

```
V_dorna = 5.0
Sf = 280.0/0.7
te = 8.0
Vazao = 3.5/te
Vi = 3.0
```

**#Modelagem matemática do processo em batelada alimentada**

```
def dUdt(U, t):
    X, S, P, V = U
    rx = X*(umax*S/(Ks+S))*np.exp(-Ki*S)*((1-P/Pmax)**n)*(1-X/Xmax)**m
    if V<=V_dorna:
        F = Vazao
    else:
        F = 0.0
    dV = F
    dX = rx - X*dV/V
    dS = -(rx/Yx)+(Sf-S)*dV/V
    dP = rx*Ypx - P*dV/V
    return (dX, dS, dP, dV)
```

```
t_span = np.linspace(0, 15, 100)
```

**#Condições iniciais**

```
X0 = 50.0
P0 = 0.0
S0 = 0.0
V0 = 1.5
Uzero = [X0, S0, P0, V0]
```

**#Resolução numérica e geração dos gráficos**

```
solucao = odeint(dUdt, Uzero, t_span)
plt.plot(t_span, solucao[:, 0], label='X');
plt.plot(t_span, solucao[:, 1], label='S');
plt.plot(t_span, solucao[:, 2], label='P');
plt.plot(t_span, solucao[:, 3], label='V');
plt.legend(); plt.xlabel('time'); plt.savefig('300-8.png', format='png', dpi=200)
```