



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR
CENTRO REGIONAL DE CIÊNCIAS NUCLEARES DO NORDESTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS ENERGÉTICAS E
NUCLEARES

AMANDA ALVES DA SILVA DOS SANTOS

**PRODUÇÃO DE ETANOL POR FERMENTAÇÃO VHG EM BATELADA
ALIMENTADA COM MISTURAS DE CALDO DE SORGO SACARINO E
MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Recife
2023

AMANDA ALVES DA SILVA DOS SANTOS

**PRODUÇÃO DE ETANOL POR FERMENTAÇÃO VHG EM BATELADA
ALIMENTADA COM MISTURAS DE CALDO DE SORGO SACARINO E
MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Tecnologias Energéticas e Nucleares
da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial
para obtenção do título de mestra em
Tecnologias Energéticas e Nucleares

Área de concentração: Fontes
Renováveis de Energia

Orientador: Prof. Dr. Emmanuel Damilano Dutra

Coorientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Silveira Sonogo

Recife

2023

Catálogo na fonte

Bibliotecário Gabriel Luz, CRB-4 / 2222

S237p

Santos, Amanda Alves da Silva dos.

Produção de etanol por fermentação VHG em batelada alimentada com misturas de caldo de sorgo sacarino e melaço de cana-de-açúcar / Amanda Alves da Silva dos Santos, 2023.

72 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Emmanuel Damilano Dutra.

Coorientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Silveira Sonogo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares. Recife, 2023.

Inclui referências.

1. Tecnologias Energéticas e Nucleares. 2. Fermentação VHG. 3. Sorgo sacarino. 4. Biocombustíveis. 5. Etanol. I. Dutra, Emmanuel Damilano (Orientador). II. Sonogo, Jorge Luiz Silveira (Coorientador). III. Título.

UFPE

621.042 CDD (22. ed.)

BCTG / 2023 - 263

AMANDA ALVES DA SILVA DOS SANTOS

**PRODUÇÃO DE ETANOL POR FERMENTAÇÃO VHG EM BATELADA
ALIMENTADA COM MISTURAS DE CALDO DE SORGO SACARINO E
MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Tecnologias Energéticas e Nucleares
da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial
para obtenção do título de mestra em
Tecnologias Energéticas e Nucleares
Área de concentração: Fontes
Renováveis de Energia

Aprovado em: 26/09/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Kaio César da Silva Rodrigues (Examinador Externo)
Universidade Federal do Oeste da Bahia - UFOB

Dra. Paula Katharina Nogueira da Silva (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Darlisson de Alexandria Santos (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser meu refúgio e minha fortaleza.

Aos meus familiares e amigos, pelo apoio incondicional e que, mesmo de longe me incentivaram e me fortaleceram para continuar nessa jornada.

Aos meus orientadores e demais professores, pelos ensinamentos, pela paciência, pelos conselhos e por acreditarem em mim ao longo do curso.

Aos meus colegas do Departamento de Energia Nuclear e do Departamento de Antibióticos da UFPE, em especial à Tayane, William, Renan, Karol e Pedro pelos momentos de descontração e pelo auxílio prestado durante esses dois anos.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro generosamente concedido para que eu pudesse desempenhar minha pesquisa.

Enjoy the butterflies.
Enjoy being naive.
Enjoy the nerves.
The pressure
The people not knowing your name.
Because that's part of it
If you want to stand on the top from day one, then there's nothing else
to look forward to
Enjoy the process of making a name for yourself.
(RICCIARDO, 2021)

RESUMO

Com um movimento global visando a descarbonização das matrizes energéticas, a busca por alternativas para produção de energia limpa tem ganhado força. No Brasil, a biomassa de cana-de-açúcar é responsável pela maior porcentagem de energia renovável produzida na matriz energética do país. Porém, a indústria sucroalcooleira encontra desafios, como os períodos de entressafra da cana, onde sua atividade é reduzida por falta de matéria-prima; bem como o volume de vinhaça produzido por litro de etanol. Visando oferecer alternativas para tais desafios, o presente trabalho propõe o uso da fermentação em Altíssima Gravidade (do inglês, *Very High Gravity*, ou VHG) em batelada alimentada, com o emprego de melaço de cana e caldo de sorgo sacarino para a produção de etanol. Foi avaliado o desempenho fermentativo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes composições de mosto (mistura de melaço e caldo de sorgo, caldo de sorgo, melaço diluído em água destilada e meio sintético similar ao melaço) e em diferentes condições de gravidade (normal e VHG). Também foi avaliado o limite de produção máxima de etanol, a fim de avaliar a inibição por produto durante uma fermentação com mistura de melaço e caldo de sorgo, à 30 °C. A inibição foi observada às 40 horas de fermentação, onde a concentração de etanol era de 122,21 g/L. O desempenho em fermentação VHG em batelada alimentada foi observado com diferentes tempos de alimentação (9 e 11 horas) e diferentes concentrações iniciais de inóculo (50 e 130 g/L) a fim de observar os melhores parâmetros para o uso do mosto. A melhor condição foi observada na fermentação com 11 horas de alimentação e 50 g/L de células no inóculo, produzindo 115,19 g/L de etanol. Por último, foi realizada uma fermentação combinando o tempo de alimentação de 11 horas e um inóculo de alta densidade celular. Foram obtidos 122,35 g/L de etanol em 30 horas, alcançando assim o valor máximo de produção de etanol. Os resultados indicam que a associação do caldo de sorgo ao melaço não resultou em grandes ganhos em desempenho fermentativo, porém as variáveis tempo de alimentação e densidade celular do inóculo mostraram exercer grande influência no alcance do valor máximo de etanol.

Palavras-chave: fermentação VHG; sorgo sacarino; biocombustíveis; etanol.

ABSTRACT

With a global movement aiming for the decarbonization of all energy matrices, the search for alternatives for producing clean energy has increased. In Brazil, sugarcane biomass is responsible for the biggest share of renewable energy produced in the country's energy matrix. However, the sugarcane ethanol industries face challenges such as the sugarcane off-season, where their activities are reduced for lack of feedstock; and the high volumes of vinasse produced for liter of ethanol produced. Aiming to offer such alternatives, the present work proposes the use of a fed-batch very high gravity fermentation system, as well as a must consisting of sugarcane molasses and sweet sorghum juice for ethanol production. The fermentative performance of *Saccharomyces cerevisiae* in different must compositions (sweet sorghum juice and sugarcane molasses blend, sweet sorghum juice, sugarcane molasses diluted in distilled water and a synthetic medium similar to sugarcane molasses) was evaluated under different gravity conditions (normal, high, and very high gravity). The maximum ethanol production was also evaluated, to observe product inhibition during a fermentation with the sweet sorghum juice-molasses blend, at 30 °C of temperature. Production inhibition was observed at 40 hours, where ethanol concentration was 122,35 g/L. VHGF fed-batch fermentation was evaluated with different feeding times (9 and 11 hours) and different cell density inoculums (50 and 130 g/L) in order to observe the best parameters for a fermentation with the blended must. The best condition observed was with 11 hours of feeding and 50 g/L inoculum, yielding 115 g/L of ethanol. Lastly, a fermentation was conducted with a 11-hour feeding time and a high cell density inoculum. In 30 hours, it was obtained 122 g/L of ethanol, reaching the maximum ethanol concentration. Results indicate that associating sweet sorghum juice with molasses increase fermentative performance and continuous feeding result in higher ethanol under VHGF conditions.

Keywords: VHGF fermentation; sweet sorghum; biofuels; ethanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Esquema da fermentação contínua.....	22
Figura 2 –	Esquema da fermentação em batelada alimentada	23
Figura 3 –	Esquema representativo de uma Câmara de Neubauer com destaque em cinza nas áreas de contagem	37
Figura 4 –	Esquema representativo da operação do biorreator	45
Figura 5 –	Gráfico de consumo de açúcares, produção de etanol, glicerol e de viabilidade celular durante fermentação em VHG com alimentação em pulsos.....	55
Figura 6 –	Consumo de açúcares redutores e produção de etanol durante fermentações em VHG em regime de batelada alimentada contínua, com diferentes tempos de alimentação e concentrações iniciais de células. a) Condição R1; b) Condição R2; c) Condição R3.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Concentração de ART do melaço de cana e dos caldos de sorgo sacarino utilizados no trabalho.	35
Tabela 2 –	Caracterização de teor de umidade e de viabilidade celular das leveduras liofilizadas provenientes de pacotes recém-abertos	36
Tabela 3 –	Composição dos meios de cultivos usados na avaliação de desempenho fermentativo em gravidade normal	42
Tabela 4 –	Composição dos meios de fermentação usados na avaliação de desempenho fermentativo em diferentes composições de mosto e em condições de VHG	43
Tabela 5 –	Concentração de Açúcares Redutores Totais de cada mosto utilizado nos ensaios de Avaliação da influência da concentração celular no acúmulo de açúcares durante uma fermentação VHG em batelada alimentada	46
Tabela 6 –	Resultados e parâmetros fermentativos da avaliação de desempenho fermentativo da levedura <i>S. cerevisiae</i> em diferentes composições de mosto.....	47
Tabela 7 –	Resultados de viabilidade e concentração celular iniciais e finais da avaliação de desempenho fermentativo da levedura <i>S. cerevisiae</i> em diferentes composições de mosto	49
Tabela 8 –	Resultados e parâmetros fermentativos da avaliação de desempenho fermentativo da levedura <i>S. cerevisiae</i> em diferentes composições de mosto e em condições de VHG ..	51
Tabela 9 –	Resultados de viabilidade e concentração celular iniciais e finais da avaliação de desempenho fermentativo da levedura <i>S. cerevisiae</i> em VHG.....	53
Tabela 10 –	Resultados e parâmetros fermentativos da avaliação da influência da concentração celular no acúmulo de açúcares durante fermentação VHG em batelada alimentada	57

Tabela 11 –	Resultados de viabilidade e concentração celular iniciais e finais de fermentações em VHG em regime de batelada alimentada contínua, com diferentes tempos de alimentação e concentrações iniciais de células	59
Tabela 12 –	Resultados e parâmetros fermentativos da avaliação da influência da concentração celular no acúmulo de açúcares durante a avaliação da influência da associação de alta densidade celular e do tempo de fermentação no desempenho de fermentação VHG em batelada alimentada	62
Tabela 13 –	Resultados de viabilidade e concentração celular iniciais e finais da avaliação da influência da associação de alta densidade celular e do tempo de fermentação no desempenho de fermentação VHG em batelada alimentada	63

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	16
2.1.	OBJETIVO GERAL	16
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3	REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1.	BIOMASSA PARA A PRODUÇÃO DE ENERGIA	17
3.1.1.	Cana-de-açúcar	18
3.1.2.	Melaço de Cana.....	19
3.1.3.	Potencial do sorgo sacarino para a produção de etanol	20
3.2.	PRODUÇÃO DE ETANOL NO BRASIL.....	21
3.2.1.	Classificação dos modelos fermentativos	21
3.2.2.	Caracterização do modelo brasileiro	24
3.2.3.	Seleção de leveduras	25
3.3.	FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA CONVENCIONAL E FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM ALTÍSSIMA GRAVIDADE (VHG).....	26
3.3.1.	Fermentação alcoólica convencional	26
3.3.2.	Fermentação em Altíssima Gravidade (VHG)	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1.	MATERIAIS	35
4.1.1.	Caldo de sorgo sacarino e melaço de cana-de-açúcar	35
4.1.2.	Levedura.....	35
4.2.	METODOLOGIA ANALÍTICA.....	36
4.2.1.	Determinação de viabilidade celular	36
4.2.2.	Determinação de concentração celular	37
4.2.3.	Análise de Carboidratos, Etanol e Glicerol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	38
4.2.4.	Determinação de teor de umidade	39
4.2.5.	Cálculo de parâmetros fermentativos.....	39
4.3.	ENSAIOS FERMENTATIVOS	41

4.3.1. Ensaios de desempenho fermentativo em diferentes composições de mosto	41
4.3.2. Ensaio de capacidade fermentativa e tolerância à etanol	44
4.3.3. Avaliação da influência das condições densidade celular e tempo de alimentação uma fermentação VHG em batelada alimentada	44
4.3.4. Validação da fermentação em VHG com alta densidade celular e tempo de alimentação de 11 horas	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO FERMENTATIVO DA LEVEDURA <i>S. cerevisiae</i> EM DIFERENTES COMPOSIÇÕES DE MOSTO	47
5.2. AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO FERMENTATIVO DA LEVEDURA <i>S. cerevisiae</i> EM DIFERENTES COMPOSIÇÕES DE MOSTO E EM CONDIÇÕES DE HG E VHG	50
5.3. ENSAIOS DE TOLERÂNCIA AO ETANOL POR FERMENTAÇÃO VHG EM REGIME DE BATELADA ALIMENTADA EM PULSOS	54
5.4. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DENSIDADE CELULAR E TEMPO DE ALIMENTAÇÃO UMA FERMENTAÇÃO VHG EM BATELADA ALIMENTADA	56
5.5. VALIDAÇÃO DA FERMENTAÇÃO EM VHG COM ALTA DENSIDADE CELULAR E TEMPO DE ALIMENTAÇÃO DE 11 HORAS	62
6 CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

Combustíveis fósseis ainda dominam o cenário de geração e consumo de energia no mundo. Porém, com o mundo se comprometendo cada vez mais com a descarbonização de sua matriz energética em esforços para mitigar os efeitos já visíveis do aquecimento global, buscam-se novas alternativas de geração de energia para que a transição energética de fontes fósseis para fontes renováveis seja possível.

Nesse cenário, a energia proveniente de biomassa tem se mostrado uma das mais fortes aliadas da transição energética. Biomassa é todo material orgânico produzido por organismos vivos (TAO *et al.*, 2022). A variedade de tecnologias disponíveis para a geração de energia a partir de diversos tipos de biomassa, assim como a redução nas emissões de gases nocivos fazem com que a bioenergia apresente resultados promissores. Atualmente, 6% da oferta energética no mundo é composta de energia proveniente de biomassa (IEA, 2022).

No contexto brasileiro, de acordo com o Balanço Energético Nacional, a oferta interna de energia apresentou uma repartição de 52,6% de fontes não renováveis em sua oferta interna de energia contra 47,4% de fontes renováveis. A biomassa de cana-de-açúcar obteve a maior participação dentre as fontes renováveis, compondo 15,4% da matriz energética nacional, ofertando 46,7 milhões de toneladas equivalentes de petróleo (Mtep) de energia. O consumo total de energia proveniente do etanol constitui 5,8% de toda a oferta (EPE, 2023). No período de 2022/2023, a safra de cana-de-açúcar espera um rendimento de 31,3 bilhões de litros de etanol, sendo 27,37 bilhões de litros provenientes da cana-de-açúcar (BRASIL, 2023).

Porém a produção sucroenergética encontra dificuldades de manter sua produtividade durante todo o ano. Os períodos de entressafra da cana-de-açúcar limitam a produção de etanol a um período de 6 a 8 meses por ano, significando que de 4 a 6 meses do ano as usinas sucroalcooleiras não produzem etanol (AMORIM *et al.*, 2011). Com isso, surge a possibilidade da utilização do sorgo sacarino (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) como cultura adjacente ao cultivo da cana para a produção de etanol.

O sorgo, assim como a cana-de-açúcar, é uma planta cuja fotossíntese ocorre pela via C₄, conferindo alta eficiência na conversão de CO₂ atmosférico e água em carboidratos (LOPES *et al.*, 2016). Além disso, ele é resistente a períodos de seca e calor, e pode ser cultivado em diversos tipos de solo. Seu tempo de crescimento é de 3 a 5 meses, período suficiente para complementar a produção agrícola durante as entressafras ou em terrenos adjacentes às áreas de cultivo da cana-de-açúcar (BARCELOS *et al.*, 2016).

Outro desafio encontrado pelas usinas sucroalcooleiras é o volume de vinhaça produzido. Ao final do processo de fermentação, o vinho é destilado para a obtenção do álcool, obtendo a vinhaça como resíduo. O grande volume do resíduo (vinhaça) gerado é motivo de preocupação na indústria pois o líquido residual é rico em componentes potencialmente perigosos, o que dificulta seu aproveitamento em outras áreas da cadeia de produção sucroalcooleira (CHRISTOFOLETTI *et al.*, 2013).

Assim, uma alternativa para diminuir o volume de vinhaça gerado seria aumentar a concentração de etanol no vinho fermentado. A técnica de fermentação em altíssima gravidade (da sigla em inglês, VHG) consiste na utilização de um meio contendo 250 g/L ou mais de açúcares e tem se mostrado promissora na produção de etanol não apenas por alcançar níveis de etanol mais altos no vinho a cada fermentação (cerca de 15% v/v), mas também por reduzir o consumo de água e energia, e minimizar os riscos de contaminação bacteriana, tudo isso sem a necessidade de um volume maior de matéria-prima, água ou equipamentos especiais (DEESUTH *et al.*, 2015; THANGPROMPAN *et al.*, 2013).

Diversos estudos têm sido conduzidos sobre a técnica de fermentação em VHG, a fim de melhor aplicá-la e obter os melhores resultados possíveis. Os estudos avaliam diferentes áreas da fermentação, como a influência de parâmetros como temperatura e densidade celular; a composição do substrato utilizado; suplementação de nutrientes; o desempenho de diferentes leveduras; e até a associação de diferentes processos (BARBOSA *et al.*, 2016; KŁOSOWSKI; MIKULSKI, 2018; PHUKOETPHIM *et al.*, 2019; SONEGO *et al.*, 2016; VELOSO *et al.*, 2022). Um estudo de Laopaiboon *et al.*, (2009) avaliou a

diferença na eficiência fermentativa entre mostos compostos de caldo de sorgo sacarino suplementado com sacarose e melaço de cana em fermentação VHG. Foi observado que entre as condições, o caldo de sorgo com sacarose obteve uma concentração maior de etanol ($120,68 \pm 0,54$ g/L) que a condição de caldo de sorgo com melaço ($109,34 \pm 0,78$ g/L) com a mesma suplementação de nitrogênio e na mesma faixa de concentração (LAOPAIBOON, L. *et al.*, 2009).

O presente trabalho tem o objetivo de avaliar as condições operacionais da produção de etanol de primeira geração por fermentação VHG em batelada alimentada empregando um mosto formado por sorgo sacarino e melaço de cana, avaliando a influência da associação desses dois substratos no desempenho da fermentação, bem como avaliar as influências de parâmetros como concentração de açúcares redutores totais, concentração celular e tempo de alimentação para a fermentação em batelada alimentada em condições de alta gravidade.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a fermentação alcoólica em VHG empregando mistura de caldo de sorgo sacarino e melaço de caldo-de-cana em regimes de batelada e de batelada alimentada, avaliando a influência de parâmetros como tempo de alimentação, concentração celular e concentração de açúcares.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Observar a influência das diferentes proporções de melaço e sorgo no mosto no desempenho das fermentações, em condições de gravidade normal, alta e altíssima;
- Quantificar a produção máxima de etanol a partir da mistura de caldo de sorgo e melaço em condições de altíssima gravidade com alimentação em pulsos;
- Avaliar a influência de diferentes condições de concentração celular e tempo de alimentação no desempenho de uma fermentação em altíssima gravidade.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1. BIOMASSA PARA A PRODUÇÃO DE ENERGIA

Desde a assinatura do Acordo de Paris, durante a Conferência das Nações Unidas sobre as Mudanças Climáticas em 2015, o compromisso com a contenção dos impactos das mudanças climáticas causadas pelo aquecimento global foi formalizado. O documento desafiou seus 196 signatários a “conter o aumento da temperatura média global”, visando a faixa dos níveis registrados no período pré-industrial (ONU, 2015). Com isso, surgiram demandas para novas formas de se produzir e consumir energia, bem como estabeleceram-se prazos para com que essas mudanças aconteçam.

Porém a transição de uma matriz energética dependente de combustíveis fósseis para fontes de energia menos poluentes e sustentáveis não é um processo objetivo e exige mudanças que vão além do desenvolvimento de novas tecnologias energéticas. Uma transição energética para uma produção sustentável de energia passa primeiramente por decisões que levem em consideração não só os impactos ambientais, mas também por impactos sociais e a análise cuidadosa de riscos e benefícios para todas as partes envolvidas no processo (CHEN *et al.*, 2019).

A energia proveniente de biomassa tem sido uma grande aliada nos esforços em prol da descarbonização da matriz energética ao redor do mundo. Além de emitir menos poluentes, o uso da biomassa oferece a possibilidade de armazenamento para a produção de energia em demanda, bem como a versatilidade de produzir energia em forma de calor, eletricidade e combustível através de uma única matéria-prima.

Entretanto ainda existem alguns obstáculos para a adesão total da biomassa no cenário de produção energia, que envolvem principalmente o uso de grandes áreas de terra cultivável e a prática de monocultura em larga escala por parte das indústrias de bioenergia (BAASCH, 2021; OECD/IEA; IRENA, 2017). Contudo, avanços tecnológicos no processamento de biomassa vêm tornando a bioenergia cada vez mais em destaque na transição energética de combustíveis fósseis para fontes renováveis.

As tecnologias de conversão de biomassa vêm a cada dia sendo mais aperfeiçoadas visando não somente a produção de energia em larga escala, mas também a integração com outras tecnologias a fim de processar resíduos e subprodutos de uma única matéria-prima, diversificando também os tipos de energia produzidos em uma única planta (TAO *et al.*, 2022).

3.1.1. Cana-de-açúcar

No Brasil, a cana-de-açúcar é a biomassa com maior representação na matriz energética nacional, que é responsável por cerca de 16% de toda a oferta interna de energia. Além dela, outras biomassas têm mostrado uma participação significativa, como o capim-elefante, casca de arroz, e óleos vegetais (EPE, 2022). O clima tropical brasileiro, principalmente na região sudeste, favorece a maturação fisiológica da cana-de-açúcar, ponto em que os colmos da cana atingem o acúmulo máximo de sacarose. Essa maturação tem início nos meses de abril/maio e atinge seu ápice no mês de agosto, que é o período que a indústria sucroalcooleira tem sua atividade máxima. (TOPPA, EDER VICTOR BRAGANTI; JADOSKI, CLEBER JUNIOR; JULIANETTI, ALESSANDRA; HULSHOF, TARCISIO; ONO, ELIZABETH ORIKA; RODRIGUES, 2010). Durante a safra 2022/2023, estima-se uma produção de 610,1 milhões de toneladas de cana em todo o território nacional, que é processada nas usinas gerando diferentes produtos, sendo os principais o açúcar e o etanol (BRASIL, 2021, 2022). Porém a sazonalidade da cana-de-açúcar também representa um desafio para o setor sucroalcooleiro nacional. A safra da cana dura de 6 a 8 meses, o que significa que é possível realizar apenas uma colheita por ano. Somado a isso, não é possível armazenar a cana colhida ou seu caldo para manter as usinas funcionando durante os 4 a 6 meses de entressafra por conta de seu alto teor de açúcares fermentescíveis, que se estragam facilmente (AMORIM *et al.*, 2011). Com isso, a produção de etanol fica parada e eleva os preços do etanol em todo o país (OLIVEIRA, 2012). Diante deste cenário, o desafio das destilarias tem sido encontrar alternativas para prolongar o período produtivo entre as safras da cana-de-açúcar.

3.1.2. Melaço de cana

O melaço é o principal subproduto da produção de açúcar a partir da cana-de-açúcar, um líquido viscoso e escuro composto por sacarose (25 a 35%), glicose e frutose (20 a 35%), além de nutrientes e ácidos orgânicos (CAMARGOS *et al.*, 2021). Por tonelada de cana processada são produzidos cerca de 40 a 60 quilogramas de melaço durante o processo de cristalização do açúcar (FILHO; ANDRADE, 2013). Sendo assim, uma das alternativas para prolongar o período de atividade das usinas no período da entressafra é o reaproveitamento do melaço de cana na produção de etanol, podendo ser adicionado ao caldo de cana ou diluído em água para ser usado como mosto para a fermentação (DELLA-BIANCA *et al.*, 2012; LOPES *et al.*, 2016).

Nas usinas sucroalcooleiras onde a cana-de-açúcar é processada de forma mista (ou seja, produzindo açúcar e etanol a partir da cana), o melaço é reaproveitado na produção de etanol. Levando em conta o período de entressafra da cana, parte do melaço resultante da produção de açúcar é misturado a caldo de cana-de-açúcar ou água e é usado para prolongar o período produtivo das usinas (FILHO; ANDRADE, 2013; MELLO; SANTOS, 2019).

A combinação de substratos também é estratégica para o melhoramento do substrato de fermentação. O acréscimo de melaço ao caldo suplementa a deficiência nutricional do caldo de cana, o que permite um melhor crescimento celular, e dilui compostos inibitórios presentes no melaço. Como resultado, obtêm-se concentrações de etanol de 8 a 11% (V/V) ao final de cada fermentação (BASSO *et al.*, 2008; DELLA-BIANCA *et al.*, 2012).

Por outro lado, a composição do melaço inclui sais e outros componentes que podem causar efeitos inibitórios nas leveduras. Algumas leveduras possuem uma preferência a substratos compostos somente por caldo de cana, como é o caso da linhagem JP-1 da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Por ter sido isolada de uma usina que não utiliza melaço na composição de seu substrato, a levedura apresenta um desempenho fermentativo menor quando comparada com outras linhagens industriais isoladas de usinas que adicionam melaço a seus substratos (DELLA-BIANCA; GOMBERT, 2013).

Por isso, ao combinar melaço e caldo de cana em um mosto para fermentação, é importante levar em consideração a composição do melaço, a

fim de evitar efeitos de estresse indesejados causados pela presença de compostos que são tóxicos para as leveduras (DELLA-BIANCA *et al.*, 2012).

3.1.3. Potencial do sorgo sacarino para a produção de etanol

Com características fisiológicas semelhantes às da cana-de-açúcar, o sorgo surge como uma alternativa de biomassa para incrementar as opções de matérias-primas para produção de etanol no Brasil, especialmente em regiões onde as condições climáticas são menos favoráveis para a plantação da cana.

Assim como a cana-de-açúcar, o sorgo também possui o ciclo fotossintético do tipo C4 que a confere uma alta eficiência no uso de água e na conversão de CO₂ em açúcares, fazendo com que seu caldo seja rico em açúcares fermentescíveis, cerca de 64% de sacarose, 22% de glicose e 14% de frutose (MENEZES, 2021). Além disso, o sorgo também oferece a possibilidade do aproveitamento completo da biomassa, pois sua composição é de aproximadamente 37% de caldo, 36% de bagaço, 19% de folhas e 8% de grãos. A produtividade aproximada de etanol a partir do caldo de sorgo é de 3451 L/ha, à depender das condições de cultivo e do cultivar usado (DUTRA *et al.*, 2018).

É uma cultura com tempo de crescimento entre 3 e 5 meses (BARCELOS *et. al.*, 2016) e de fácil adaptação em diferentes climas, sendo cultivado desde a América Central até a África e o Sul da Ásia. (AMORIM; BASSO; LOPES, 2009). Segundo o estudo de Dutra *et. al.*, (2018), que avaliou a influência de diferentes estágios de maturação em diferentes cultivares de sorgo sacarino cultivados na Zona da Mata do estado de Pernambuco, foi constatado que nos estágios de grão leitoso (70 dias após a emergência) e grão duro (85 dias após a emergência) não houve diferenças significativas no teor de sólidos solúveis presentes no caldo. Isso significa que para a produção de etanol a partir do caldo de sorgo, a colheita pode ser antecipada sem perdas no teor de açúcares fermentescíveis e, conseqüentemente, no volume final de etanol produzido (DUTRA *et al.*, 2018; TABOSA *et al.*, 2020).

Outra característica do sorgo é a tolerância aos efeitos do déficit hídrico, necessitando apenas de cerca de 1/3 da demanda de água da cana-de-açúcar e 1/2 da demanda de água do milho (DUTRA *et al.*, 2013). Considerando que na região nordeste do Brasil apenas uma área limitada recebe precipitação

suficiente para o cultivo da cana-de-açúcar sem a necessidade de irrigação, o sorgo se mostra uma opção atrativa para a produção de energia na região. Com objetivo de integrar do sorgo na produção de bioenergia no Brasil, esforços têm sido feitos por parte de instituições de pesquisa no âmbito do melhoramento genético de cultivares visando o aprimoramento do sorgo para sua inclusão da matriz energética nacional e para o cultivo em diferentes climas dentro do território nacional.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) desenvolve cultivares de sorgo para a produção de etanol em diferentes biomas no Brasil. O estudo de Fernandes et. al (2014), avaliou o potencial de quatro cultivares (BRS 506, BRS 508, BRS 509 e BRS 511) para a produção de etanol. O estudo mostrou que a variedade BRS 511 teve um período de uso industrial (PUI) de 44 dias, com um pico de açúcares totais em seu caldo de 191 g/L por volta de 110 dias após o plantio. Nos testes de fermentação, a variedade BRS 508 apresentou números mais próximos da cana-de-açúcar, com uma produtividade de 9,0 g/L.h e concentração de etanol de 72,3 g/L, contra 9,2 g/L.h e 73,2 g/L do ensaio com caldo de cana-de-açúcar.

Com um tempo de cultivo que preenche as lacunas na produção de bioenergia a partir da cana-de-açúcar e semelhanças na composição de açúcares que dispensam a adaptação das usinas para a sua incorporação, o sorgo tem sido reconhecido como uma das culturas promissoras para integrar a indústria de etanol brasileira, seja sozinha ou em associação com a cana-de-açúcar a fim de evitar a prática de monoculturas em grandes áreas. Contudo, a implementação do sorgo como uma biomassa de interesse industrial ainda enfrenta alguns desafios, como o melhoramento da produtividade por hectare, a viabilidade de produção a partir dos grãos de sorgo e o melhoramento de processos fermentativos a partir do caldo (TABOSA *et al.*, 2020).

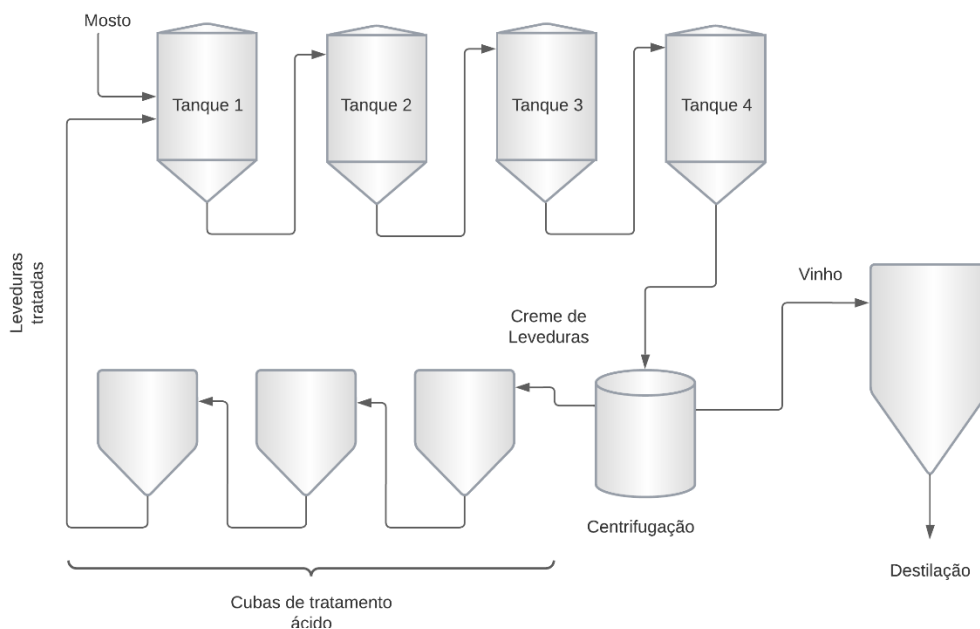
3.2. PRODUÇÃO DE ETANOL NO BRASIL

3.2.1. Classificação dos processos fermentativos

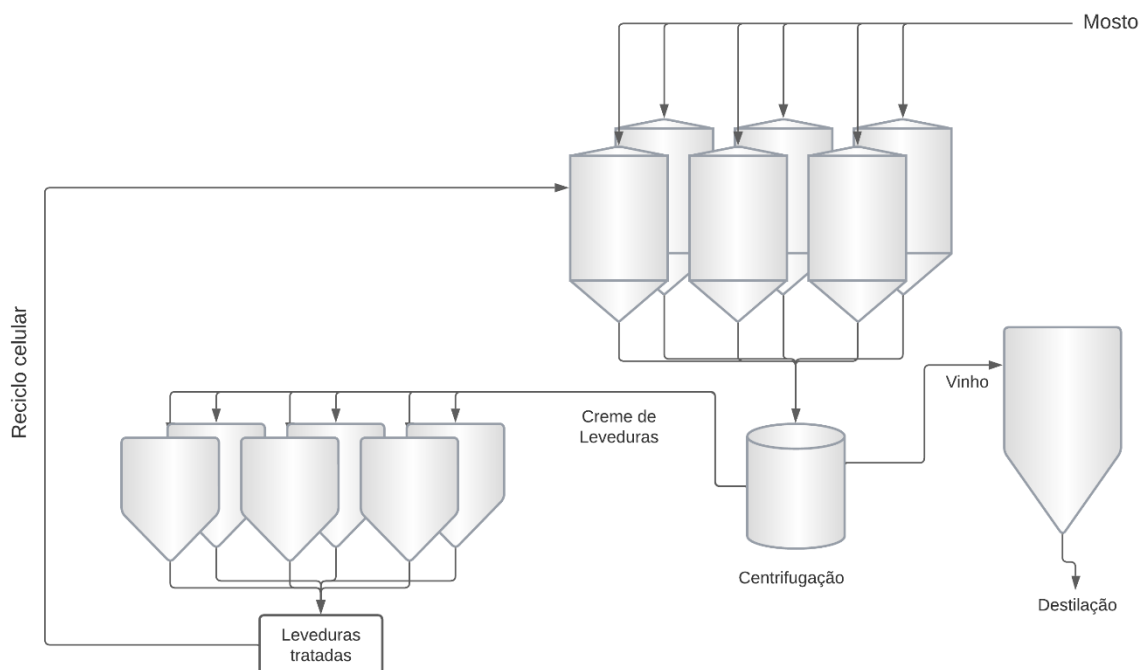
Para a produção de etanol de primeira geração existem diferentes processos fermentativos com características próprias, que conferem vantagens e desvantagens aos processos de cada usina. A classificação de uma fermentação leva em conta dois fatores: o modo de alimentação do meio para

as dornas e a retirada do produto ao final da fermentação. Na fermentação contínua (Figura 1), a alimentação das dornas e a retirada do mosto são contínuos e com a mesma vazão. Ou seja, o caldo é alimentado e retirado simultaneamente. Já no modelo de fermentação de batelada alimentada (Figura 2), o inóculo é adicionado às dornas e o mosto é posteriormente adicionado. Os produtos são retirados ao final da fermentação, bem como as células do inóculo, que são reaproveitadas para fermentações posteriores (ALMEIDA *et al.*, 2019).

Figura 1 – Esquema da fermentação contínua



Fonte: Autora (2022)

Figura 2 – Esquema da fermentação em batelada alimentada

Fonte: Autora (2022)

A principal vantagem da fermentação contínua é a redução de custos de instalação, automação e operação. Porém o processo possui uma maior propensão à contaminação, além de propiciar mais estresse sobre as leveduras e de apresentar rendimentos menores que os obtidos em processos descontínuos. A batelada alimentada, por sua vez, apresentam vantagem sobre as fermentações contínuas ao oferecer menor estresse sobre as leveduras, menor risco de contaminação e maiores rendimentos, chegando a valores de até 92,5%. A principal desvantagem, contudo, é o maior custo de instalação (GODOY *et al.*, 2008). No Brasil, cerca de 85% das destilarias usam a fermentação alimentada, contra 15% que usam o modo contínuo (AMORIM *et al.*, 2011).

3.2.2. Caracterização do modelo brasileiro

A maior parte das usinas sucroenergéticas utiliza o processo de fermentação em batelada alimentada no sistema em duas fases. A primeira fase inicia com cerca de 30% do volume de trabalho do reator sendo preenchido com o inóculo de levedura. A alta densidade celular é característica do processo brasileiro, com números entre 10 e 15% (massa/volume) de células no fermentador. Após isso, o mosto é adicionado gradualmente ao reator por um período de 4 a 6 horas. A alimentação gradual do meio tem por objetivo evitar com que a levedura sofra inibição ao ser exposta subitamente a uma quantidade grande de açúcares. O mosto geralmente é composto por combinações de caldo de cana-de-açúcar e melaço de cana que alcancem a concentração de açúcares redutores totais de 180 g/L (ou aproximadamente 20 °Brix) (GOMES *et al.*, 2021; SONEGO *et al.*, 2016).

A segunda fase tem início ao final da alimentação e dura até que o açúcar seja completamente consumido. A fermentação dura de 8 a 12 horas em seu ciclo completo, alcançando de 90 a 92% de rendimento e aproximadamente 11% (v/v) de etanol no vinho final (CAMARGOS *et al.*, 2021; MONTEIRO *et al.*, 2018). Ao final do processo, o meio fermentado é centrifugado para a separação das fases leve e pesada. A fase pesada, que é composta de 60 a 70% de células, é submetida a um tratamento com ácido para eliminar microrganismos contaminantes, remover ácidos orgânicos voláteis e evitar a floculação das células, o que pode interferir na produtividade e no tempo de fermentação. As células recicladas são utilizadas durante toda a safra anual (YAMAKAWA *et al.*, 2019). A fase leve é destilada para a separação do etanol, obtendo vinhaça como resíduo (REIS; HU, 2017). Apesar da evolução da produção ao longo dos anos com o desenvolvimento tecnológico das fermentações industriais, o teor alcoólico do vinho ainda é considerado baixo. Com isso, altos volumes de vinhaça são produzidos a cada fermentação (LOPES *et al.*, 2016).

3.2.3. Seleção de leveduras

A seleção das leveduras mais adequadas para o processo de fermentação é de grande importância na indústria, pois qualquer fator que possa atrasar ou dificultar qualquer uma das etapas da produção pode levar a prejuízo financeiro. Os ambientes das destilarias apresentam uma biodiversidade de microrganismos, que incluem diferentes linhagens de leveduras e bactérias, o que favorece a seleção de leveduras mais adaptadas aos processos envolvidos na produção de etanol.

Segundo Della-Bianca *et al.* (2013), a cultura inicial, geralmente formada por leveduras de panificação, é rapidamente substituída por leveduras selvagens, em um período de apenas 20 a 60 dias. Com isso, passou-se a isolar essas cepas contaminantes e a estudar o uso delas como parte da cultura inicial nas fermentações. Parte do processo de seleção dessas leveduras é identificar características e comportamentos indesejados durante a fermentação, como excesso de espuma e fermentações muito longas (BASSO *et al.*, 2008). Com isso, grande parte das leveduras usadas atualmente para a produção de etanol no país foram isoladas de destilarias brasileiras (ALMEIDA *et al.*, 2022).

As condições em fermentações de escala industrial são ajustadas visando o maior rendimento de etanol possível, o que propositalmente coloca as leveduras em condições limítrofes de estresse. A principal vantagem que a levedura da espécie *S. cerevisiae* oferece quando utilizada em fermentações alcoólicas é a sua tolerância a condições ambientais hostis, como baixo pH, escassez de oxigênio, altos níveis de etanol e ácidos orgânicos e até a falta de alguns nutrientes (ALBERGARIA; ARNEBORG, 2016). A tolerância a estas condições dão vantagem à *S. cerevisiae* pois além dela conseguir se manter viva e funcional durante as fermentações, ela também suporta o estresse do reciclo celular característico do processo brasileiro.

3.3. FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA CONVENCIONAL E FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM ALTÍSSIMA GRAVIDADE (VHG)

3.3.1. Fermentação alcoólica convencional

A fermentação alcoólica se dá pelo consumo dos açúcares fermentescíveis disponíveis para a levedura no meio de fermentação em que ela está inserida. Dentro da célula os açúcares passam por diversas reações no metabolismo da levedura até serem transformados em piruvato, gerando ATP durante o processo. A partir desta etapa, diferentes condições (físicas, químicas, microbiológicas) ditarão os produtos formados. Para obter-se etanol, a levedura precisa estar em condições de anaerobiose, ou seja, ausência de oxigênio. Desta forma, as moléculas de piruvato são descarboxiladas e formam CO₂ e acetaldeído. O acetaldeído é reduzido, produzindo NAD⁺ e etanol (CRUZ, 2016). Para a levedura, o metabolismo anaeróbico de açúcares gera energia para o funcionamento de seu metabolismo, bem como para seu crescimento e multiplicação. Assim sendo, o etanol e CO₂ produzidos pelas células nessas condições constituem apenas produtos de excreção, podendo também ser indicadores de uma boa atividade celular durante a fermentação (PACHECO, 2010).

O desempenho da levedura durante uma fermentação alcoólica em condições industriais depende do equilíbrio de diversos fatores, tanto condições ambientais (temperatura, pH), quanto a disponibilidade de nutrientes no meio, e até a cepa de levedura utilizada (PHUKOETPHIM *et al.*, 2017). Assim sendo, é necessário conhecer a influência de cada condição na atividade fermentativa das leveduras empregadas no processo e usá-las de modo a alcançar o melhor rendimento possível. Abaixo são discutidos alguns parâmetros que influenciam o desempenho das fermentações.

Temperatura

A temperatura é um dos principais fatores discutidos quando se busca otimizar o processo de fermentação. Isso se dá por que temperaturas muito elevadas aumentam a sensibilidade das células à toxicidade do etanol, resultando uma queda na viabilidade celular e, conseqüentemente, em menos etanol produzido (GLAZER; NIKAIDO, 2007; LIMA, 2008). Por sua vez,

temperaturas muito baixas podem desacelerar a atividade das leveduras, podendo resultar em uma produtividade menor (VELOSO *et al.*, 2022). Com isso, é de grande importância o conhecimento das temperaturas ótimas das leveduras empregadas nas fermentações.

Segundo o estudo de Aldiguier *et al.* (2004), que avaliou o efeito sinérgico entre temperatura e a concentração de etanol nas fermentações com leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, a faixa de 30°C a 33°C ofereceu os melhores desempenhos fermentativos, alcançando 120 g.L⁻¹ em 30 horas. O estudo ainda mostrou que a concentração máxima de etanol onde começa a ser observada queda na viabilidade celular variou em função das cinco temperaturas testadas. A 27°C, a concentração limítrofe era de 80 g/L, enquanto a 30 e 33°C, a concentração era de 100 g/L. Nas temperaturas mais altas, a concentração cai para 50 g/L a 36°C, e na temperatura de 39°C há queda logo nos primeiros momentos da fermentação (ALDIGUIER *et al.*, 2004). Para além da otimização de resultados, o conhecimento da faixa de temperatura ótima para as leveduras empregadas também é importante pois em fermentações de larga escala o controle de temperatura é difícil (ATALA *et al.*, 2001)

pH

No caso do pH, a faixa ideal para as leveduras é entre 4 e 5. Os valores dentro desta faixa são favoráveis para a levedura e, simultaneamente, inibem o desenvolvimento de microrganismos contaminantes (LIMA, 2008). Após a fermentação, as leveduras são tratadas com uma solução de ácido sulfúrico entre 2 e 3,2 de pH para reduzir o risco de contaminações, que podem atrapalhar a fermentação ao interferir nos rendimentos de etanol, levando a perdas na produção (GODOY *et al.*, 2008; PACHECO, 2010). Em um estudo de Della-Bianca e Gombert (2013), apenas apresentaram crescimento em meio de pH 2,5 as linhagens isoladas em usinas brasileiras (PE-2, BG-1 e JP-1) e a linhagem comercial usada em panificação, a qual é utilizada como cultura inicial em algumas usinas, mostrando a adaptação dessas leveduras ao reciclo celular.

Estresse osmótico

Nas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* a resposta ao estresse osmótico causado pela condição de altíssima gravidade é mediada pela via de glicerol de alta osmolaridade (no inglês, *high osmolarity pathway*, ou *HOG pathway*). Em um meio altamente concentrado em açúcares, as células tendem a perder água para o meio, levando a um encolhimento da célula e um desbalanço na concentração de íons no meio intracelular. Com isso, o papel da HOG é controlar a produção e acúmulo de glicerol dentro da célula. Glicerol é produzido para substituir o volume de água perdido e para proteger organelas e moléculas. Com seu acúmulo no citosol induz a captação de água por parte da célula, assim retornando a seu equilíbrio (HOHMANN, 2009).

Com o objetivo de contornar esses efeitos, a maior parte das destilarias adotaram o modelo de batelada alimentada para suas fermentações. Neste modelo, com a alimentação de substrato durante a fermentação, as concentrações de açúcares não excedem a faixa de 5 a 7% m/v (CARLOS; OLITTA; NITSCHKE, 2011). Desse modo as leveduras não são expostas à quantidade total de açúcares de uma única vez, reduzindo o estresse que elas sofrem durante a fermentação.

Estresse etanólico

Se tratando da inibição por etanol, quaisquer concentrações de etanol presentes no meio de fermentação afetam o desempenho das células de leveduras. Isso ocorre pois o etanol consegue adentrar as células e desestabilizar a estrutura da bicamada lipídica que forma as membranas celulares, fazendo com que as mesmas fiquem mais fluidas e que pequenas moléculas da célula comecem a vazar para o meio extracelular. O resultado é uma redução no consumo de açúcares e nutrientes, fazendo com que o desempenho fermentativo também caia e, eventualmente, toda atividade fermentativa seja inibida (GLAZER; NIKAIDO, 2007).

3.3.2. Fermentação em Altíssima Gravidade (VHG)

O conceito de fermentação em altíssima gravidade (ou VHG, do inglês *Very High Gravity*) surgiu na década de 1980 e consiste no uso de substratos contendo 250 g/L de açúcares redutores totais ou mais. Como resultado, as fermentações VHG geralmente apresentam 15% (v/v) de etanol, ultrapassando os 10 - 12% (v/v) normalmente obtidos em fermentações convencionais (PULIGUNDLA *et al.*, 2011). Além do aumento na concentração final de etanol, a técnica de fermentação em altíssima gravidade apresenta outras vantagens em relação às fermentações de gravidade normal. Por causa do substrato rico em açúcares, a fermentação VHG reduz os riscos de contaminação nas dornas de fermentação e oferece uma redução no uso de água em 58%. (APPIAH-NKANSAH *et al.*, 2018). Maiores teores de etanol também conferem vantagens, pois possibilitam a produção de um volume maior de etanol sem a necessidade de aumento no volume de mosto, nem de alterações na infraestrutura das plantas de produção de etanol. Com isso, também é gerado um menor volume de vinhaça, que é um resíduo obtido após a destilação do etanol. Em geral, há economia no uso de água e de energia, e é gerado um volume menor de efluentes (CAMARGOS *et al.*, 2021; GOMES *et al.*, 2021; PULIGUNDLA *et al.*, 2019).

Porém as mesmas condições também trazem alguns desafios para a aplicação da técnica. Os mesmos obstáculos enfrentados em fermentações em condições normais de gravidade têm seus efeitos amplificados em condições de alta gravidade. A pressão osmótica causada pelo alto teor de açúcares e a baixa quantidade de água disponível no substrato intensificam o estresse nas leveduras empregadas no processo, trazendo redução da atividade fermentativa e da viabilidade celular das mesmas (AUESUKAREE, 2017; PHUKOETPHIM *et al.*, 2019). Com isso, a atividade das leveduras fica mais lenta, levando a fermentações mais demoradas que as fermentações convencionais.

Sendo assim vêm sendo estudadas maneiras de contornar e/ou mitigar esses efeitos indesejados nas fermentações em gravidades mais altas. Suplementação do substrato com nutrientes, leveduras tolerantes à pressão osmótica e até o emprego de diferentes regimes de fermentação têm sido

alternativas para permitir que as fermentações nestas condições corram sem maiores problemas.

Suplementação de nutrientes e combinação de diferentes substratos

Com a aplicação da técnica de fermentação em VHG, surge uma maior demanda de atividade sobre as leveduras, que por sua vez também aumenta a necessidade por nutrientes para a manutenção de suas funções celulares (GLAZER; NIKAIDO, 2007). Mostos simples, ou seja, aqueles compostos de apenas um tipo de matéria-prima raramente serão capazes de suprir sozinhos todas as demandas nutricionais das leveduras em um processo de fermentação VHG que resulte em alta produtividade de etanol (KŁOSOWSKI; MIKULSKI, 2018). Sendo assim, a combinação de diferentes matérias-primas para a composição de substratos e a suplementação com nutrientes de baixo custo são opções para otimizar os substratos de forma que influenciem positivamente na condução de fermentações bem-sucedidas.

O uso de fontes de nitrogênio na suplementação de substratos apresenta vantagens significativas para a performance das fermentações de altíssima gravidade. Durante uma fermentação, a síntese de biomassa e de determinados subprodutos resulta na produção e acúmulo de NADH dentro da célula. Como a fermentação ocorre em condições de anaerobiose, a cadeia respiratória não funciona, fazendo com que o NADH acumulado seja reoxidado através da produção de glicerol. Além disso, a própria síntese de glicerol já forma NADH naturalmente (YUE *et al.*, 2012).

Segundo Albers *et. al*, (1996) a suplementação com fontes de nitrogênio reduz a formação desses agentes e, conseqüentemente, a formação de glicerol e mais etanol é produzido. Assim sendo, a suplementação com fontes de nitrogênio não só aumenta o rendimento de etanol, mas também diminui o rendimento de glicerol e de outros subprodutos, melhora a tolerância das leveduras ao etanol, e alivia os efeitos do estresse osmótico nas leveduras (PULIGUNDLA *et al.*, 2019; YUE *et al.*, 2012).

No estudo de Monteiro *et. al*, (2018) foram conduzidas fermentações simulando o processo tradicionalmente usado na indústria brasileira para avaliar a influência da suplementação com diferentes fontes de nitrogênio em fermentações com mostos contendo 25, 30 e 35 °Bx de açúcares e utilizando duas leveduras industriais distintas. O melhor desempenho foi observado na fermentação usando a levedura CAT-1, meio composto de caldo de cana-de-açúcar a 30 °Bx e 16 mM de ureia, que obteve 17% (V/V) de etanol e apenas 0,2% (V/V) de açúcares residuais. De acordo com os autores, a suplementação da ureia resultou em um ganho de 14% no rendimento da fermentação quando comparado com uma fermentação com as mesmas condições de levedura e açúcares, saindo de 79,76% para 91,32% de rendimento.

De forma semelhante, a combinação de diferentes tipos de biomassa é uma alternativa para se obter um substrato rico em nutrientes. Ainda que diferentes matérias-primas vegetais possuam em sua composição as substâncias necessárias para a manutenção das células de levedura durante a fermentação, as diferenças na proporção em que tais substâncias se apresentam e a disponibilidade de cada uma para as leveduras são fatores que podem causar uma deficiência no desempenho de fermentações, mesmo que realizadas com os mesmos parâmetros de temperatura, agitação (KŁOSOWSKI; MIKULSKI, 2018). Sendo assim, conhecendo a composição de diferentes biomassas é possível encontrar combinações que resultem em um substrato que atenda às necessidades nutricionais das leveduras durante o processo de fermentação.

Diferentes regimes de fermentação e os efeitos em Fermentações VHG

O uso de diferentes regimes de fermentação também é uma ferramenta para a otimização das fermentações em VHG. Enquanto fermentações em regime de batelada expõem as leveduras à toda a quantidade de açúcar de uma só vez, o que em condições de altas gravidades desencadeia inibição por substrato e resulta em um processo mais demorado, o regime de batelada alimentada tem sido uma alternativa para minimizar tais efeitos e garantir

concentrações de etanol acima de 14% (V/V), característicos das fermentações em VHG.

Além do menor acúmulo de açúcares dentro da dorna e dos altos valores de etanol, a batelada alimentada traz vantagens para a fermentação em VHG como menos açúcares residuais, um menor tempo de fermentação e um maior controle sobre o estado fisiológico das leveduras, especialmente no que diz respeito ao crescimento celular e, conseqüentemente, ao consumo de substrato. (BALTZ; DAVIES; DEMIAN, 2010). Quando associadas às vantagens oferecidas pela fermentação em VHG, além do maior volume de etanol, tem-se uma economia no pós-tratamento e uma menor geração de resíduos (vinhaça) ao final de cada fermentação.

Um estudo de Phukoetphim *et. al.*, (2017) avaliou o melhoramento da eficiência de fermentações de caldo de sorgo sacarino a partir de estratégias de suplementação e de diferentes regimes de alimentação, sob gravidades normal (160 g/L), alta (200 e 240 g/L) e altíssima (280 e 320 g/L). No estudo foram feitas fermentações em batelada, com alimentação em pulsos e constante. Das fermentações em batelada, o melhor resultado foi obtido da condição em VHG, com 280 g/L de açúcares iniciais, com concentração final de etanol de 112,5 g/L e produtividade de etanol de 1,56 g/L.h. As mesmas condições de substrato no regime de alimentação constante obtiveram 112,9 g/L de etanol final, porém uma produtividade de 2,35 g/L.h, um valor 51% mais alto que o da fermentação em batelada. Além disso, a viabilidade celular não apresentou grandes perdas (PHUKOETPHIM *et al.*, 2017). O trabalho evidencia a melhora na cinética de fermentação que a alimentação do mosto faz quando se trabalha com altas concentrações de açúcares. Mesmo que sejam obtidos volumes similares de etanol ao final, a alimentação traz a vantagem da manutenção da viabilidade das células ao final da fermentação, o que no contexto industrial brasileiro é importante devido as mesmas serem reutilizadas para as próximas fermentações.

Outro estudo, de Frohman e Mira de Orduña (2013), comparou a cinética de fermentações em regime de batelada e de batelada alimentada de um mosto contendo 343,3 g/L de açúcares. Na fermentação em batelada, o inóculo contendo 40 g/L de células foi adicionado em um frasco contendo 4 litros do

mosto de suco de uva suplementado com nutrientes e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_3$, enquanto a fermentação com alimentação foi iniciada com 80 mL de volume inicial de inóculo e foi alimentado com o mesmo mosto de forma que a concentração de açúcares dentro do frasco não ultrapassasse 50 g/L. Ambas as fermentações obtiveram valores similares de etanol, porém a alimentação de mosto não só reduziu o tempo de fermentação (de 666 para 543 horas), como também fez com que a taxa de formação de etanol fosse maior que a da fermentação em batelada ($0,55 \text{ g/L.h}^{-1}$ e $0,35 \text{ g/L.h}^{-1}$, respectivamente). Os autores atribuíram os melhores parâmetros obtidos ao fato de que a alimentação colaborou para que mais células se mantivessem vivas durante o processo, o que foi comprovado pela análise de viabilidade celular em citometria de fluxo (FROHMAN; MIRA DE ORDUÑA, 2013). Os resultados obtidos confirmam os achados do estudo citado anteriormente, de que a alimentação do mosto de fato colabora com a redução do estresse sobre as leveduras e proporciona uma melhor produtividade, o que ajuda na redução dos tempos de fermentação que já são naturalmente mais altos em fermentações de altas gravidades.

Porém em fermentações em laboratório raramente se reproduzem as condições presentes na indústria, principalmente no que diz respeito a presença de substâncias indesejadas no meio. Outra fonte de estresse conhecida em fermentações é a presença de compostos tóxicos, principalmente quando há melaço presente na composição do meio. Sendo assim, Cruz *et. al*, (2021) realizou um planejamento composto central para avaliar os efeitos de temperatura, concentração de substrato e concentração celular em uma fermentação VHG de uma mistura de caldo de cana-de-açúcar e melaço em batelada alimentada, condições similares as das indústrias sucroalcooleiras. A condição otimizada obtida a partir do planejamento foi de 27°C , 300 g/L de ART iniciais e de 15% (V/V) de células no inóculo. A validação do planejamento resultou em uma eficiência de 90%, onde todos os açúcares foram consumidos e resultaram em 135 g/L de etanol. Ao final das 30 horas de fermentação, a viabilidade celular estava em 92%, mostrando que não só foi obtido um alto rendimento de etanol, como também foi possível preservar a atividade das leveduras para fermentações futuras (CRUZ; RESENDE; RIBEIRO, 2021). Isso mostra que a alimentação de mosto associado à otimização de condições de

operação dos reatores também é eficaz mesmo quando substratos contendo substâncias tóxicas são empregados, ao permitir que sejam diluídos durante a fermentação, fazendo com que as leveduras tenham menos contato com esses compostos.

Com cada dia mais trabalhos comprovando a associação positiva do regime de batelada alimentada à técnica de fermentação em altíssima gravidade, surge a demanda por estudos aplicando a técnica com diferentes matérias-primas, a fim de oferecer alternativas para a produção de etanol com um menor custo e menor geração de resíduos a partir de diferentes fontes de biomassa. O presente trabalho se propõe a avaliar a influência da técnica de fermentação em batelada alimentada no desempenho de uma fermentação em VHG de misturas de caldo de sorgo e melaço de cana-de-açúcar.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

4.1.1. Caldo de sorgo sacarino e melaço de cana-de-açúcar

O caldo de sorgo sacarino da variedade IPA 467 foi obtido do Instituto Agrônomo de Pernambuco e oriundo de um experimento de cultivo de sorgo através do reuso de efluentes. O caldo foi armazenado em garrafas plásticas e congelado. Para o uso, alíquotas do caldo foram descongeladas e filtradas com uma peneira para retirar pedaços de folhas e bagaço. Depois, todo o caldo foi armazenado novamente em garrafas plásticas limpas, identificado e congelado novamente até uso.

O melaço de cana também foi obtido através de doação da usina Impacto Bioenergia Alagoas S/A, e foi armazenado em um tonel plástico com tampa, abrigado da luz e em temperatura ambiente.

Ambos foram analisados para a concentração de açúcares redutores totais através de cromatografia, conforme metodologia descrita no item 4.2.4. Os resultados para a caracterização de ART do melaço e dos caldos de sorgo utilizados no presente trabalho estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Concentração de ART do melaço de cana e dos caldos de sorgo sacarino utilizados no trabalho.

Substrato	C _{ART} (g/L)
Melaço	756,02
Caldo de Sorgo – amostra 1 (M1)	53,09
Caldo de Sorgo – amostra 2 (M2)	62,32
Caldo de Sorgo – amostra 3 (M3)	59,31

M1 = 1ª mistura de caldo de sorgo/ M2 = 2ª mistura de caldo de sorgo /M3 = 3ª mistura de caldo de sorgo/
Cart = Concentração de Açúcares Redutores Totais

Fonte: A autora (2023)

4.1.2. Levedura

A levedura utilizada em todas as fermentações foi uma linhagem comercial de *Saccharomyces cerevisiae* liofilizada da empresa AB Brasil

Indústria e Comércio de Alimentos Ltda, utilizada normalmente para panificação. Foram utilizados pacotes recém-abertos para a caracterização quanto ao teor de umidade a fim de evitar perdas de massa nos experimentos; e quanto a viabilidade celular, conforme metodologias descritas no item 4.2. Os resultados teor de umidade e de viabilidade celular da levedura liofilizada estão descritos na Tabela 2. O teor de umidade obtido é condizente com o valor máximo de umidade permitido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para a categoria de fermentos biológicos secos, que é de 12% (BRASIL, 2023). Sendo assim, todos os experimentos do presente trabalho tiveram seus valores de massa seca de células corrigidos para que o teor de umidade não interferisse na concentração celular.

Tabela 2 – Caracterização de teor de umidade e de viabilidade celular das leveduras liofilizadas provenientes de pacotes recém-abertos.

W (%)	V ₀ (%)
5,18 ± 1,26	80,83 ± 7,63

W = teor de umidade / V₀ = viabilidade celular inicial

Fonte: A autora (2023)

4.2. METODOLOGIAS ANALÍTICAS

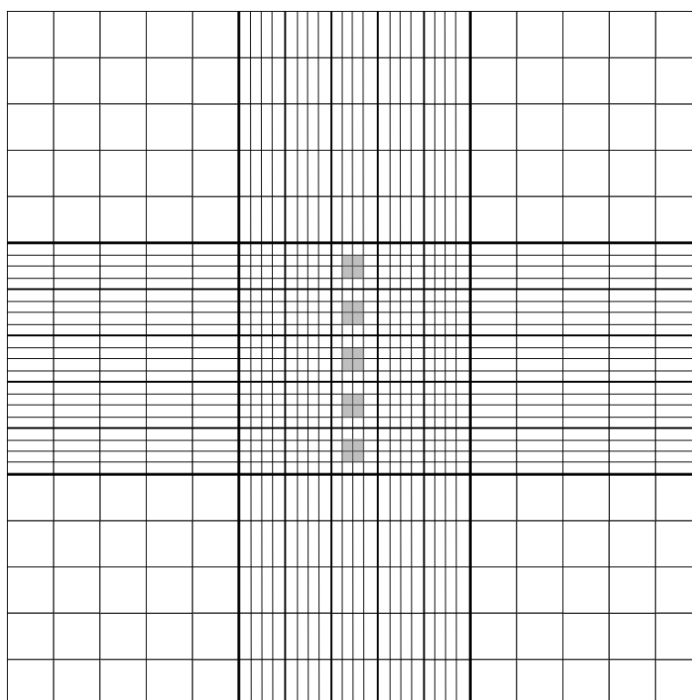
4.2.1. Determinação de viabilidade celular

A viabilidade celular das leveduras foi determinada através de contagem em uma Câmara de Neubauer, em metodologia adaptada de Pereira *et. al*, (2012). Em um tubo de ensaio foram adicionados 1 mL de água destilada, 1 mL de corante azul de metileno e 50 µL da suspensão celular. A mistura foi homogeneizada em um agitador de tubos por 30 segundos e deixada para descansar por 5 minutos. Após o descanso, a mistura foi pipetada na superfície da Câmara de Neubauer até cobrir os quadrantes de contagem em ambos os lados.

A contagem das células foi feita apenas das células presentes nos 4 quadrantes centrais da coluna do meio, conforme ilustrado na Figura 3. O cálculo da porcentagem de viabilidade celular foi feito através da Equação 1.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{n^{\circ} \text{ de células vivas}}{n^{\circ} \text{ total de células}} * 100 \quad (1)$$

Figura 3 – Esquema representativo de uma Câmara de Neubauer com destaque em cinza nas áreas de contagem



Fonte: Autora (2023)

4.2.2. Determinação de concentração celular

A determinação de concentração celular foi realizada através da metodologia de determinação do teor de massa seca. Amostras retiradas das fermentações (2 mL para fermentações em frascos e 5 mL para fermentações em biorreator) foram transferidas para tubos limpos, secos e previamente pesados em balança analítica.

Os tubos foram colocados em uma centrífuga da marca Hettich Zentrifugen Rotina 420R e centrifugados por 10 minutos a 4500 rpm, na temperatura de 4 °C. O sobrenadante era transferido para outro tubo limpo e seco, e depois congelado para posterior quantificação de carboidratos e produtos, conforme descritos nos itens 4.2.3 e 4.2.4.

O tubo contendo a massa de células foi preenchido com água destilada até o volume da amostra, tampado, homogeneizado e submetido a mais um ciclo de centrifugação. A lavagem do creme de células era repetido até obter-se um sobrenadante translúcido e incolor. Após a lavagem, o líquido era descartado e

o tubo era acomodado em uma estufa a 84 °C até que a massa celular estivesse completamente seca e com peso constante. O cálculo da concentração celular foi feita de acordo com a Equação 2.

$$\text{Concentração celular} = \frac{M - M_i}{V} \quad (2)$$

Onde, M é a massa do tubo contendo a massa seca em gramas, M_i é a massa do tubo vazio e seco em gramas, e V é o volume da amostra em litros.

Nas fermentações em biorreator, onde a concentração celular inicial foi aferida antes de iniciar o enchimento do reator, a Equação 3 foi utilizada a fim de traduzir a concentração do inóculo inicial para um valor equivalente ao volume de trabalho.

$$C_i * V_i = C_t * V_t \quad (3)$$

Onde, C_i é a concentração celular do inóculo, V_i é o volume do inóculo, C_t é a concentração celular equivalente ao volume de trabalho, V_t é o volume de trabalho do reator.

4.2.3. Análise de Carboidratos, Etanol e Glicerol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

As análises de açúcares, glicerol e etanol do presente trabalho foram realizadas em equipamentos dos modelos Shimadzu LC-6A e Waters 1525 equipados com detectores de índice de refração dos modelos HP 1047A e Waters 2414, respectivamente. Ambos os equipamentos foram equipados com colunas do modelo Aminex HPX 87-H. Ambos utilizaram como fase móvel uma solução de H_2SO_4 a 0,005 mol/L, fluxo de 0,6 ml/min e temperatura do forno de 35 °C.

Curvas de calibração foram preparadas para a identificação e quantificação de 5 componentes: sacarose, glicose, frutose, glicerol e etanol. Foi preparada uma solução mãe em um balão volumétrico de 100 mL contendo todas as substâncias à 5 g/L de concentração. A solução mãe foi então diluída com água destilada e filtrada com membrana de filtração de 0,22 µm de

porosidade, em balões volumétricos de 10 mL para as concentrações de 4, 3, 2, 1 e 0,5 g/L.

O preparo das amostras para a leitura se deu pela diluição das mesmas em água destilada e filtrada para concentração dentro da faixa da curva de calibração e posterior filtragem com uma membrana de filtração de celulose de 0,22 µm de porosidade até que não houvesse partículas visíveis dentro do líquido.

4.2.4. Determinação de teor de umidade

Para determinar o teor de umidade do liofilizado de leveduras, foram pesados 2 g de levedura liofilizada de pacotes recém-abertos em uma balança determinadora de umidade da Bel Engineering modelo I-Thermo G. A tampa da balança foi fechada e o procedimento de determinação durou 20 minutos, sob a temperatura de 104 °C.

4.2.5. Cálculo de parâmetros fermentativos

O desempenho das fermentações realizadas no presente trabalho foi medido através dos seguintes parâmetros: rendimento de etanol ($Y_{E/S}$), eficiência fermentativa (E_f), e produtividade (P). As equações utilizadas para o cálculo de cada parâmetro estão descritas abaixo.

O cálculo de rendimento das fermentações em batelada foi feito através da Equação 5, a partir da concentração final de etanol (g/L) e de açúcares consumidos durante a fermentação (g/L).

$$Y_{E/S} = \frac{\Delta E}{\Delta S} \quad (5)$$

Onde, $Y_{E/S}$ é o rendimento de etanol por grama de açúcares consumidos (g/g), ΔE é o total de etanol produzido (g/L), e ΔS é o total de açúcares consumidos (g/L).

Já o cálculo de rendimento das fermentações em regime de batelada alimentada foi feito através da Equação 6, a partir do valor de etanol final (g/L) e de açúcares consumidos durante a fermentação (g/L)

$$Y_{E/S} = \frac{P_f * V_f - C_0 V_0}{(V_f - V_0) * C_a - C_f V_f + C_0 V_0} \quad (6)$$

Onde, $Y_{E/S}$ é o rendimento de etanol por grama de açúcares consumidos (g/g), P_f é a concentração de etanol produzida ao final da fermentação (g/L), V_f é o volume final do reator após a alimentação (L), V_0 é o volume inicial do reator ao início da alimentação (L), C_a é a concentração de açúcares do mosto (g/L), C_f é a concentração de açúcares ao final da fermentação (g/L), e C_0 é a concentração inicial de açúcares (g/L).

A eficiência fermentativa foi calculada a partir do valor de rendimento obtido de cada fermentação e do rendimento teórico máximo de etanol, através da Equação 7 descrita abaixo.

$$E_f = \frac{Y_{E/S}}{0,511} * 100 \quad (7)$$

Onde, E_f é a eficiência fermentativa (%), $Y_{E/S}$ é o rendimento da fermentação por açúcares consumidos (g/g), e 0,511 é o rendimento teórico de etanol por grama de açúcares consumidos (g/g).

O cálculo da produtividade de etanol se deu pela relação entre o total de etanol produzido na fermentação e o tempo total, em horas, da fermentação, através da Equação 8.

$$P = \frac{\Delta E}{t} \quad (8)$$

Onde, P é a produtividade de etanol (g/L), ΔE é o total de etanol produzido (g/L) e t é o tempo de fermentação (h)

4.3. ENSAIOS FERMENTATIVOS

4.3.1. Ensaios de desempenho fermentativo em diferentes composições de mosto

Os ensaios tiveram como objetivo observar o desempenho fermentativo da levedura *S. cerevisiae* em diferentes composições de substrato, a fim de observar se haveria inibição causada por componentes presentes no melaço e, caso houvesse, avaliar a diferença em performance fermentativa em substratos contendo diferentes quantidades de melaço em sua composição. Além disso, foram realizadas duas etapas de ensaios que visaram observar tais efeitos sob condições de gravidade normal e em altíssima gravidade.

Avaliação do desempenho fermentativo em gravidade normal

As fermentações foram conduzidas em frascos Erlenmeyer, de 250 mL de volume de trabalho, em uma mesa incubadora rotativa (New Brunswick Scientific C25KC Incubator Shaker) sob temperatura e agitação constantes de, respectivamente, 30 °C e 150 rpm, durante 8 horas. Os ensaios foram realizados em duplicata, com concentração celular de 20 g/L.

A composição dos meios utilizados no ensaio estão descritos na Tabela 3, sendo todos suplementados com 5,32 g/L ureia conforme a metodologia adaptada de Sonogo *et. al* (2016).

O liofilizado de leveduras foi pesado e colocado nos frascos do tipo Erlenmeyer, de capacidade 500 mL, limpos e secos. Depois, 250 mL do meio foi adicionado em cada frasco. Os frascos foram então submetidos a agitação na mesa incubadora rotativa durante 10 a 15 minutos a 250 rpm e 30 °C, até homogêneo. Então a primeira amostra (hora 0) era retirada e os frascos foram devolvidos para a mesa incubadora e a agitação era diminuída para 150 rpm, dando início a contagem de tempo do experimento.

Tabela 3 – Composição dos meios de cultivos usados na avaliação de desempenho fermentativo em gravidade normal

Condição	Composição	Açúcares Redutores Totais (g/L)
B100	Caldo de sorgo sacarino (92,72%), melaço de cana (7,30%), ureia (5,32 g/L)	104,30
M100	Melaço de cana (13,63%), água destilada (86,37%), ureia (5,32 g/L)	103,00
C100	Caldo de sorgo sacarino (1 l), sacarose P.A. (66,85 g), ureia (5,32 g/L)	106,91
S100	Sacarose (126,65 g/L), KH_2PO_4 (5,6 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,4 g/L), extrato de leveduras (6,8 g/L), ureia (5,32 g/L)	126,65

B100 = Mistura de melaço e sorgo / M100 = Melaço de cana-de-açúcar diluído em água destilada / C100 = Caldo de sorgo sacarino suplementado com sacarose / S100 = Meio sintético similar ao melaço

Fonte: A autora (2023)

Amostras de 2 mL foram retiradas a cada 2 horas e imediatamente submetidas a centrifugação a 4000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi separado e armazenado para posterior análise de açúcares e produtos, enquanto o creme de células foi submetido a análise de concentração celular. Uma alíquota também foi retirada para a análise de viabilidade celular, conforme metodologias descritas no item 4.2.

Avaliação de desempenho fermentativo em condições de HG e VHG

Foram preparadas 2 composições de mosto, descritas na Tabela 4. Todos os meios foram suplementados com 5,32 g/L de ureia, conforme metodologia descrita em Sonogo *et. al.*, (2016). A concentração celular usada foi de 20 g/L.

As fermentações foram conduzidas em frascos Erlenmeyer de capacidade de 250 mL, utilizando volume de trabalho de 150 mL, em uma mesa incubadora rotativa (New Brunswick Scientific C25KC Incubator Shaker) sob temperatura e agitação constantes de, respectivamente, 30 °C e 150 rpm. O ensaio teve a duração de 24 horas e foi conduzido em duplicata.

Tabela 4 – Composição dos meios de fermentação usados na avaliação de desempenho fermentativo em diferentes composições de mosto e em condições de VHG

Condição	Composição	Açúcares Redutores Totais (g/L)
MEL1	Melaço de cana-de-açúcar (27,05%), água destilada (72,95%), ureia (5,32 g/L)	204,50
MEL2	Melaço de cana-de-açúcar (33,07%), água destilada (66,93%), ureia (5,32 g/L)	239,44
BLEND1	Caldo de sorgo sacarino (28%), melaço de cana-de-açúcar (72%), ureia (5,32 g/L)	238,54
BLEND2	Caldo de sorgo sacarino (32%), melaço de cana-de-açúcar (68%), ureia (5,32 g/L)	251,00

MEL1 = Melaço diluído em água destilada em condição de alta gravidade / MEL2 = Melaço diluído em água destilada em condição de VHG / BLEND1 = mistura de caldo de sorgo sacarino e melaço de cana em condição de alta gravidade / BLEND2 = mistura de caldo de sorgo sacarino e melaço de cana em condição de VHG

A massa de liofilizado de leveduras foi pesada e adicionada aos frascos Erlenmeyer secos e limpos. Os meios, já na temperatura de 30 °C, foram medidos com uma proveta volumétrica graduada para 150 mL e então vertidos dentro dos frascos. Os frascos então foram acomodados na mesa incubadora a 250 rpm durante 10 a 15 minutos, até o liofilizado se dissolver completamente. Após esse período, as amostras iniciais (hora 0) foram colhidas de cada frasco e então os frascos foram retornados à mesa incubadora e a agitação ajustada para 150 rpm. À cada amostra, foram retirados 2 mL.

Amostras foram retiradas ao início, às 20 e às 24 horas de fermentação, para a avaliação de viabilidade celular, crescimento celular, consumo de açúcares e produção de etanol e glicerol. As metodologias analíticas utilizadas estão descritas no item 4.2.

4.3.2. Ensaio de capacidade fermentativa e tolerância à etanol

Foram usados 20 g/L de fermento biológico liofilizado em cada frasco, em base seca. O meio de fermentação foi composto por uma mistura de melaço de cana-de-açúcar e caldo de sorgo sacarino, na concentração inicial de 205,02 g/L, e suplementado com 5,32 g/L de ureia. Os pulsos de alimentação foram feitos com 50 gramas de melaço puro as 13,5, 24,75 e 40,7 horas de fermentação.

A fermentação foi conduzida em frascos do tipo Erlenmeyer, com volume de trabalho de 500 mL, em duplicata. O liofilizado de leveduras foi adicionado aos frascos e os meios, a temperatura de 30 °C, foram adicionados até preencher o volume de 500 mL, com o auxílio de uma proveta volumétrica. Os frascos foram acondicionados em uma mesa incubadora rotativa (Lab Companion IS-971) à temperatura de 30 °C e 250 rpm de agitação até que o liofilizado fosse completamente dissolvido e então a amostra da hora 0 do experimento foi colhida. Após, a agitação foi diminuída para 150 rpm e o experimento foi conduzido. A fermentação decorreu por 44 horas, com a concentração inicial de açúcares redutores totais de 205,02 g/L.

O acompanhamento do consumo de açúcares foi feito através de teste com o reativo DNS e a alimentação com melaço era feita quando a concentração dos açúcares redutores era de aproximadamente 20 g/L. Além disso também foi feito o acompanhamento da viabilidade celular ao início da fermentação, antes de cada alimentação e ao final do ensaio. As amostras para análise de açúcares totais foram centrifugadas a 4500 rpm e 4 °C. O sobrenadante foi congelado e posteriormente analisado conforme o protocolo descrito no item 4.2.4.

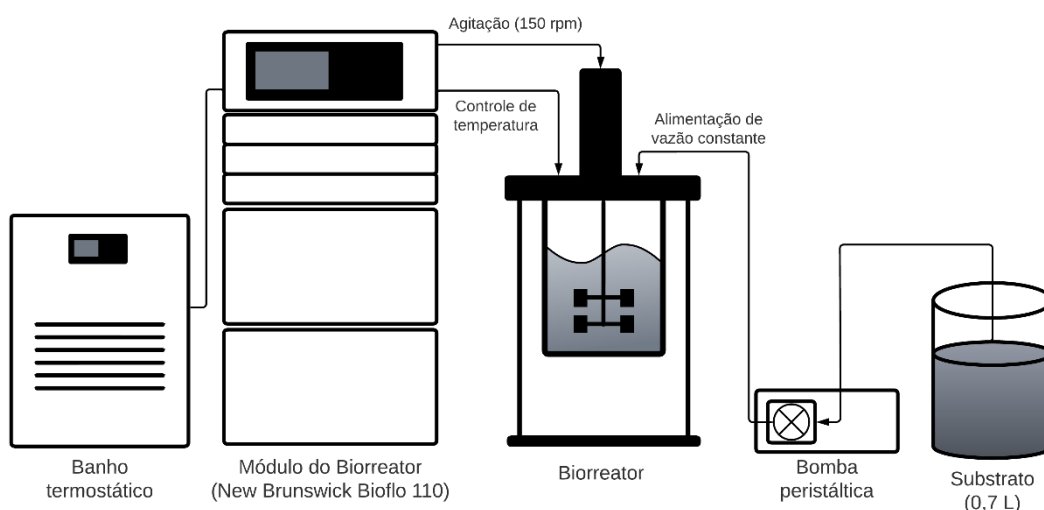
4.3.3. Avaliação da influência das condições densidade celular e tempo de alimentação uma fermentação VHG em batelada alimentada

Para isso, foram testados dois valores de densidade celular no inóculo ao início da fermentação e dois tempos de alimentação do meio ao biorreator, os quais estão descritos na Tabela 5.

As fermentações foram conduzidas em biorreator (New Brunswick Scientific Bioflo 110) com volume de trabalho de 1 litro. O inóculo foi composto

por leveduras liofilizadas hidratadas com água destilada e submetidas a agitação até dissolverem completamente. Depois de dissolvidas, o volume foi completo com água destilada até 300 mL, ou 30% do volume de trabalho do reator, e então a alimentação do meio foi iniciada. A alimentação foi feita através de uma bomba peristáltica da marca Watson Marlow, modelo 101U/R, com um valor de vazão constante. Durante a alimentação, o mosto foi agitado com auxílio de um agitador magnético, a fim de que não houvesse precipitação dos sólidos presentes no líquido. A temperatura e a agitação mantiveram-se constantes no reator, em 30 °C e 150 rpm, respectivamente, durante as 24 horas de duração do ensaio. O esquema descrito na Figura 4 representa a operação do reator.

Figura 4 – Esquema representativo da operação do biorreator



Fonte: A autora (2022)

Os meios de fermentação foram compostos de misturas de melaço de cana (46,20%) e caldo de sorgo (53,80%) e 8 g/L de ureia P.A. As concentrações de ART de cada meio utilizado, bem como a concentração celular inicial e o tempo de alimentação de cada condição do ensaio estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 – Concentração de Açúcares Redutores Totais de cada mosto utilizado nos ensaios de Avaliação da influência da concentração celular no acúmulo de açúcares durante uma fermentação VHG em batelada alimentada

	ART (g/L)	C _{x0} (g/L)	T (h)
R1	267,98	53,72	9
R2	279,64	50,12	11
R3	279,64	134,92	9

ART = Açúcares redutores totais / C_{x0} = Concentração celular inicial / T = tempo / R1 = fermentação mistura de caldo de sorgo e melaço em VHG com baixa densidade celular e 9 horas de fermentação / R2 = fermentação com mistura de caldo de sorgo e melaço em VHG com baixa densidade celular e 11 horas de alimentação / R3 = fermentação com mistura de caldo de sorgo e melaço em VHG com alta densidade celular e 9 horas de alimentação

Fonte: A autora (2023)

4.3.4. Validação da fermentação em VHG com alta densidade celular e tempo de alimentação de 11 horas

A fermentação foi realizada em um biorreator (New Brunswick Scientific Bioflo 110) com volume de trabalho de um litro. O inóculo consistiu em $85,89 \pm 8,22$ g/L de leveduras liofilizadas hidratadas com água destilada e agitadas no agitador do biorreator até se dissolverem completamente. Após a dissolução, o volume foi completado com água destilada até 300 mL, ou 30% do volume total do reator, e então a alimentação do meio foi iniciada. A alimentação foi realizada por meio de uma bomba peristáltica da marca Watson Marlow, modelo 101U/R, com um valor de vazão constante durante 11 horas, enquanto o mosto era agitado por um agitador magnético para evitar a precipitação dos sólidos presentes no líquido. O meio de fermentação foi composto de uma mistura de 53,40% de melaço de cana e 46,60% de caldo de sorgo, suplementado com 8 g/L de ureia P.A. A concentração de açúcares final do meio utilizado foi de $301,55 \pm 33,20$ g/L. A temperatura e a agitação foram mantidas constantes automaticamente no reator (30°C e 150 rpm, respectivamente) durante as 30 horas da fermentação. A operação do reator é ilustrada na Figura 4.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO FERMENTATIVO DA LEVEDURA *S. CEREVISIAE* EM DIFERENTES COMPOSIÇÕES DE MOSTO

A primeira etapa dos ensaios comparativos foi realizada utilizando os diferentes mostos, observando as influências das diferentes composições de cada meio nos desempenhos fermentativos.

O meio composto de melaço diluído teve o melhor rendimento dentre os quatro (Tabela 6). As demais condições apresentaram valores de rendimento próximos, com a mistura de melaço e sorgo obtendo o menor valor, de 0,40 g/g. Em todas as condições houve consumo completo dos açúcares iniciais.

Tabela 6 – Resultados e parâmetros fermentativos da avaliação de desempenho fermentativo da levedura *S. cerevisiae* em diferentes composições de mosto

Condição	ART (g/L)		P _E (g/L)	P _G (g/L)	Y _{E/S} (g/g)	E _F (%)
	Inicial	Final				
B100	104,30 ± 4,78	0,00	41,50	8,40 ± 1,01	0,40	77,87
M100	103,00	0,00	47,87 ± 3,05	11,16 ± 1,76	0,48	90,95
C100	106,91 ± 4,92	0,00	46,02 ± 8,66	8,54 ± 2,29	0,43	84,24
S100	126,65 ± 2,81	0,00	56,80 ± 1,48	14,75 ± 0,42	0,45	87,76

ART = Açúcares Redutores Totais / P_E = Etanol final / P_G = Glicerol final / Y_{E/S} = Rendimento de etanol por grama de substrato consumido / E_F = Eficiência Fermentativa / B100 = Mistura de melaço e sorgo / M100 = Melaço de cana-de-açúcar diluído em água destilada / C100 = Caldo de sorgo sacarino suplementado com sacarose / S100 = Meio sintético similar ao melaço

Fonte: A autora (2023)

Comparando os parâmetros fermentativos do meio composto de melaço diluído e do meio sintético de composição similar ao do melaço, é possível observar que o volume final de etanol foi maior no meio sintético. Porém tal valor é devido à maior concentração de açúcares presentes no meio sintético em comparação aos demais meios. A eficiência fermentativa de ambas as condições foi similar, condizentes com a eficiência obtida na indústria ao utilizar caldo de cana-de-açúcar e/ou melaço como substrato, de 90 a 92% (MONTEIRO *et al.*, 2018).

Os meios de caldo de sorgo e a mistura de sorgo e melaço também tiveram desempenhos similares. O rendimento de etanol do caldo de sorgo foi condizente com o rendimento de outros estudos na literatura. Dutra *et al.*, (2018) obteve rendimentos na faixa de 0,42 a 0,49 g/g de fermentações a partir do caldo de diferentes variedades de sorgo sacarino (DUTRA *et al.*, 2018). No mesmo estudo, a variedade IPA 467 proporcionou um rendimento de 0,45 em 6 horas de fermentação, porém apenas 92,10% dos açúcares totais foram consumidos. Uma possível explicação para o consumo de açúcares não ter sido completo no estudo citado é o fato de as fermentações do estudo terem sido conduzidas sem agitação, fazendo com que as leveduras não tenham acesso a todo o açúcar presente no meio. Outra explicação é a suplementação de nitrogênio. No estudo citado foram usados apenas o caldo das diferentes variedades de sorgo, sem suplementação. Já foi observado que, dentre outras vantagens, a suplementação com ureia facilita o consumo de açúcares, reduzindo também o tempo de fermentação (APPIAH-NKANSAH *et al.*, 2018).

A viabilidade celular nas quatro condições não apresentou grande variação durante as 8 horas de fermentação, conforme representado na Tabela 7. A única queda foi na condição com meio similar ao melaço, que também foi a condição com maior volume de etanol ao final da fermentação. Apesar de as concentrações de etanol final não terem sido altas o suficiente para causar inibição nas leveduras, a concentração de 56,80 g/L obtida da condição S100 é condizente com a queda de viabilidade observada. Um comportamento similar foi observado no estudo de Dutra *et al.*, (2018), onde a fermentação com o caldo da variedade SF 15, com 128,80 g/L de açúcares iniciais, obteve 56,38 g/L de etanol e uma queda de 6% da viabilidade celular (DUTRA *et al.*, 2018).

Tabela 7 – Resultados de viabilidade e concentração celular iniciais e finais da avaliação de desempenho fermentativo da levedura *S. cerevisiae* em diferentes composições de mosto

Condição	V _i (%)	V _f (%)	C _{x0} (g/L)	C _{xf} (g/L)	Y _{x/s} (g/g)
B100	72,09 ± 8,97	72,75 ± 1,87	12,90 ± 1,34	24,15 ± 1,82	0,11
M100	72,09 ± 8,97	75,42 ± 5,24	11,33 ± 1,85	24,43 ± 1,89	0,13
C100	72,09 ± 8,97	77,58 ± 3,18	16,98 ± 0,83	21,95 ± 1,08	0,05
S100	72,09 ± 8,97	62,65 ± 7,45	13,28 ± 1,46	21,92 ± 0,49	0,07

V_i = Viabilidade celular inicial / V_f = Viabilidade celular final / C_{x0} = Concentração celular inicial / C_{xf} = Concentração celular final / Y_{x/s} = Rendimento celular / B100 = Mistura de melaço e sorgo / M100 = Melaço de cana-de-açúcar diluído em água destilada / C100 = Caldo de sorgo sacarino suplementado com sacarose / S100 = Meio sintético similar ao melaço

Fonte: A autora (2023)

Quanto ao crescimento celular, o rendimento de células por gramas de açúcares consumidos variou de 0,05 g/g, do caldo de sorgo, até 0,13 g/g do melaço diluído (Tabela 7). Os resultados obtidos condizem com o estudo de Della-Bianca e Gombert, (2013), onde diferentes linhagens da levedura *S. cerevisiae* foram cultivadas em um meio composto por glicose à 30 °C e obtiveram rendimentos de biomassa entre 0,10 e 0,14 g/g. A levedura de panificação Fleischmann, a mesma utilizada no presente trabalho, teve um rendimento de 0,12 g/g (DELLA-BIANCA; GOMBERT, 2013). Os rendimentos de biomassa parecem ser inversamente proporcionais aos valores de concentração celular inicial, o que explica o rendimento mais baixo da condição com caldo de sorgo. Um fenômeno similar foi observado por Dutra *et. al*, (2018), onde o crescimento celular foi influenciado pela alta concentração do inóculo inicial.

Ao todo, as performances nas quatro condições foram equivalentes e dentro dos parâmetros esperados, sem grandes sinais de estresse por substrato ou produto. Inibições por substrato geralmente ocorrem em concentrações acima de 150 g/L de açúcares totais no meio e, embora sinais de estresse etanólico possam começar a ser observados à baixas concentrações, poucos sinais de estresse foram observados, como a queda na viabilidade celular e a concentração de glicerol levemente mais alta que as demais condições na fermentação com meio sintético similar ao melaço (GLAZER; NIKAIDO, 2007; THATIPAMALA; ROHANI; HILL, 1992). Assim sendo, foi realizado um ensaio entre diferentes composições de mosto em condições de alta e altíssima gravidade a fim de observar a influência da composição dos substratos associados às altas concentrações de açúcares e de etanol.

5.2. AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO FERMENTATIVO DA LEVEDURA *S. CEREVISIAE* EM DIFERENTES COMPOSIÇÕES DE MOSTO E EM CONDIÇÕES DE HG E VHG

A segunda etapa da avaliação de desempenho foi realizada usando somente meios compostos por melaço diluído e de misturas de melaço e sorgo, em condições de alta e altíssima gravidade, conforme descrito na Tabela 8. Observou-se que a eficiência fermentativa dos mostos de melaço diluído foi menor do que a observada na condição *blend 1*.

Com exceção da condição *blend 2*, todas as condições chegaram próximas de esgotar os açúcares do mosto. Na condição *blend 2* foram observados 18,05 g/L de açúcares residuais, enquanto as demais condições apresentaram $\leq 2,17$ g/L de açúcares ao final das 24 horas de fermentação.

As condições com os melhores desempenhos do ensaio foram as condições *Blend 1* e *Mel 2*, que obtiveram 111,16 e 104,55 g/L de etanol final, respectivamente. Os valores de glicerol final também foram semelhantes, indicando condições similares de estresse. Contudo, a principal diferença entre as duas condições foi na eficiência fermentativa, onde a condição *Blend 1* obteve 91,83% de eficiência, enquanto a condição *Mel 2* obteve apenas 85,99%.

Apesar das concentrações iniciais de açúcares de ambas as condições também serem similares (Tabela 8), há diferença da composição de ambas. No mosto de *Blend 1*, que é composto por melaço e caldo de sorgo, 28% de seu volume é composto por melaço e 72% por caldo de sorgo, enquanto na condição *Mel 2*, há 33,07% de melaço e 66,93% de água destilada. Ao utilizar-se o caldo de sorgo na diluição do melaço para a composição do mosto, por conta de seu teor de açúcares, é necessário um volume menor de melaço para atingir a concentração desejada. Apesar disso, a diferença nas proporções de melaço presentes em cada mosto não pareceu exercer influência negativa na performance de cada condição. Em ambas as condições (*Blend 1* e *Mel 2*) a produção de glicerol foi similar, indicando que ambas sofreram níveis parecidos de estresse durante a fermentação, não sendo possível afirmar que o estresse sofrido por *Mel 2* foi causado majoritariamente pelo maior volume de melaço no mosto, principalmente quando a levedura utilizada não apresenta preferência por composição de mosto (DELLA-BIANCA; GOMBERT, 2013).

Tabela 8 – Resultados e parâmetros fermentativos da avaliação de desempenho fermentativo da levedura *S. cerevisiae* em diferentes composições de mosto e em condições de VHG

Condição	ART (g/L)		P _E (g/L)	P _G (g/L)	Y _{E/S} (g/g)	E _F (%)	P (g/L.h)
	Inicial	Final					
BLEND1	238,54	1,64	111,16	19,42	0,47	91,83	4,63
BLEND2	251,00	18,05	100,94	21,42	0,43	84,80	4,21
MEL1	204,50	2,17	87,08	20,75	0,43	84,22	3,63
MEL 2	239,44	1,50	104,55	18,47	0,44	85,99	4,36

ART = Açúcares Redutores Totais / P_E = Etanol final / P_G = Glicerol final / Y_{E/S} = Rendimento de etanol por grama de substrato consumido / E_F = Eficiência Fermentativa / P = Produtividade / MEL1 = Melaço diluído em água destilada em condição de alta gravidade/ MEL2 = Melaço diluído em água destilada em condição de alta gravidade / BLEND1 = mistura de caldo de sorgo sacarino e melaço de cana em condição de alta gravidade / BLEND2 = mistura de caldo de sorgo sacarino e melaço de cana em condição de VHG

Fonte: A autora (2023)

Um estudo de Laopaiboon *et. al.*, (2009), que avaliou a fermentação em batelada de uma mistura de melaço e caldo de sorgo em VHG, obteve resultados similares aos da condição *Blend 1* em suas fermentações. A fermentação do blend de melaço e caldo de sorgo com 247,53 g/L, com suplementação de YEP, obteve um rendimento de etanol de 0,47 g/g e uma concentração final de 104,99 g/L de etanol. Apesar do rendimento, a condição apresentou 23,94 g/L de açúcares residuais ao final de 72 horas de fermentação, resultando em uma produtividade menor que a do trabalho atual (LAOPAIBOON, L. *et al.*, 2009).

Em outro estudo, Pradeep *et. al.*, (2010) avaliou a influência da suplementação de nitrogênio em fermentações VHG de melaço diluído em água. Com aproximadamente 250 g/L de açúcares redutores, a fermentação suplementada com ureia obteve etanol final de 98,9 g/L, enquanto a condição controle sem suplementação obteve 72,9 g/L. Ambos também mostraram menos de 5 g/L de açúcares residuais ao final das 72 horas de fermentação (PRADEEP; REDDY, 2010). Os resultados mostram que o desempenho fermentativo das leveduras empregadas no presente trabalho se mostrou satisfatório quando comparado com outros estudos similares na literatura. Foram obtidos rendimentos similares que os estudos citados em um tempo menor de fermentação.

Uma possível justificativa para a diferença nas performances fermentativas, mesmo que conduzidas na mesma temperatura, de 30°C, pode estar nas diferentes leveduras usadas em cada estudo. No estudo de Pradeep & Reddy (2010) foi utilizada uma levedura floculante da espécie *Saccharomyces*

bayanus. No trabalho de Laopaiboon *et al.*, (2009) foi usado uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* NP01, isolada de um alimento fermentado tradicional da Tailândia (LAOPAIBOON, L. *et al.*, 2009; PRADEEP; REDDY, 2010). A levedura usada no presente trabalho, apesar de ser de uma linhagem produzida para a panificação, é também usada como cultura inicial em usinas sucroenergéticas no Brasil (DELLA-BIANCA *et al.*, 2012). Outra explicação é a diferença na suplementação de fontes de nitrogênio em cada trabalho. Enquanto os demais trabalhos utilizaram concentrações na faixa de 3 a 6 g/L em suas suplementações, o presente estudo usou a concentração de 6,32 g/L, o que pode ter melhorado o seu desempenho (APPIAH-NKANSAH *et al.*, 2018).

A produção de glicerol foi similar em todas as condições, indicando que as leveduras passaram por níveis similares de estresse durante a fermentação. Outros trabalhos de fermentação em batelada apresentaram valores menores de glicerol que os obtidos pelo presente trabalho, mesmo com concentrações iniciais de açúcares maiores. Phukoetphim *et al.*, (2017), em uma fermentação em batelada com caldo de sorgo a 280 g/L obteve 13,9 g/L de glicerol, mesmo com uma maior concentração de etanol final, de 112,5 g/L (PHUKOETPHIM *et al.*, 2017).

Frohmann e Mira de Orduña (2013) obtiveram um valor máximo de glicerol de 11,7 g/L de uma fermentação em batelada com 343,3 g/L (FROHMAN; MIRA DE ORDUÑA, 2013). Ao avaliar a tolerância a estresse de diferentes linhagens de *S. cerevisiae*, Della-Bianca e Gombert (2013) observaram valores próximos aos obtidos em leveduras cultivadas a 37 °C que apresentaram altos níveis de estresse, obtendo valor próximo de 0,08 g/g de rendimento de glicerol (DELLA-BIANCA; GOMBERT, 2013). O estresse sofrido pelas células é evidenciado também pela queda na viabilidade celular e no baixo crescimento celular (Tabela 9).

Parte do ATP produzido pelo consumo de açúcares em uma fermentação é destinada para a manutenção das funções celulares e parte é destinado para a reprodução celular. Em fermentações com altas concentrações de açúcares, a demanda de energia para a manutenção da integridade celular aumenta, devido aos efeitos inibitórios do estresse osmótico e do etanol. Assim, para a obtenção de eficiências altas na fermentação ($\geq 90\%$), parte do ATP que seria utilizado para o crescimento celular é utilizado em função da manutenção da integridade

celular (GLAZER; NIKAIDO, 2007). Esse comportamento pode explicar o baixo crescimento celular observado e a baixa queda de viabilidade celular. Apesar do aparente crescimento celular na condição MEL 2, o valor inicial de concentração celular é devido à dissolução do liofilizado de leveduras no início da fermentação. Foi adicionada a mesma massa de liofilizado celular em todas as condições.

Tabela 9 – Resultados de viabilidade e concentração celular iniciais e finais da avaliação de desempenho fermentativo da levedura *S. cerevisiae* em VHG

Condição	V _i (%)	V _f (%)	C _{x0} (g/L)	C _{xf} (g/L)
BLEND1	85,71	45,12 ± 13,53	18,35 ± 0,57	16,80 ± 0,00
BLEND2	85,71	56,33 ± 7,51	17,75 ± 1,06	17,33 ± 0,18
MEL1	85,71	63,86 ± 4,38	17,85 ± 1,20	18,83 ± 0,25
MEL2	86,59 ± 1,83	59,15 ± 5,08	13,68 ± 0,25	17,55 ± 0,57

V_i = Viabilidade celular inicial / V_f = Viabilidade celular final / C_{x0} = Concentração celular inicial / C_{xf} = Concentração celular final / MEL1 = Melaço diluído em água destilada em condição de alta gravidade / MEL2 = Melaço diluído em água destilada em condição de VHG / BLEND1 = mistura de caldo de sorgo sacarino e melaço de cana em condição de alta gravidade / BLEND2 = mistura de caldo de sorgo sacarino e melaço de cana em condição de VHG

Fonte: A autora (2023)

Com os resultados obtidos de ambas as avaliações fermentativas discutidas nos itens 5.1 e 5.2, foi possível observar que a associação do caldo de sorgo ao melaço de cana, nas concentrações testadas, não apresentou diferenças significativas no desempenho fermentativo. Porém, a adição do caldo de sorgo ao mosto não só faz com que os componentes tóxicos do melaço sejam diluídos, o que em si já oferece uma condição melhor para as células, mas também faz com que seja necessário menos melaço para atingir a concentração desejada para a fermentação, pois o caldo de sorgo também é rico em açúcares. Além disso, a complementaridade de nutrientes alcançada através da mistura de dois substratos contribui com a manutenção da viabilidade celular das leveduras durante a fermentação mesmo em concentrações altas de substrato e, posteriormente, etanol. Ainda assim, a concentração de açúcares exerce maior influência no desempenho da fermentação do que a composição. Tal efeito pôde ser observado na condição *blend* 2, que foi iniciada com 251 g/L de açúcares e obteve rendimento semelhante ao das duas condições com melaço.

Em relação ao mosto de melaço diluído, o rendimento das fermentações caiu de 0,47 g/g para 0,43 g/g quando realizado em alta gravidade, e 0,44 g/g

quando em VHG, possibilitando o levantamento da hipótese de que talvez em concentrações mais altas de açúcares, as proporções de melaço na composição do mosto exerçam maior influência.

Assim, o próximo passo foi examinar a tolerância das leveduras ao etanol produzido sem a influência do estresse osmótico causado pelo regime de fermentação em batelada.

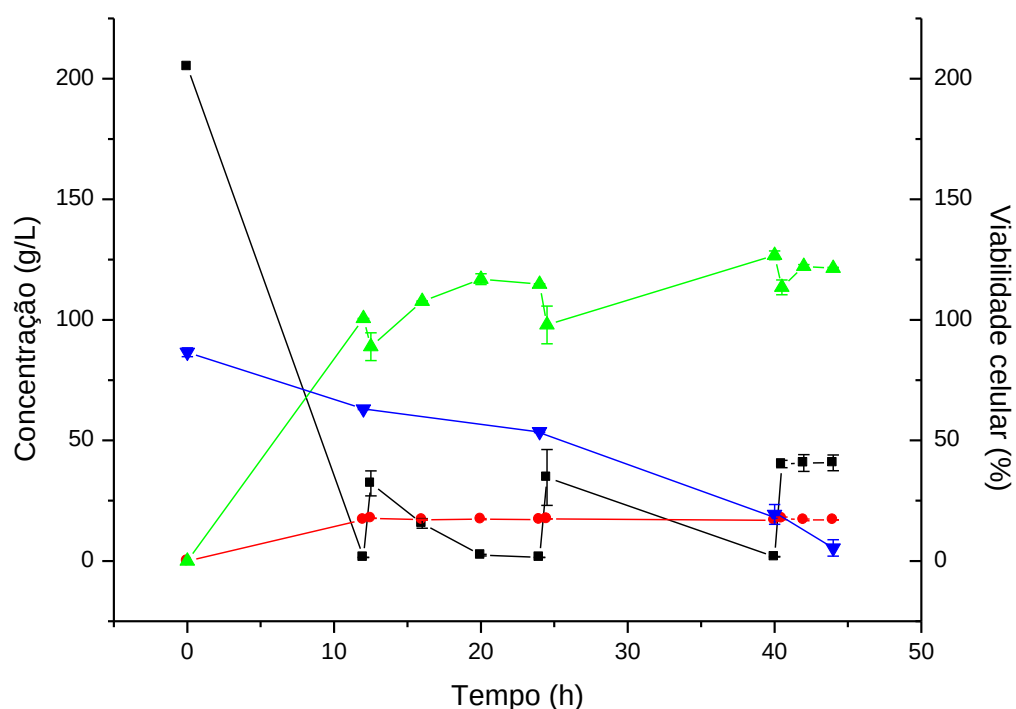
5.3. ENSAIOS DE TOLERÂNCIA AO ETANOL POR FERMENTAÇÃO VHG EM REGIME DE BATELADA ALIMENTADA EM PULSOS

O ensaio permitiu observar o desempenho fermentativo da levedura em uma fermentação VHG em um regime de batelada alimentada, com a alimentação de açúcares feita em pulsos, bem como observar o ponto em que as leveduras sofreriam inibição pelo etanol produzido.

Conforme demonstrado na Figura 5, o consumo de açúcares se deu até às 40 horas de fermentação, indicando que a partir desse ponto os efeitos da inibição por produto se tornaram limitantes. Ao final da fermentação, foram obtidos 122,21 g/L de etanol (Figura 5).

É importante ressaltar que a escolha do melaço para os pulsos de alimentação foi feita por dois principais motivos. O primeiro deles foi simular uma situação real na indústria, onde o melaço é uma das matérias-primas mais acessíveis para a composição de um substrato para fermentação, principalmente em períodos de entressafra de cana-de-açúcar. Em segundo lugar, por conta do alto teor de açúcares presentes no melaço, foi necessário um pequeno volume para realizar as alimentações do meio, de forma que o volume de trabalho dos ensaios não sofreu grandes perturbações.

Figura 5 – Gráfico de consumo de açúcares, produção de etanol, glicerol e de viabilidade celular durante fermentação em VHG com alimentação em pulsos



Linha preta com marcadores quadrados = Açúcares redutores totais / Linha vermelha com marcadores redondos = Glicerol / Linha verde com marcadores de triângulos para cima = Etanol / Linha azul com marcadores de triângulos para baixo = Viabilidade celular

Fonte: A autora (2023)

Assim sendo, não foi possível observar grande estresse sofrido pela levedura devido à presença do melaço no mosto e nem pela pressão osmótica da alta concentração de açúcares no início da fermentação. Apesar de estudos afirmarem que a partir de 150 g/L já pode ser observado sinais de estresse osmótico, as leveduras usadas no presente trabalho parecem manter um bom desempenho em concentrações mais altas (THATIPAMALA; ROHANI; HILL, 1992). Tal tolerância é evidenciada pela queda de 27,17% na viabilidade celular nas primeiras 12 horas de fermentação, onde 203,53 g/L de açúcares foram consumidos e 100,57 g/L de etanol foram produzidos. Entre 12 e 24 horas, há uma queda de apenas 14,94% na viabilidade. A partir de 24 horas pôde ser observada maiores quedas na viabilidade, de 64,01% entre 24 e 40 horas, e de 72,04% de 40 horas até o final da fermentação. Tais quedas podem ser

relacionadas às altas concentrações de etanol as quais a levedura ficou exposta durante a fermentação.

O estudo de Camargos *et. al.*, (2021), cuja metodologia foi adaptada para o presente trabalho, obteve resultados semelhantes em sua avaliação de produção máxima de etanol. No estudo, que usou melaço de cana diluído como substrato, a inibição por produto também ocorreu às 40 horas de fermentação e a concentração final de etanol foi de 105,35 g/L. Segundo os autores, apesar da presença de componentes inibitórios na composição do melaço e da pressão osmótica, foi possível atingir concentração final de etanol próximas de condições industriais (CAMARGOS *et al.*, 2021).

A diferença nas concentrações finais de etanol obtidas nos dois estudos pode ser explicada por diferentes fatores. O primeiro deles são as diferentes cepas de levedura utilizadas. O estudo citado acima usou uma cepa floculante de *S. cerevisiae* C2/00, enquanto no presente estudo foi utilizada uma linhagem comercial de *S. cerevisiae*, normalmente usada em panificação.

Outro fator que pode ter contribuído para uma maior concentração de etanol obtida ao final da fermentação do presente trabalho foi o fato de que o mosto de melaço e caldo de sorgo foi suplementado com ureia, cujos benefícios já foram discutidos anteriormente. Ainda, o estudo de Camargos *et. al.*, (2021) foi conduzido à temperatura de 32 °C, enquanto o presente estudo usou a temperatura de 30 °C para as fermentações. Com a produção de etanol máxima observada em 122,21 g/L, a próxima etapa foi observar a influência da densidade do inóculo inicial e do tempo de alimentação no desempenho de uma fermentação em VHG à partir do mosto composto por melaço e caldo de sorgo.

5.4. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DENSIDADE CELULAR E TEMPO DE ALIMENTAÇÃO UMA FERMENTAÇÃO VHG EM BATELADA ALIMENTADA

A partir dos dados obtidos no experimento discutido no item 5.3, realizaram-se fermentações em batelada alimentada com alimentação contínua e em condições de VHG para observar a influência do tempo de alimentação e

da concentração celular no teor de etanol produzido na fermentação e no comportamento das leveduras.

A maior eficiência foi obtida da condição R2, que foi a condição com maior tempo de alimentação, de 89,93% de rendimento (Tabela 11), chegando mais próximo do etanol máximo observado no item 5.3. A condição R1 apresentou o maior teor de glicerol e de açúcares residuais ao final da fermentação. A condição R3 teve o menor rendimento do ensaio, porém apresentou o menor valor de açúcares residuais, por conta da maior concentração celular inicial.

Tabela 10 – Resultados e parâmetros fermentativos da avaliação da influência da concentração celular no acúmulo de açúcares durante fermentação VHG em batelada alimentada.

Condição	ART (g/L)		P _E (g/L)	P _G (g/L)	Y _{E/S} (g/g)	E _F (%)	P (g/L.h)
	Mosto	Final					
R1	267,98	34,15	105,55	23,92	0,45	88,34	4,40
R2	279,64	28,99	115,19	15,75	0,46	89,93	4,80
R3	279,64	16,79	109,35	15,64	0,42	81,41	4,56

ART = Açúcares Redutores Totais / P_E = Etanol final / P_G = Glicerol final / Y_{E/S} = Rendimento de etanol por grama de substrato consumido / E_F = Eficiência Fermentativa / P = Produtividade / R1 = fermentação mistura de caldo de sorgo e melaço em VHG com baixa densidade celular e 9 horas de fermentação / R2 = fermentação com mistura de caldo de sorgo e melaço em VHG com baixa densidade celular e 11 horas de alimentação / R3 = fermentação com mistura de caldo de sorgo e melaço em VHG com alta densidade celular e 9 horas de alimentação

Fonte: A autora (2023)

O estudo de Camargos *et al.*, (2021), ao avaliar o comportamento de leveduras flocculantes em fermentações VHG em batelada alimentada com um mosto de melaço diluído em água, observou que em sua condição mais alta de açúcares (250,84 g/L), a produção de etanol desacelerou após 18 horas de fermentação, resultando em uma eficiência de 70,21%. Ainda segundo os autores, ao final das 6 horas de alimentação empregadas no trabalho, o acúmulo de açúcares foi de 170,40 g/L, o que colocou as leveduras sobre estresse e, consequentemente, reduziu seu desempenho. Ao final da fermentação, o valor de açúcares residuais foi de 22,96 g/L, similar ao obtido na condição R2 (CAMARGOS *et al.*, 2021).

A condição R3 apresentou o menor acúmulo de açúcares ao final da alimentação, mesmo com o tempo de alimentação de 9 horas. O inóculo mais concentrado foi capaz de consumir mais açúcares durante a alimentação do mosto, impedindo de que o acúmulo de substrato chegasse a 100 g/L ao final da alimentação. Por esse motivo, a condição foi capaz de consumir mais açúcares que as demais. Leveduras são capazes de responder proporcionalmente às concentrações de açúcares no meio. Isso por que a glicose age como um sinal, que induz a expressão de transportadores de glicose suficiente para a quantidade de açúcar presente no meio (WIPT; GEORGE, 2008). A partir disso, foi possível que essa condição consumisse mais açúcares durante a alimentação do que as demais.

As condições R1 e R2 tiveram acúmulos semelhantes, possivelmente devido à concentração celular similar entre as duas fermentações. A condição R1, entretanto, apresentou um acúmulo de substrato acima de 150 g/L durante a alimentação. A partir dessa faixa de substrato os efeitos de pressão osmótica já começam a ser observados, como já discutido posteriormente (JOANNIS-CASSAN *et al.*, 2014). Apesar de tais efeitos não terem sido observados nessa faixa de concentração no presente trabalho, a combinação com a concentração de etanol elevada intensifica os efeitos limitantes e reduz a atividade fermentativa das leveduras. É possível observar tais efeitos na fermentação da condição R1, onde nas últimas horas de fermentação o consumo de açúcares e a produção de etanol são reduzidos (Figura 6A). Comparada com a condição R3, a concentração do inóculo mostrou ter grande influência no acúmulo de açúcares no reator durante a alimentação e, conseqüentemente, no desempenho da fermentação após o final da alimentação.

O aumento do tempo de alimentação contribuiu para a atenuação dos efeitos da pressão osmótica nas leveduras. A viabilidade celular da fermentação da condição R2 apresentou uma queda de apenas 17,46% durante as 24 horas de fermentação (Tabela 12), enquanto a condição R1 apresentou uma queda de 33,29% do valor inicial, quase o dobro da condição R2. A maior queda, contudo, foi na condição R3, com 40,08%. Conseqüentemente, foi possível obter um melhor rendimento e uma melhor produtividade.

Tabela 11 – Resultados de viabilidade e concentração celular iniciais e finais de fermentações em VHG em regime de batelada alimentada contínua, com diferentes tempos de alimentação e concentrações iniciais de células

Condição	V_i (%)	V_f (%)	C_{x0} (g/L)	C_{xf} (g/L)
R1	79,19	52,83	16,12	9,28
R2	60,58	50,00	15,036	12,5
R3	73,33	43,94	40,48	27,5

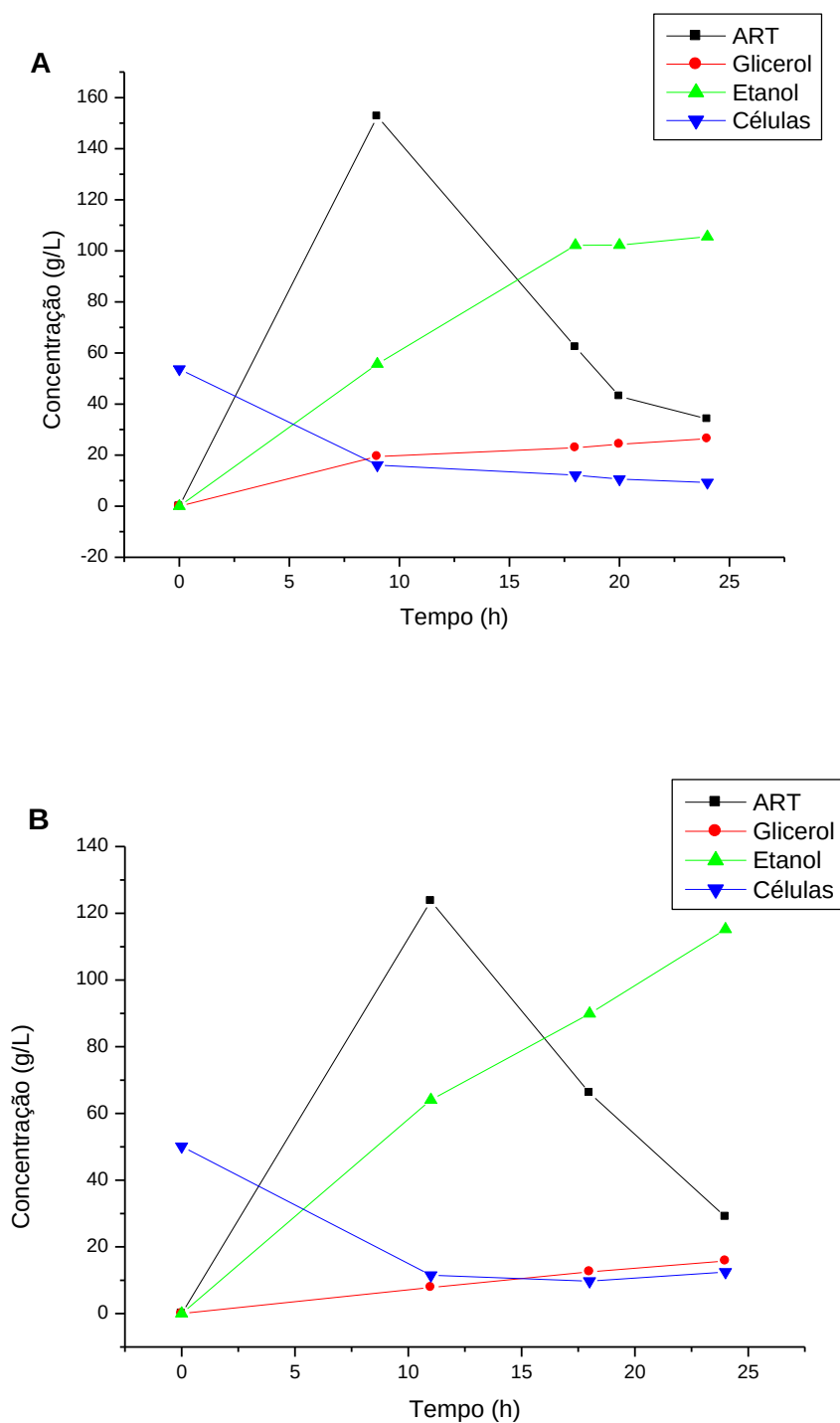
V_i = Viabilidade celular inicial / V_f = Viabilidade celular final / C_{x0} = Concentração celular inicial / C_{xf} = Concentração celular final / R1 = fermentação mistura de caldo de sorgo e melaço em VHG com baixa densidade celular e 9 horas de fermentação / R2 = fermentação com mistura de caldo de sorgo e melaço em VHG com baixa densidade celular e 11 horas de alimentação / R3 = fermentação com mistura de caldo de sorgo e melaço em VHG com alta densidade celular e 9 horas de alimentação

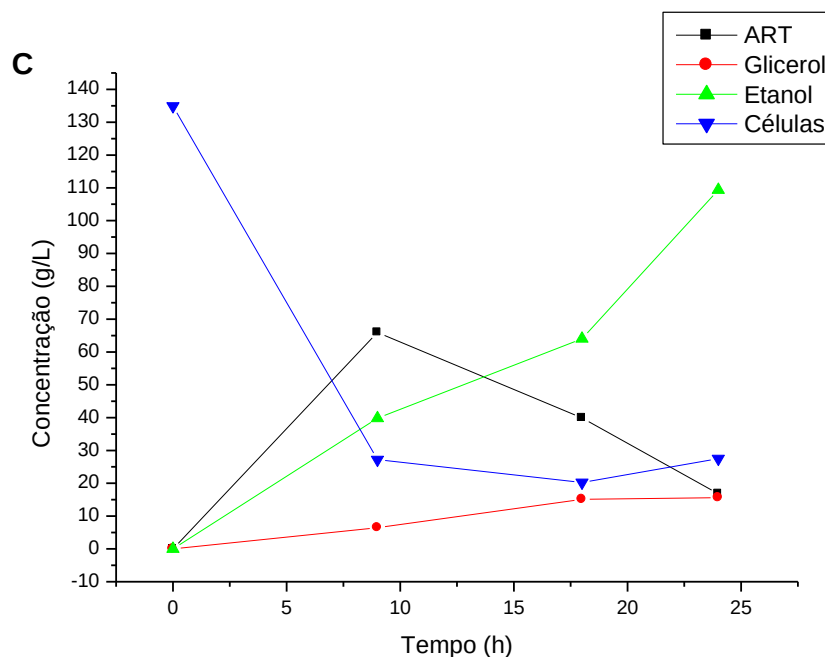
Fonte: A autora (2023)

O aumento da concentração do inóculo inicial também mostrou ser eficiente na redução dos efeitos de estresse. Em comparação entre as condições R1 e R3, o inóculo mais concentrado fez com que mais açúcares fossem consumidos, não somente durante a alimentação do reator mas em todas as 24 horas de fermentação. Assim, um menor acúmulo de açúcares foi alcançado, o que melhorou a produtividade de etanol por hora da fermentação (Figuras 6A e 6C).

Veloso *et. al.*, (2022) em seu estudo observou que concentrações celulares mais altas, associadas a temperaturas entre 30 e 34 °C, levaram a um aumento na produtividade de etanol de fermentações em VHG. Porém inóculos acima de 100 g/L não levaram a ganhos significativos em produtividade, independente da temperatura em que a fermentação fosse conduzida (VELOSO *et al.*, 2022).

Figura 6 – Consumo de açúcares redutores e produção de etanol durante fermentações em VHG em regime de batelada alimentada contínua, com diferentes tempos de alimentação e concentrações iniciais de células. a) Condição R1; b) Condição R2; c) Condição R3





R1 = fermentação mistura de caldo de sorgo e melaço em VHG com baixa densidade celular e 9 horas de fermentação / R2 = fermentação com mistura de caldo de sorgo e melaço em VHG com baixa densidade celular e 11 horas de alimentação / R3 = fermentação com mistura de caldo de sorgo e melaço em VHG com alta densidade celular e 9 horas de alimentação

Fonte: A autora (2023)

Independente das eficiências fermentativas, a aplicação de ambos os parâmetros no presente trabalho levaram a um maior consumo de substrato durante a fermentação. As condições R2 e R3 consumiram 250,65 e 262,85 g/L de açúcares respectivamente, enquanto a condição R1 foi capaz de consumir apenas 233,83 g/L. A definição, anteriormente discutida no presente trabalho, estabelece que fermentações em VHG são aquelas cujos substratos possuem 250 g/L ou mais de açúcares, porém, durante uma fermentação em batelada alimentada, as leveduras não são necessariamente expostas a tal faixa de concentração de uma única vez. No presente ensaio, a mudança nas variáveis concentração de inóculo e tempo de alimentação permitiram que fossem consumidos mais de 250 g/L, o que foi possível observar nas condições R2 (250,65 g/L) e R3 (262,85 g/L).

Diante dos presentes resultados, foi realizado um ensaio em reator combinando inóculo de alta densidade celular e um tempo de alimentação de 11 horas, a fim de validar os resultados obtidos do presente ensaio.

5.5. VALIDAÇÃO DA FERMENTAÇÃO EM VHГ COM ALTA DENSIDADE CELULAR E TEMPO DE ALIMENTAÇÃO DE 11 HORAS

A partir das informações obtidas do ensaio discutido no item 5.4, foi realizada uma fermentação com um inóculo de maior densidade celular e de tempo de alimentação, a fim de observar a influência de ambas no consumo de açúcares e, conseqüentemente, no desempenho fermentativo das leveduras. A fermentação obteve um rendimento de etanol de 0,41 g/g e consumiu ao todo 299,25 g/L de açúcares durante as 30 horas de fermentação, resultando em uma produtividade de 4,08 g/L.h (Tabela 13).

Tabela 12 – Resultados e parâmetros fermentativos da avaliação da influência da concentração celular no acúmulo de açúcares durante a avaliação da influência da associação de alta densidade celular e do tempo de fermentação no desempenho de fermentação VHГ em batelada alimentada

ART (g/L)		P _E (g/L)	P _G (g/L)	Y _{E/S} (g/g)	E _F (%)	P (g/L.h)
Mosto	Final					
301,55 ± 43,47	2,30	122,35	23,22	0,41	80,01	4,08

ART = Açúcares Redutores Totais / P_E = Etanol final / P_G = Glicerol final / Y_{E/S} = Rendimento de etanol por grama de substrato consumido / E_F = Eficiência Fermentativa / P = Produtividade

Fonte: A autora (2023)

A eficiência fermentativa obtida foi próxima da condição R3 do item 5.4. Porém a produtividade de etanol apresentou valores inferiores aos obtidos no item citado. Isso se deve ao tempo maior de fermentação, que foi de 30 horas. Porém, a concentração de etanol obtida foi a mesma da observada no ensaio de produção máxima de etanol, discutida no item 5.3, de 122,35 g/L. O valor de glicerol final também foi condizente com o etanol produzido, também observado no item 5.3. O valor de etanol máximo foi alcançado 10 horas antes, indicando que de fato o tempo de alimentação de 11 horas e o inóculo de alta densidade

celular foram capazes de aumentar a produção de etanol por hora, permitindo que os efeitos da pressão osmótica do acúmulo de açúcares no reator fosse mitigado.

Ao final das 11 horas de alimentação foi observado um acúmulo de 122,04 $\pm$ 46,50 g/L de açúcares no reator, o que era esperado, visto que apesar de um tempo de alimentação maior e de um inóculo de alta densidade de células, também foi empregado um mosto mais concentrado que o utilizado no ensaio anterior. Puderam ser observados alguns sinais de estresse, como o valor final de glicerol produzido (Tabela 12), a queda na viabilidade celular (Tabela 13) entre o início e o final da alimentação.

Um comportamento similar foi observado na condição R1 do item 5.4, onde houve um acúmulo de açúcares acima de 150 g/L. Os valores de glicerol obtidos também foram similares, bem como a queda na viabilidade no mesmo período. Este comportamento, porém, pode estar mais relacionado à alta concentração de etanol produzido do que ao estresse osmótico causado pelo acúmulo de açúcares no reator após a alimentação. Ao final da fermentação, a viabilidade celular foi de 26,44%, próximo do valor obtido às 40 horas da fermentação em pulsos, discutida no item 5.3; e a concentração celular foi de 12,84 g/L (Tabela 13), semelhante ao obtido na condição R2 do item 5.4.

Tabela 13 – Resultados de viabilidade e concentração celular iniciais e finais da avaliação da influência da associação de alta densidade celular e do tempo de fermentação no desempenho de fermentação VHG em batelada alimentada

V_i (%)	V_f (%)	C_{x0} (g/L)	C_{xf} (g/L)
87,72 $\pm$ 6,72	26,44	25,77 $\pm$ 2,46	12,84

V_i = Viabilidade celular inicial / V_f = Viabilidade celular final / C_{x0} = Concentração celular inicial / C_{xf} = Concentração celular final

Fonte: A autora (2023)

Com isso, foi possível observar a influência positiva da associação de um maior tempo de alimentação e do inóculo de alta densidade celular na melhoria da produtividade de etanol de uma fermentação em batelada alimentada. O valor máximo de etanol foi alcançado 10 horas antes do experimento descrito no item 5.3, e ainda foi possível manter a viabilidade celular em 26,44% e consumir os açúcares até quase a exaustão.

6 Conclusões

Com o estudo realizado foi possível observar que a associação do caldo de sorgo ao melaço de cana é uma opção promissora para a produção de etanol a partir de fermentação em VHG. O uso do regime de alimentação constante mostrou ter uma influência positiva na fermentação em VHG, reduzindo o tempo de fermentação, auxiliando na obtenção de concentrações altas de etanol e contribuindo para a manutenção da viabilidade celular das leveduras. Com o ajuste dos parâmetros tempo de alimentação, concentração celular e concentração de açúcares foi possível obter a concentração máxima de etanol observada no trabalho, mostrando que tais parâmetros possuem influência direta nas performances das fermentações.

Quanto à composição do mosto, ao se utilizar o caldo de sorgo para diluir o melaço para compor o mosto, à depender da concentração de açúcares desejada para a fermentação, uma menor quantidade de melaço foi necessária para compor o meio quando comparado à diluição de melaço em água. Isso resultou em rendimentos mais altos e melhor manutenção da viabilidade celular das leveduras, o que é importante tendo em vista o reciclo celular característico do modelo utilizado nas usinas sucroenergéticas brasileiras. As diferenças em eficiência foram ainda mais pronunciadas nas fermentações em condições de VHG, onde foi possível observar que o mosto composto apenas por melaço diluído em água, junto com a inibição por produto sobre as leveduras, teve um efeito sinérgico de estresse sobre as leveduras, levando a menores produtividades e menos células viáveis ao final das fermentações.

Quando testados os níveis de tolerância de etanol em um regime de alimentação por pulsos, a concentração de etanol obtida foi de 122,21 g/L durante 46 horas de fermentação. A partir de 40 horas a inibição por etanol fez com que a atividade fermentativa fosse cessada. Sendo assim, foi possível atestar que é possível se obter mais de 15% (V/V) a partir de um mosto composto por melaço e sorgo e em condições de altas gravidades.

Também foi observado que o regime de batelada alimentada contribuiu para que o rendimento das fermentações a partir da mistura. O aumento no tempo de alimentação e na concentração do inóculo inicial contribuíram para rendimentos de 0,46 e 0,42 g/g, respectivamente, em 24 horas de fermentação.

Ao final de ambas as fermentações as leveduras mantiveram viabilidade celular acima de 40%, demonstrando que seria possível reciclar as células para um próximo ciclo de fermentação. Ao associar os dois parâmetros, foi possível obter o valor máximo de etanol, de 122,35 g/L, em 30 horas de fermentação.

Por fim, foi concluído que o mosto composto por caldo de sorgo e melaço de cana é uma alternativa de um substrato rico em açúcares e nutrientes, sendo capaz de suprir as necessidades fisiológicas de leveduras para a produção de etanol, mesmo em condições mais extremas, como fermentações em VHG. Adicionalmente, foi possível obter altas concentrações de etanol final nas fermentações em VHG ao utilizar o regime de batelada alimentada com alimentação contínua, principalmente ao prolongar o tempo de alimentação ou aumentar a quantidade de células no inóculo inicial da fermentação.

REFERÊNCIAS

ALBERGARIA, H.; ARNEBORG, N. Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2016. v. 100, n. 5, p. 2035–2046.

ALDIGUIER, A. S. *et al.* Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 2004. v. 26, n. 4, p. 217–222.

ALMEIDA *et al.* Evaluation of different strains of *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production from high-amylopectin BRS AG rice (*Oryza sativa* L.). **Scientific Reports**, 2022. v. 12, n. 1, p. 1–15. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-022-06245-0>>.

ALMEIDA, L. G. F. De *et al.* Composition and growth of sorghum biomass genotypes for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, 2019. v. 122, n. January, p. 343–348.

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

_____; BASSO; LOPES. Sugar cane juice and molasses , beet molasses and sweet sorghum : Composition and usage. **The alcohol textbook: a reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries**, 2009. v. Vi, n. March 2017, p. 39–46. Disponível em: <<https://repositorio.usp.br/item/001802797>>.

APPIAH-NKANSAH, N. B. *et al.* Ethanol production from mixtures of sweet sorghum juice and sorghum starch using very high gravity fermentation with urea supplementation. **Industrial Crops and Products**, 2018. v. 111, n. April 2017, p. 247–253. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.028>>.

ATALA, D. I. P. *et al.* Kinetics of Ethanol Fermentation with High Biomass Concentration. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, 2001. v. 91, p. 353–65.

AUESUKAREE, C. Molecular mechanisms of the yeast adaptive response and tolerance to stresses encountered during ethanol fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2017. v. 124, n. 2, p. 133–142. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.03.009>>.

BAASCH, S. Energy transition with biomass residues and waste: regional-scale potential and conflicts. A case study from North Hesse, Germany. **Journal of Environmental Policy and Planning**, 2021. v. 23, n. 2, p. 243–255.

BALTZ, R. H.; DAVIES, J. E.; DEMIAN, A. L. **Manual of Industrial Biotechnology**. [S.l.]: [s.n.], 2010.

BARBOSA, H. S. *et al.* Efficient very-high-gravity fermentation of sugarcane molasses by industrial yeast strains. **Journal of the Institute of Brewing**, 2016. v. 122, n. 2, p. 329–333.

BARCELOS, C. A. *et al.* Sweet sorghum as a whole-crop feedstock for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, 2016. v. 94, p. 46–56. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.08.012>>.

BASSO *et al.* Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, 2008. v. 8, n. 7, p. 1155–1163.

BRASIL. Acompanhamento da Safra Brasileira. **Companhia Nacional de Abastecimento**, 2021. v. 2, n. 4, p. 1–60.

_____. Balanço Energético Nacional 2022. 2022.

_____. Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-açúcar. 2023. v. 10, p. 1–29.

CAMARGOS, C. V. *et al.* High Gravity and Very High Gravity Fermentation of Sugarcane Molasses by Flocculating *Saccharomyces cerevisiae*: Experimental Investigation and Kinetic Modeling. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2021. v. 193, n. 3, p. 807–821.

CARLOS, L.; OLITTA, T.; NITSCHKE, S. Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation. **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**, 2011. v. 1530.

CHEN *et al.* Pathways for sustainable energy transition. **Journal of Cleaner Production**, 2019. v. 228, p. 1564–1571. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.04.372>>.

CHRISTOFOLETTI, C. A. *et al.* Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. **Waste Management**, 2013. v. 33, n. 12, p. 2752–2761. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2013.09.005>>.

CRUZ; RESENDE; RIBEIRO. 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**, 2021. v. 44, n. 3, p. 617–625. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00449-020-02462-x>>.

DEESUTH, O. *et al.* Improvement of ethanol production from sweet sorghum juice under high gravity and very high gravity conditions: Effects of nutrient supplementation and aeration. **Industrial Crops and Products**, 2015. v. 74, p. 95–102. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.04.068>>.

DELLA-BIANCA *et al.* What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry? **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2012. v. 97, n. 3, p. 979–991.

DELLA-BIANCA, B. E.; GOMBERT, A. K. Stress tolerance and growth physiology of yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, 2013. v. 104, n. 6, p. 1083–1095.

DUTRA *et al.* Ethanol Production from the Stem Juice of Different Sweet Sorghum Cultivars in the State of Pernambuco, Northeast of Brazil. **Sugar Tech**, 2013. v. 15, n. 3, p. 316–321.

DUTRA, E. *et al.* First and Second Generation of Ethanol Production for Five Sweet Sorghum Cultivars during Soft Dough Grain. **Journal of Experimental Agriculture International**, 2018. v. 25, n. 2, p. 1–12.

EPE. Balanço Energético Nacional Relatório Síntese 2023. 2023.

FILHO; ANDRADE. Perfil do Setor do Açúcar e do Alcool no Brasil 11/12. 2013. v. 5, p. 1–88.

FROHMAN, C. A.; MIRA DE ORDUÑA, R. Cellular viability and kinetics of osmotic stress associated metabolites of *Saccharomyces cerevisiae* during traditional batch and fed-batch alcoholic fermentations at constant sugar concentrations. **Food Research International**, 2013. v. 53, n. 1, p. 551–555. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.05.020>>.

GLAZER; NIKAIDO. **MICROBIAL BIOTECHNOLOGY: Fundamentals of Applied Microbiology, Second Edition Alexander**. [S.l.]: [s.n.], 2007.

GODOY, A. *et al.* Continuous and batch fermentation processes: Advantages and disadvantages of these processes in the Brazilian ethanol production. **International Sugar Journal**, 2008. v. 110, n. 1311, p. 175–181.

GOMES, D. *et al.* Very high gravity bioethanol revisited: Main challenges and advances. **Fermentation**, 2021. v. 7, n. 1, p. 1–19.

HOHMANN, S. Control of high osmolarity signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, 2009. v. 583, n. 24, p. 4025–4029. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.069>>.

IEA. **Bioenergy. International Energy Agency**. Disponível em: <<https://www.iea.org/reports/bioenergy>>.

JOANNIS-CASSAN, C. *et al.* Optimization of very high gravity fermentation process for ethanol production from industrial sugar beet syrup. **Biomass and Bioenergy**, 2014. v. 70, p. 165–173. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.07.027>>.

KŁOSOWSKI, G.; MIKULSKI, D. Complementarity of the raw material composition of Very High Gravity (VHG) mashes as a method to improve efficiency of the alcoholic fermentation process. **Process Biochemistry**, 2018. v. 74, n. August, p. 1–9.

LALUCE, C. *et al.* Fermentation of sugarcane juice and molasses for ethanol production. **Sugarcane-based Biofuels and Bioproducts**, 2016. p. 53–86.

LAOPAIBOON, L. *et al.* Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology: Effects of carbon and nitrogen supplementations. **Bioresource Technology**, 2009. v. 100, n. 18, p. 4176–4182. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.046>>.

LIMA, U. De A. **Biotecnologia industrial : Volume IV, Processos, fermentativos, e enzimáticos**. Disponível em:

<https://books.google.com/books/about/Biotecnologia_industrial_vol_4.html?hl=pt-BR&id=PP6uDwAAQBAJ>.

LOPES *et al.* Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2016. v. 47, p. 64–76.

MELLO; SANTOS. Perfil do setor do açúcar e do etanol no Brasil 15/16. 2019.

MENEZES, C. B. De. **Melhoramento genético de sorgo**. 1. ed. Brasília - DF: Embrapa, 2021.

MONTEIRO, B. *et al.* Conditions promoting effective very high gravity sugarcane juice fermentation. **Biotechnology for Biofuels**, 2018. v. 11, n. 1, p. 1–15. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13068-018-1239-0>>.

OECD/IEA; IRENA. Executive Summary/Chapter 1. **Perspectives for the energy transition - investment needs for a low-carbon energy system**, 2017. p. 5–16. Disponível em: <https://www.irena.org/DocumentDownloads/Publications/Perspectives_for_the_Energy_Transition_2017.pdf>.

OLIVEIRA. Opção produtiva - Sorgo é plantado para produzir etanol na entressafra de cana. **Rev. Pesqui. FAPESP**, 2012. p. 62–65.

PACHECO. Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente. **Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 93 p.**, 2010. p. 106.

PHUKOETPHIM, N. *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**, 2017. v. 26, p. 84–92. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.01.005>>.

_____ *et al.* Improvement of bioethanol production from sweet sorghum juice

under very high gravity fermentation: Effect of nitrogen, osmoprotectant, and aeration. **Energies**, 2019. v. 12, n. 19.

PRADEEP, P.; REDDY, O. V. S. High gravity fermentation of sugarcane molasses to produce ethanol: Effect of nutrients. **Indian Journal of Microbiology**, 2010. v. 50, n. 1 SUPPL., p. 82–87.

PULIGUNDLA, P. *et al.* Very high gravity (VHG) ethanolic brewing and fermentation: A research update. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 2011. v. 38, n. 9, p. 1133–1144.

_____ *et al.* A review of recent advances in high gravity ethanol fermentation. **Renewable Energy**, 2019. v. 133, p. 1366–1379. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.06.062>>.

REIS, C. E. R.; HU, B. Vinasse from sugarcane ethanol production: Better treatment or better utilization? **Frontiers in Energy Research**, 2017. v. 5, n. APR.

SONEGO, J. L. S. *et al.* Extractive Fed-Batch Ethanol Fermentation with CO₂ Stripping in a Bubble Column Bioreactor: Experiment and Modeling. **Energy and Fuels**, 2016. v. 30, n. 1, p. 748–757.

TABOSA, A. R. M. *et al.* Cadernos do Semiárido riquezas & oportunidades /Conselho Regional de Engenharia e Agronomia de Pernambuco. **Histórico E Importância Do Sorgo**, 2020. p. 1–84.

TAO, J. *et al.* Technologies integration towards bio-fuels production: A state-of-the-art review. **Applications in Energy and Combustion Science**, 2022. v. 10, n. December 2021, p. 100070. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jaecs.2022.100070>>.

THANGPROMPAN, P. *et al.* Production of ethanol from sweet sorghum juice using VHG technology: A simulation case study. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2013. v. 171, n. 2, p. 294–314.

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**, 1992. v. 40,

n. 2, p. 289–297.

TOPPA, EDER VICTOR BRAGANTI; JADOSKI, CLEBER JUNIOR; JULIANETTI, ALESSANDRA; HULSHOF, TARCISIO; ONO, ELIZABETH ORIKA; RODRIGUES, J. D. Physiology aspects of sugarcane production. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, 2010. v. 6325, p. 223–230.

VELOSO, I. I. K. *et al.* Mathematical Modeling of Fed-Batch Ethanol Fermentation Under Very High Gravity and High Cell Density at Different Temperatures. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2022. n. 0123456789. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12010-022-03868-x>>.

WIPT, P.; GEORGE, K. M. The glucose signaling network in yeast. **Biochim Biophys Acta**, 2008. v. 23, n. 1, p. 1–7.

YAMAKAWA, C. K. *et al.* Study of influence of yeast cells treatment on sugarcane ethanol fermentation: Operating conditions and kinetics. **Biochemical Engineering Journal**, 2019. v. 147, n. March, p. 1–10. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.03.022>>.

YUE, G. *et al.* The influence of nitrogen sources on ethanol production by yeast from concentrated sweet sorghum juice. **Biomass and Bioenergy**, 2012. v. 39, p. 48–52. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.08.041>>.

RICCIARDO, Daniel. **Message To My Younger Self**. 29 ago. 2021. 1 vídeo (2 min 49 s). Publicado pelo canal McLaren. Disponível em: https://www.youtube.com/watch?v=uxQpY_QrN7E. Acesso em: 12 jun. 2023.