

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E BIOPROCESSOS

MESTRADO PROFISSIONAL

**AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DE PREPARADO ENZIMÁTICO COMERCIAL
EM MOSTO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA MAXIMIZAR A OFERTA DE
SUBSTRATOS FERMENTESCÍVEIS EM PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE
ETANOL EM ESCALA INDUSTRIAL**

RODRIGO BASSO

ORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando Masarin

ARARAQUARA - SP

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DE PREPARADO ENZIMÁTICO COMERCIAL
EM MOSTO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA MAXIMIZAR A OFERTA DE
SUBSTRATOS FERMENTESCÍVEIS EM PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE
ETANOL EM ESCALA INDUSTRIAL**

RODRIGO BASSO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos (Mestrado Profissional), Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando Masarin

ARARAQUARA - SP

2020

B658a Basso, Rodrigo.
Avaliação da aplicação de preparado enzimático comercial em mosto de cana-de-açúcar para maximizar a oferta de substratos fermentescíveis em processos de produção de etanol em escala industrial / Rodrigo Basso. – Araraquara: [S.n.], 2020.
103 f. : il.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos. Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos.

Orientador: Fernando Masarin.

1. Fermentação Etanólica. 2. Enzimas. 3. Carboidrases. 4. Oligossacarídeos. 5. Polissacarídeos. I. Masarin, Fernando, orient. II. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DE PREPARADO ENZIMÁTICO COMERCIAL EM MOSTO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA MAXIMIZAR A OFERTA DE SUBSTRATOS FERMENTESCÍVEIS EM PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE ETANOL EM ESCALA INDUSTRIAL

AUTOR: RODRIGO BASSO

ORIENTADOR: FERNANDO MASARIN

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E BIOPROCESSOS, área: Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FERNANDO MASARIN (Participação Virtual)

Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. BOUTROS SARROUH (Participação Virtual)

Departamento de Química Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos / Universidade Federal de São João Del-Rei

Prof. Dr. ALVARO DE BAPTISTA NETO (Participação Virtual)

Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Araraquara, 18 de dezembro de 2020

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha filha Camila Basso, razão pela qual empenhei tempo, energia e esforço a fim de lhe oferecer um futuro melhor, exemplo e motivação.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

Agradeço a Deus todo poderoso que a cada manhã renova as expectativas de vida e esperança em meu coração e que me inspirou através da Sua Palavra dizendo assim: “tudo quanto vier à mão para fazer, faze-o” Ec 9.10.

A minha amada esposa pela paciência e compreensão e a minha doce filha, por entender o tempo que dediquei ao desenvolvimento deste trabalho, sobre elas declaro o Sl 128.3.

Aos meus pais pelo esforço incessante em me oferecer apoio e acesso a boa educação durante os anos de minha formação.

Ao meu professor orientador Dr. Fernando Masarin por compartilhar seu conhecimento, experiência e a oportunidade de realizar este trabalho.

Aos membros da banca examinadora pelas correções e contribuição no aperfeiçoamento científico e textual.

A Angelina Oliveira e ao Rogério Prata, meus gestores e incentivadores internos na empresa em que trabalho, sem o apoio deles não seria possível obter mais esta vitória em minha carreira.

Aos colegas de trabalho, Rodrigo Victorelli, Eduardo Borges, Kelly Mulder, Rafael Ferraz e tantos outros que colaboraram decisivamente em diferentes momentos do desenvolvimento deste trabalho, ao lista-los aqui poderia incorrer no esquecimento de alguns nomes e deste modo expresse meus sinceros e fraternais agradecimentos.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Araraquara/SP, departamento de Ciências Farmacêuticas, programa de Engenharia de Bioprocessos e Biomateriais que permitiu a realização deste trabalho, conferindo ao autor o título de Mestre e através de uma linguagem técnica contribuindo com o avanço da ciência.

RESUMO

Atualmente, a maior parte das necessidades de energia do mundo são baseadas no uso de combustíveis fósseis. O rápido crescimento tanto da demanda global de energia quanto das emissões de dióxido de carbono associadas ao uso desses combustíveis tem impulsionado a produção de combustíveis através de fontes alternativas, que sejam renováveis e tenham menor impacto ambiental. O etanol é considerado um dos melhores biocombustíveis para o transporte, pois pode ser queimado diretamente ou misturado com gasolina para melhorar a combustão em veículos, resultando em menor emissão de dióxido de carbono para reduzir os gases de efeito estufa na atmosfera. A fermentação etanólica utiliza monômeros de glicose e frutose que podem ser extraídos da matéria-prima cana-de-açúcar no formato de sacarose. Grande parte dos açúcares totais fornecidos pela cana-de-açúcar são facilmente metabolizados pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* sp., contudo, uma pequena fração na ordem de 4 g.L⁻¹ é formada por polissacarídeos e oligossacarídeos infermentescíveis pelos microrganismos do estudo em questão. A otimização do processo fermentativo aplicando enzimas capazes de converter polissacarídeos e oligossacarídeos em açúcares fermentescíveis pode incrementar a produção de etanol de cana-de-açúcar, possibilitando que as Usinas Brasileiras alcancem maiores ganhos financeiros e ambientais, com a mesma quantidade de matéria-prima e sem aumentar a área plantada. O objetivo do presente trabalho foi analisar com ferramentas estatísticas os resultados da aplicação industrial de um preparado enzimático contendo atividade de carboidrases para transformação dos açúcares não fermentescíveis pelas leveduras *Saccharomyces*, utilizando como substrato o mosto de duas Usinas de cana-de-açúcar na região sudeste do Brasil. Foram avaliados diferentes períodos com intervalos de aplicação, definidos como tratamento com a aplicação das enzimas e controle, na ausência de enzimas, a fim de investigar a ação das enzimas diante das múltiplas instabilidades peculiares desta indústria. Os resultados indicaram que o preparado enzimático foi capaz de aumentar a concentração de glicose disponível, contribuindo com o processo fermentativo e podendo gerar acréscimo de 5739 litros por dia em uma Usina com capacidade de moagem de 26 mil toneladas de cana-de-açúcar por dia operada em modo batelada e outros 2448 litros por dia de etanol com processo contínuo e capacidade de moagem de 15 mil toneladas de cana por dia. Estes resultados oferecem um potencial de entrega superior a R\$ 950 mil para a usina operada em modo batelada e adicionais R\$ 405 mil para a usina operada em modo contínuo, considerando uma safra com 200 dias de operação.

Palavras-chave: Fermentação Etanólica; Enzimas; Carboidrases; Oligossacarídeos; Polissacarídeos.

ABSTRACT

Currently, the most part of energy world's needs are based on the use of fossil fuels. The rapid growth in both global energy demand and carbon dioxide emissions associated with the use of these fuels has driven production through alternative sources, which are renewable and have less environmental impact. Ethanol is considered one of the best biofuels for transportation, as it can be burned directly or mixed with gasoline to improve combustion in vehicles, resulting in lower carbon dioxide emissions to reduce greenhouse gases in the atmosphere. Ethanol fermentation uses glucose and fructose monomers that can be extracted from the raw material sugarcane in the form of sucrose. Most of the total sugars supplied by sugarcane are easily metabolized by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* sp., however, a small fraction in the order of 4 g.L⁻¹ is made up of polysaccharides and oligosaccharides not fermentable by the microorganisms of the study in question. The optimization of the fermentative process by applying enzymes capable of converting polysaccharides and oligosaccharides into fermentable sugars can increase the production of sugarcane ethanol, enabling Brazilian plants to achieve greater financial and environmental gains, with the same amount of raw material and without increasing the planted area. The objective of the present work was analyze, with statistical tools, the results of the industrial application of an enzymatic preparation containing activity of carbohydrases for transformation of non-fermentable sugars by the yeasts *Saccharomyces*, using as a substrate the must of two sugarcane plants in the southeastern region of Brazil. Different periods with application intervals defined as treatment with the application of enzymes and control, in the absence of enzymes, in order to investigate the action of enzymatic preparation above multiple peculiar instabilities of this industry. The results indicated that the enzymatic preparation was able to increase the concentration of glucose available, contributing to the fermentation process and being able to generate an increase of 5739 liters per day in a Sugarcane Mill with crushing capacity of 26 thousand tons of sugarcane per day, operating in a batch mode and other 2448 liters of ethanol per day with continuous process and milling capacity of 15 thousand tons of cane per day. These results offer a delivery potential over than R\$ 950 thousand for the plant operated in batch mode and an additional R\$ 405 thousand for the plant operated in continuous mode considering a season working 200 days.

Keywords: Ethanol fermentation; *Enzymes*; *Carbohydrases*; *Oligosaccharides*, *Polysaccharides*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aurícula, bainha e colmo de cana-de-açúcar.	21
Figura 2. A) Divisão da cana-de-açúcar em (a) ponta com folhas verdes e (b) caules maduros. (B) Divisão da cana-de-açúcar em (a) pontas verdes, (b) região de crescimento apical, os caules estão também subdivididos em colmos e nós.	25
Figura 3. Mecanismo de conversão da sacarose em homólogos de kestose pela ação da β -frutofuranosidase.	28
Figura 4. Fluxograma simplificado de uma unidade produtora de açúcar e bioetanol a partir da cana-de-açúcar.	32
Figura 5. Configuração do processo de produção contínuo.	34
Figura 6. Configuração do processo em batelada.	36
Figura 7. Fluxograma dos Subprodutos gerados na produção de bioetanol a partir da cana-de-açúcar no Brasil.	37
Figura 8. Hidrólise do amido por amilases com diferentes especificidades.	42
Figura 9. Hidrólise da molécula de hemicelulose pelo complexo de xilanases.	43
Figura 10. Hidrólise da molécula de celulose pelo complexo de celulasas.	45
Figura 11. Análise das triplicatas de processo contendo vinho centrifugado caracterizado controle, aplicação de 30 mg.L^{-1} e aplicação de 150 mg.L^{-1} do complexo enzimático.	47
Figura 12. Ponto de aplicação do preparado enzimático no processo industrial de produção de bioetanol utilizando cana-de-açúcar como matéria-prima.	49
Figura 13. Ponto de aplicação do preparado enzimático na saída do trocador de calor em duas aplicações de escala industrial.	50

Figura 14. Linha do tempo de aplicação industrial do preparado enzimático em duas Usinas com diferentes estratégias tecnológicas de produção de etanol em 2019.	51
Figura 15. Estratégia de preparação das amostras para cálculo da taxa de performance industrial (TPI).	56
Figura 16. Hidrólise enzimática em triplicata do vinho bruto centrifugado para cada tratamento em diferentes dias com os respectivos desvios padrões.....	60
Figura 17. Teores de glicose e frutose em função dos períodos de aplicação e controle realizados em escala industrial com Fermentação em Batelada para produção de etanol de cana-de-açúcar.....	65
Figura 18. Teores de glicose e frutose em função dos períodos de aplicação e controle realizados em escala industrial com Fermentação Contínua para produção de etanol de cana-de-açúcar.....	70
Figura 19. Valores de glicose liberada (g.L-1) nos processos fermentativos Batelada (esquerda) e Contínuo (direita), aplicando o conceito de Taxa de Performance Industrial (TPI).	72
Figura 20. Análise univariável dos tratamentos enzimáticos nos dois processos fermentativos (batelada e contínuo) de acordo com o método de comparação de médias de Tukey-Kramer.....	74
Figura 21. Equação geral de Gay-Lussac para fermentação etanólica.	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química da cana-de-açúcar e respectivo caldo, em grama por 100 g (%massa/massa, base úmida).	23
Tabela 2. Distribuição dos oligossacarídeos primários e secundários nos diferentes tecidos de cana-de-açúcar.....	27
Tabela 3. Procedimentos analíticos realizados durante amostragens do processo de produção de bioetanol.	53
Tabela 4. Detalhamento dos parâmetros críticos para monitoramento da estabilidade da fermentação.....	54
Tabela 5. Concentração de glicose, frutose e sacarose de hidrólise enzimática realizada nas amostras de vinho bruto em escala de laboratório e seus desvios padrões.....	59
Tabela 6. Teores de substrato, bioprodutos e subprodutos de vinho bruto de processo industrial de etanol operado em modo batelada após os tratamentos com e sem adição de preparado enzimático.	63
Tabela 7. Teores de substrato, bioprodutos e subprodutos de vinho bruto de processo industrial de etanol operado em modo contínuo após os tratamentos com e sem adição de preparado enzimático	67
Tabela 8. Análise da glicose liberada em processo de produção de etanol operado em modo batelada e contínuo.	73
Tabela 9. Parâmetros industriais referentes às análises microbiológicas, consumos específicos de insumos, parâmetros físico-químicos, gestão industrial e qualidade da matéria-prima em uma Usina com modo de produção em batelada.	77

Tabela 10. Parâmetros industriais referentes às análises microbiológicas, consumos específicos de insumos, parâmetros físico-químicos, gestão industrial e qualidade da matéria-prima em uma Usina com modo de produção contínuo.	80
Tabela 11. Avaliação de custos das aplicações de preparado enzimático em processo batelada e contínuo de produção de bioetanol.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS

°BRIX	Grau Brix é uma escala numérica de índice de refração
ARRT	Açúcar redutor residual total
ART	Açúcar redutor total
C3	Processo fotossintético de carboxilação composto de 3 carbonos
C4	Processo fotossintético de carboxilação composto de 4 carbonos
CAPEX	Despesas de capital ou investimento em bens de capital
CEP	Controle Estatístico de Processo
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CO₂	Dióxido de carbono
DP	Grau de polarização
GF2	Frutooligossacarídeo composto por uma glicose e duas frutoses
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
IBC	Container de 1000 litros
pH	Potencial hidrogeniônico
PMGCA	Programa de monitoramento genético da Cana-de-açúcar
PNA's	Polissacarídeo não amiláceo solúvel
ppm	Partes por milhão
rpm	Rotações por minuto
TPI	Taxa de Performance Industrial

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
2.	OBJETIVO	20
2.1.	Objetivo Geral	20
2.2.	Objetivos Específicos.....	20
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
3.1.	Estrutura e composição química da cana-de-açúcar	21
3.2.	Síntese e distribuição de oligossacarídeos em cana-de-açúcar	24
3.3.	Deterioração da cana-de-açúcar.....	29
3.4.	Processo industrial de produção de bioetanol	31
3.5.	Cana-de-açúcar como matéria-prima e seus derivados.....	36
3.6.	Aplicação de enzimas em processo fermentativo de produção de bioetanol.....	38
3.6.1.	Carboidrases.....	40
3.6.2.	Amilases	40
3.6.3.	Xilanases	42
3.6.4.	Celulases	44
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
4.1.	Aplicação do preparado enzimático em laboratório (pré-teste industrial).....	46
4.2.	Aplicação industrial do preparado enzimático contendo atividade de Carboidrases. 48	
4.3.	Amostragem em processo industrial de produção de bioetanol.....	51

4.4. Análise dos parâmetros industriais	53
4.5. Obtenção da Taxa de Performance Industrial (TPI).....	54
4.6. Análise Estatística.....	56
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1. Avaliação do ensaio de liberação de glicose em escala de laboratório (pré-teste industrial).....	58
5.2. Avaliação da liberação de glicose em processo de produção de bioetanol em escala industrial	61
5.3. Avaliação de ensaio de processo de produção de bioetanol em escala industrial operado em modo batelada.....	63
5.4. Avaliação de ensaio de processo de produção de bioetanol em escala industrial operado em modo contínuo.....	66
5.5. Análise da Taxa de Performance Industrial (TPI).....	70
5.6. Avaliação de indicadores de desempenho do processo fermentativo de produção de bioetanol em resposta à aplicação de preparado enzimático	75
5.7. Avaliação do potencial de agregação de valor e definição de custo da aplicação de preparado enzimático no processo fermentativo de produção de bioetanol.....	82
6. CONCLUSÕES	87
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
APÊNDICE A. Metodologia de Análises Laboratoriais	97
APÊNDICE B. Tabela 6. Teores de substrato, bioprodutos e subprodutos de vinho bruto do processo industrial operado em modo batelada	102

APÊNDICE C. Tabela 7. Teores de substrato, bioprodutos e subprodutos de vinho bruto do processo industrial operado em modo contínuo	103
---	-----

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, sendo que na safra de 2019/2020 foram produzidos 642 milhões de toneladas de cana (CONAB, 2020), e atrai interesse mundial devido à diversidade de produtos que dela podem ser produzidos. O etanol derivado de cana-de-açúcar apresenta-se como alternativa energética aos combustíveis derivados do petróleo, por ser uma fonte de energia renovável e menos poluente (MARQUES, 2013). O Brasil é o maior exportador de etanol do mundo, além de ser o segundo maior produtor, sendo os Estados Unidos o maior produtor da atualidade. Na safra de 2019/2020 foram produzidos no Brasil aproximadamente 35,6 bilhões de litros de etanol de cana-de-açúcar (CONAB, 2020).

O caldo de cana-de-açúcar processado pelas Usinas brasileiras é um composto bifásico sólido/líquido. Na porção sólida do caldo-de-cana podemos encontrar uma estrutura lignocelulósica complexa integrada por fibras celulósicas e lignina, ao passo que na porção líquida (caldo), formada por uma suspensão aquosa contendo uma grande variedade de compostos orgânicos e inorgânicos sendo que destes 90%, aproximadamente, são açúcares (MARQUES, 2013).

A mecanização da colheita de cana-de-açúcar proporcionou um novo patamar de produção de etanol de cana no Brasil, visto que acelerou a entrega de matéria-prima nas Usinas e permitiu a ampliação em escala na produção de etanol, no entanto houve também um acréscimo de impurezas vegetais e minerais chegando à indústria. O sistema de desponte e despalha dos colmos realizado pelas máquinas, somado ao prolongamento da safra, fez aumentar a quantidade de folhas, palha, terra e maturadores aplicados na cana,

resultando em grande quantidade de compostos fenólicos, amido e dextrana, prejudicando o processo fermentativo (ROVIERO, 2013).

Segundo relatado por Parazzi (2017), as pontas da cana apresentam composição variável em função do estágio de maturação, com pureza variando de 35 à 70%, enquanto o colmo apresenta pureza de 83 à 90%. Neste caso, as pontas, em condição de baixa maturação, apresentam elevados teores de açúcares redutores, aminoácidos, amido, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e polissacarídeos totais, além de menores teores de sacarose.

Alguns destes polissacarídeos e oligossacarídeos presentes no caldo de cana podem ser produzidos pela própria cana ou por reações de decomposição. Reações químicas, enzimáticas e microbiológicas estão envolvidas na deterioração da cana-de-açúcar e podem causar a formação de oligossacarídeos, como a 1-kestose, 6-kestose, neo-kestose, nistose, kestopentaose e outros oligossacarídeos intermediários na produção da dextrana, além disso, também pode ser formado o manitol pela ação de bactérias hetero-fermentativas (BORGES et al., 2014). Ainda segundo Borges (2014), os teores destes açúcares infermentescíveis para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* sp., objeto de estudo do presente trabalho, são da ordem de 4 kg.ton⁻¹ de cana o que pode afetar em até 1,8% o rendimento do processo fermentativo.

Desta forma, como a enzima invertase liberada naturalmente pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* sp. hidrolisa o dímero sacarose em monômeros fermentescíveis glicose e frutose, a aplicação de preparados enzimáticos contendo atividades de carboidrases pode ter potencial em converter a maioria daqueles polissacarídeos e oligossacarídeos, mencionados anteriormente, em açúcares facilmente metabolizáveis pelas leveduras (GIESE, 2011).

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

Através do desenvolvimento do presente projeto, foi avaliada a eficiência de um preparado enzimático em fase de desenvolvimento contendo atividade de carboidrases, produzido por uma empresa dinamarquesa, em processo industrial de produção de etanol visando o aumento da oferta de açúcares fermentescíveis (glicose e frutose), por meio da bioconversão destes originalmente presentes na matéria-prima em frações de polissacarídeos e oligossacarídeos fermentescíveis para o microrganismo *Saccharomyces cerevisiae* sp comercial.

2.2. Objetivos Específicos

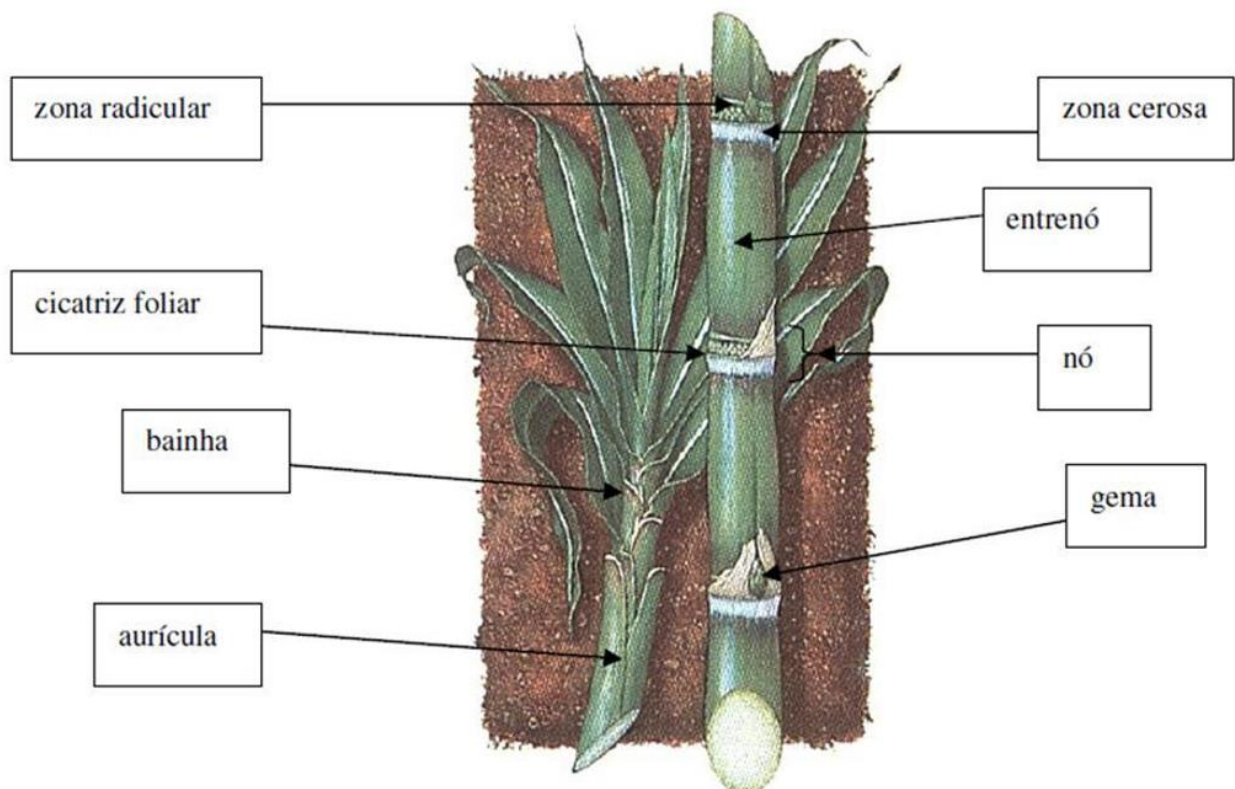
- Realizar ensaio preliminar de aplicação de preparado enzimático comercial em vinho contendo polissacarídeos oriundos de processo industrial de produção de etanol de cana-de-açúcar em escala de laboratório;
- Realizar ensaio de aplicação de preparado enzimático em mosto de processo de produção de etanol em escala industrial;
- Avaliar a eficiência do preparado enzimático no aumento do rendimento do processo fermentativo etanólico em escala industrial;
- Avaliar o custo e agregação de valor com aplicação do preparado enzimático em processo de produção de etanol em escala industrial.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Estrutura e composição química da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar, cujo nome científico é *Saccharum spp.*, corresponde a uma gramínea originalmente registrada como planta da Ásia Meridional e que pode atingir vários metros de altura. Fisicamente constituída por colmos e caules grossos e muito açucarados, possuindo poucas flores que se situam vigorosamente nas extremidades apicais e cujo aspecto são geralmente cinzento-prateadas (NÓBREGA, 2009) (Figura 1).

Figura 1. Aurícula, bainha e colmo de cana-de-açúcar.



Fonte: Nóbrega, 2009.

Até 2003, segundo o Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-açúcar (PMGCA), eram conhecidas 32 espécies de cana-de-açúcar catalogadas, sendo que todas as

variedades de cana que hoje são cultivadas para consumo industrial são híbridas, envolvendo o uso de linhagens obtidas através do cruzamento de duas ou mais espécies diferentes do gênero *Saccharum*. Cesar (2013) complementa que *Saccharum spontaneum* é uma espécie tão polimórfica que apenas na Índia são conhecidas mais de 300 ecotipos e uma vez que este cultivo está presente em áreas latifundiárias de aproximadamente 30 países, as possíveis combinações podem dar origem a milhares de híbridos morfológicamente semelhantes.

De acordo com Gomes (2003), a morfologia da cana-de-açúcar é formada por colmos em formatos cilíndricos intercalados por nós e entrenós. Os entrenós (também conhecidos como internódio, gomo ou meritalo) são macios e acumulam a maior parte da sacarose, principal açúcar encontrado na planta. Os nós, estruturalmente mais duros, apresentam concentrações inferiores de sacarose e possuem importantes características para identificação das variedades, tais como: cicatriz foliar, gemas, região radicular e região cerosa ou glauca. Na extremidade superior dos colmos ainda estão presentes a aurícula e a bainha. Em todo Brasil é possível encontrar cultivos de cana-de-açúcar em função da sua grande capacidade de adaptação a climas e solos diferentes (NÓBREGA, 2009).

A composição química da cana varia em função das diferentes regiões açucareiras, nas diferentes localidades de uma mesma região e nos distintos anos na mesma localidade, por influência da variedade, idade, sanidade, tratamentos culturais, clima, solo, temperatura, umidade, precipitação pluvial, adubação, dentre outros, o que não permite citar números que representem uma composição química universal (Tabela 1).

De acordo com Nóbrega (2009), a sacarose é o componente que mais interessa à produção do açúcar, do etanol e da cachaça, sendo que quanto mais elevado for o teor desse dissacarídeo, mais elevado será o rendimento agroindustrial destes bioprodutos.

O maior teor de sacarose é alcançado em plena maturação, motivo pelo qual é importante para os bons resultados da transformação desta matéria-prima em etanol, saber quando a cana-de-açúcar está totalmente madura no campo antes da colheita.

Tabela 1. Composição química da cana-de-açúcar e respectivo caldo, em grama por 100 g (%massa/massa, base úmida).

Componente	Percentual	Subcomponente	Percentual
Açúcares presentes em cana-de-açúcar	15-23	Sacarose	14-23
		Dextrose (glicose)	0,3-1,1
		Levulose (frutose)	0,0-0,7
Não-açúcares presentes em cana-de-açúcar	1,5-2,5	Matérias nitrogenadas, aminoácidos, sais minerais, substâncias pécticas, gomas, mucilagens, ácidos livres, materiais corantes, gorduras e ceras	1,5-2,5
Caldo de cana-de-açúcar	86-92	Água	75-82
		Sólidos em solução (°Brix)	18-25
Fibra de cana-de-açúcar	8-14	-	-

Fonte: adaptado de Nóbrega, 2009.

Stupiello (2000) afirma que as pontas das canas podem apresentar diferentes concentrações de açúcares redutores, aminoácidos, amido, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e polissacarídeos totais em função do nível de maturação, sendo que o teor de polissacarídeos é maior em cana imatura do que na cana-de-açúcar madura. O processo de degradação da cana-de-açúcar promove a ação de enzimas transferases específicas da própria cana convertendo sacarose em oligo e polissacarídeos, além de abrir caminho para ação de microrganismos cujas ações podem contribuir com o aumento destes compostos na matéria-prima (RAMOS; RAVELO, 2009).

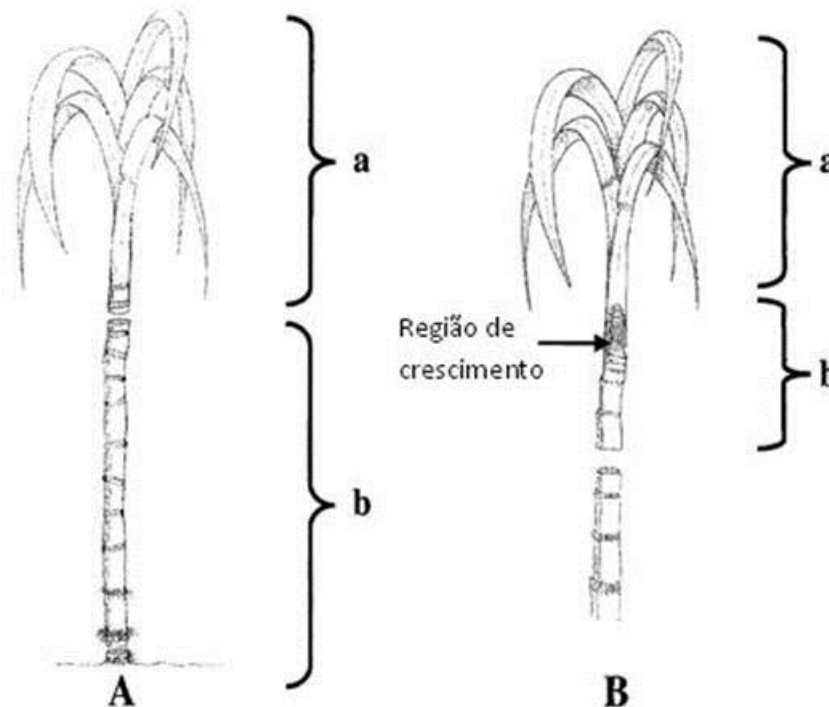
O mosto pode ser constituído por uma mistura de água, caldo e melaço, ou mel dependendo do termo local. Em destilarias autônomas, não há fábrica de açúcar, e portanto, o mosto de fermentação é exclusivo de caldo de cana e água. Já em usinas com destilaria

anexa, o melaço é um subproduto obtido através da centrifugação das massas cozidas na fabricação de açúcar e que não se pode mais extrair os cristais de sacarose (LIMA et al., 2001). De acordo com Gomes (2011) o melaço apresenta densidade em torno de $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ e é rico em açúcares fermentescíveis, caracterizando uma boa fonte de carbono para o metabolismo microbiano, além de importantes macronutrientes como nitrogênio e fósforo e também micronutrientes fundamentais durante a fermentação, tais cálcio, magnésio, zinco, manganês, cobre e ferro (CAZETTA, 2005).

3.2. Síntese e distribuição de oligossacarídeos em cana-de-açúcar

Eggleston (2003) realizou a distribuição dos oligossacarídeos na planta de cana-de-açúcar, considerando as distintas áreas do seu tecido: as folhas, a região do ponto de crescimento (parte superior imatura do pedúnculo) e o caule com pedúnculo médio e pedúnculo inferior caracterizado pelos internódos do talo (Figura 2).

Figura 2. A) Divisão da cana-de-açúcar em (a) ponta com folhas verdes e (b) caules maduros. (B) Divisão da cana-de-açúcar em (a) pontas verdes, (b) região de crescimento apical, os caules estão também subdivididos em colmos e nós.



Fonte: Eggleston, 2003.

Os principais oligossacarídeos presentes nas regiões do caule e topos (incluindo folhas, ponto de crescimento e gema apical logo abaixo) são a maltose, 1-kestose, 6-kestose e neo-kestose (EGGLESTON, 2003), Borges et al. (2014) ainda complementa com nistose, kestopentose e outros oligossacarídeos intermediários na produção de dextrana pela enzima dextransucrase. Ainda segundo Borges (2014) o Manitol pode ser formado devido à ação de bactérias heterofermentativas como é o caso da *Leuconostoc*, sendo esta substância um excelente indicador de deterioração da cana-de-açúcar, o autor ainda realça que além da dextrana, manitol e ácidos orgânicos, a enzima dextransucrase pode produzir a leucrose, palatinose e outros isomalto-oligossacarídeos que são intermediários na reação de formação da dextrana. Em plantas, os oligossacarídeos podem ser classificados como

primários ou secundários (KANDLER; HOPF, 1980). Os oligossacarídeos primários são sintetizados “*in vivo*” a partir de um monossacarídeo ou oligossacarídeo e um doador de glicosil pela ação de uma glicosiltransferase. Os oligossacarídeos secundários surgem da hidrólise de oligossacarídeos superiores, polissacarídeos, glicoproteínas e glicolipídios “*in vivo*” ou “*in vitro*”. Há dois caminhos de carboxilação, fixação do carbono proveniente do CO₂ atmosférico pelas plantas, um deles tem início com um composto de três carbonos e por isso é chamado via C3 e está presente em plantas como soja, milho, feijão e árvores, já o segundo, presente principalmente em gramíneas como cana-de-açúcar, milho e parte das bromélias, possuem um sistema complementar a via C3, chamado via C4, através do qual o sistema de armazenamento nas folhas permite fixar ácidos de quatro carbonos antes da utilização pela fotossíntese (BUCKERIDGE et al., 2009). As kestoses (GF2) são trissacarídeos conhecidos em gramíneas C3 e são geralmente oligossacarídeos secundários formados a partir da clivagem de polímeros de frutano pela ação de invertases β -frutofuranosidases ou homólogos de oligossacarídeos superiores, embora em algumas plantas não sejam acompanhados por homólogos mais altos (KANDLER; HOPF, 1980) e sejam, portanto, oligossacarídeos primários. Na cana-de-açúcar, uma planta C4, há indícios de que o trissacarídeo kestose (GF2) deve ser um oligossacarídeo primário com frutanos associados, sendo que derivados da sacarose não foram relatados, embora um “frutano” que clive enzimaticamente em frutose e galactol tenha sido relatado (RODRIGUEZ; VICENTE 1990). A função da kestose na cana-de-açúcar ainda é desconhecida; eles podem ser carboidratos de armazenamento ou oferecer proteção contra a deterioração por geada (LEVITT, 1980). 1-Kestose é o isômero de trissacarídeo Kestose mais abundante tanto no caule como no topo, sendo que predominantemente eles aparecem em maior concentração nos topos do que caules (Tabela 2) (EGGLESTON, 2003).

Tabela 2. Distribuição dos oligossacarídeos primários e secundários nos diferentes tecidos de cana-de-açúcar.

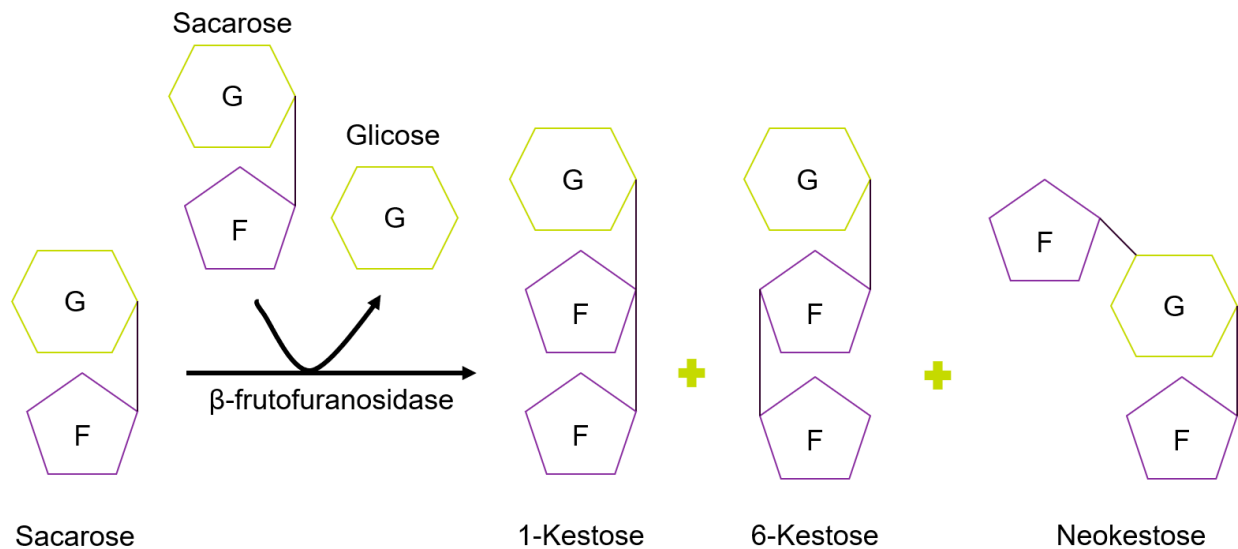
Tecido	Concentração de Oligossacarídeos (ppm ^a)			
	Maltose	1-kestose	6-kestose	Neo-kestose
Caule (colmo)	103,5	227,5	62,2	49,0
Topo (folhas)	793,5	627,3	132,5	140,9

^aMédia de triplicatas para duas variedades de cana, HoCP 85-153 e LCP 82-89.

Em geral, as folhas e as regiões dos pontos de crescimento apresentaram quantidades mais altas de oligossacarídeos (principalmente com 2 a 4 graus de polimerização, DP) do que nas porções média ou basal dos talos, e isso foi constatado em duas variedades de cana: LCP 82-89 e LCP 83-153.

Compreende-se por cana danificada aquela que é entregue na usina contendo caules verdes e grande quantidade de folhas carregando para o processo trissacarídeos de kestose (MOREL DU BOIL, 1991) responsáveis pela deformação da forma de cristal no processo da unidade de cristalização. A cana danificada contém outras impurezas, como cinzas inorgânicas, compostos formadores de cor e polissacarídeos que também são prejudiciais no processamento industrial. A Figura 3 ilustra o mecanismo de conversão da sacarose em 1-kestose, 6-kestose e neokestose pela ação de invertases (β -frutofuranosidases) capazes de catalisar reações de transfrutossilacção com sacarose se as concentrações da mesma são altas o suficiente para produzir vários oligossacarídeos de kestose dos quais 1-kestose é a mais prevalente (POLLACK, 1991; FARINE, 2001). Os resultados também sugerem que outras enzimas transfrutossilantes podem estar presentes nas folhas e nas regiões de ponto de crescimento da cana-de-açúcar.

Figura 3. Mecanismo de conversão da sacarose em homólogos de kestose pela ação da β -frutofuranosidase.



Fonte: Adaptado de Chen, 2015.

A maltose é um dímero secundário da cana-de-açúcar resultante da decomposição da molécula de amido. O amido é um polissacarídeo de armazenamento temporário em cana-de-açúcar formado nas folhas via fotossíntese. Geralmente é clivado nas folhas durante a noite, e isso explica o nível quase oito vezes mais alto de maltose nos topos do que os caules (Tabela 2).

Além disso, mais oligossacarídeos de maior concentração e massas moleculares foram detectados nas folhas do que na região do ponto de crescimento. Isso confirma que os topos que incluem folhas e regiões de pontos de crescimento, contêm a maior parte oligossacarídeos associados à cana fresca. Isso não é totalmente surpreendente, pois as folhas e regiões de pontos de crescimento são mais ativas fisiologicamente e têm muito mais atividade enzimática associada a eles, particularmente invertases (RAVELO et al., 1995).

Embora se soubesse anteriormente que havia maiores concentrações de polissacarídeos nas folhas e no topo da cana-de-açúcar do que nos caules (EGGLESTON, 2003), o importante é identificar quais oligossacarídeos são mais abundantes nas folhas, na região do ponto de crescimento e no caule da cana-de-açúcar para que, a medida que grandes frações de cada uma destas partes da biomassa forem processados pela indústria, os gestores possam decidir as corretas estratégias operacionais para minimizar os impactos negativos na fábrica de açúcar e destilaria.

3.3. Deterioração da cana-de-açúcar

Deterioração da cana-de-açúcar no campo, transporte, pátio de armazenamento na indústria ou mesmo durante os processos de usinagem, tornou-se um tópico de grande preocupação nos últimos anos, uma vez que a colheita mecanizada de cana-de-açúcar aumentou drasticamente. Reações de decomposição da sacarose em cana-de-açúcar sob o processo de deterioração incluem produtos químicos (ácidos, álcalis e sais) e reações de inversão enzimática, e podem ser influenciados pelas condições de saúde da cana ou fatores ambientais.

Especialistas do açúcar como Eggleston et al., 2001; Lionnet, 1996; Morel du Boil, 1995, relataram uma variedade de produtos de deterioração da cana-de-açúcar para confirmar a deterioração em função do atraso no processamento (tempo de queima), que foram utilizados para prever e controlar problemas de processamento na fábrica. Tal deterioração de produtos incluíram altas concentrações invertidas, contaminação microbiana (leveduras, bactérias e fungos) (por exemplo, concentrações de etanol e ácido láctico) e polissacarídeos, mas nem todos os produtos de deterioração afetam os processos

da fábrica. Lionnet (1996) afirmou que uma deterioração da cana-de-açúcar “só terá seu impacto analisado se estiver relacionado a algum aspecto das operações da fábrica”.

Segundo Araújo (2017), açúcares redutores como glicose e frutose presentes no caldo de cana-de-açúcar podem ser decompostos dando origem a compostos de cor escuro intensa, complexos de condensação coloidal e substâncias melacigênicas (melanoidinas), escurecendo e influenciando negativamente os cristais de sacarose, essa transformação caracteriza a Reação de Maillard. A reação de Maillard ocorre em meio alcalino na presença de açúcares redutores (cetose, aldose) e grupos amino livres (aminoácido, proteína), e são rapidamente acelerados com o aumento da temperatura além de ocorrerem durante o tempo de armazenagem.

Polissacarídeo de dextrana (formado principalmente por bactérias do gênero *Leuconostoc*) tem sido frequentemente relatado como um indicador de deterioração e é responsável por muitos impactos negativos que a deterioração da cana-de-açúcar tem no processamento de fábrica, principalmente associado ao aumento da viscosidade deste polissacarídeo. Oligossacarídeos também são produtos de deterioração da cana-de-açúcar (EGGLESTON et al., 2001; MOREL DU BOIL, 1995; RAVELO et al., 1995) e são responsáveis por problemas associados pela deformação de cristais (MOREL DU BOIL, 1991). Ravelo et al. (1991) relataram que a formação de oligossacarídeos foi maior que a formação de dextrana e etanol na cana-de-açúcar sujeita a atrasos e é, portanto, um indicador mais sensível da deterioração da cana.

Não existem muitos trabalhos disponíveis na literatura para esclarecer com exatidão as contribuições relativas de agentes microbianos, enzimáticos, e reações químicas às perdas de sacarose na cana-de-açúcar deterioração à temperatura ambiente de fábrica. Isso ocorre em parte porque as medições imprecisas de pureza usando rotação óptica

(referida como “*pol*” no açúcar indústria) têm sido usadas com muita frequência para avaliar perdas de sacarose (LIONNET, 1996).

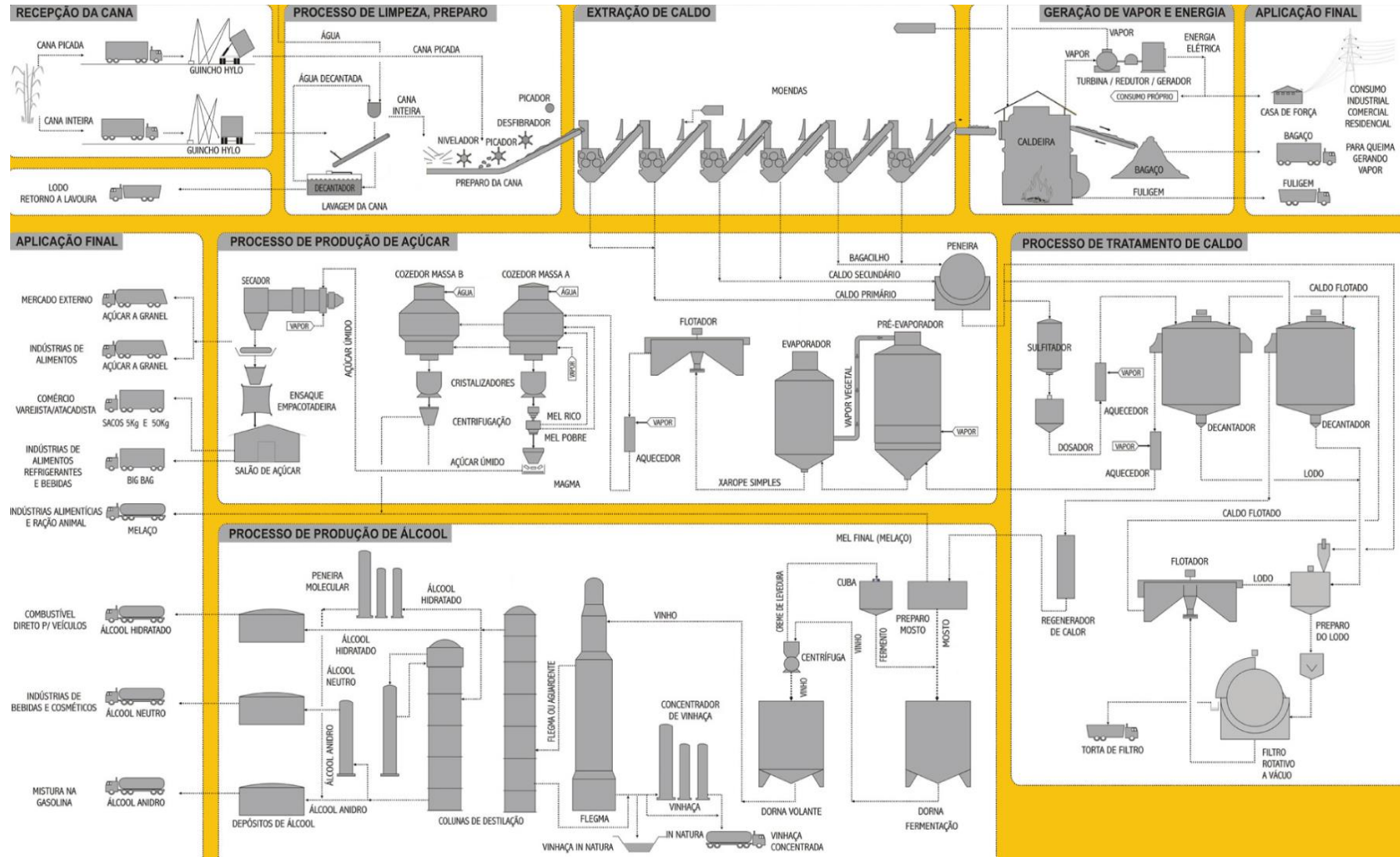
3.4. Processo industrial de produção de bioetanol

O setor sucroenergético Brasileiro utiliza a cana-de-açúcar para produção de açúcar abastecendo o mercado alimentício, bioetanol anidro, compondo até 27% da fração combustível adicional à gasolina comum e o bioetanol hidratado, atendendo o mercado de veículos *flex* (movidos a etanol e gasolina) além de um pequeno mercado de usos não energéticos (SANTOS et al., 2013). Neste processo de produção de açúcar e bioetanol, as etapas industriais são semelhantes ao reportado na Figura 4.

Após a colheita, a cana-de-açúcar é transportada para as Usinas e direcionada para a etapa inicial de preparo e extração do caldo, geralmente composta por um conjunto de quatro a sete ternos de moendas (BNDES; CGEE, 2008). O caldo, contendo os açúcares, é extraído e a fibra (bagaço) é destinada às caldeiras para geração de energia termoelétrica e vapor para suprir as operações unitárias da indústria.

O caldo ao sair do processo de extração, seja ele por moenda ou difusor, segue para as etapas de tratamento que incluem ações físicas (peneiramento, aquecimento, flasheamento) e químicas (reações de polimerização de impurezas e purificação dos cristais de açúcar promovidos por produtos químicos e polímeros), com o objetivo de eliminar não açúcares, coloides, turbidez e cor (SANTOS et al., 2013).

Figura 4. Fluxograma simplificado de uma unidade produtora de açúcar e bioetanol a partir da cana-de-açúcar.



Fonte: Serquímica, 2020.

Após o tratamento químico, o caldo é aquecido para reduzir a carga de microrganismos contaminantes além de completar as reações químicas com o agente alcalinizante, coagulação, flocular as impurezas insolúveis e remover os gases. Logo após, o caldo passa pelo processo de decantação onde ele é clarificado e as impurezas dão origem ao lodo. O lodo é adicionado de bagacilho e filtrado para recuperação da sacarose ainda contida nele, enquanto a torta de filtro residual é utilizada na própria lavoura como adubo.

O caldo passa pelos evaporadores múltiplo efeito para ser concentrado e cozedores para cristalizar a sacarose. Nesse processo, para aumentar a cristalização, a solução residual rica em sacarose (mel) pode retornar mais de uma vez com o propósito de recuperar mais açúcar. O mel final, chamado melaço, é formado quando não se pode mais retornar a solução para os cozedores e caracteriza-se pela presença de pouca sacarose e elevados teores de açúcares redutores, sais e açúcares infermentescíveis para as leveduras, sendo aproveitado no parque fermentativo para produção de etanol (SANTOS et al., 2013).

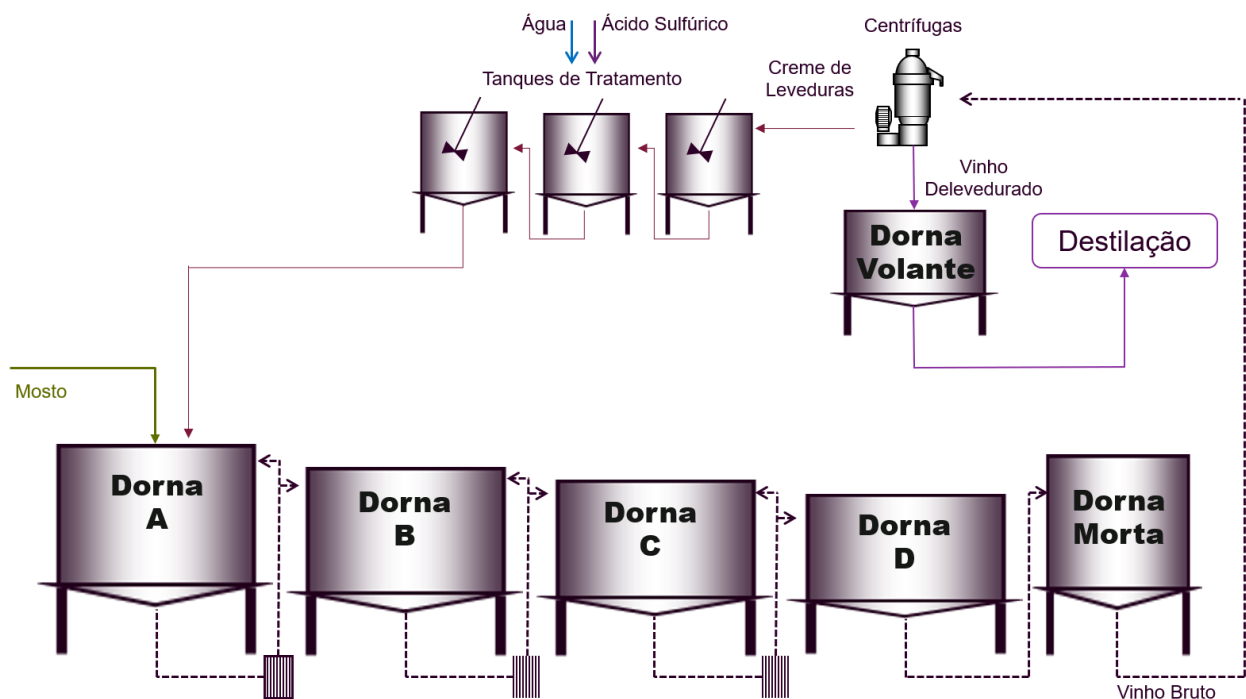
No processo de produção de etanol, a fermentação tanto pode ser realizada utilizando diretamente o caldo como misturas de caldo e melaço dando origem ao mosto que segue para as dornas de fermentação, onde é adicionado às leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) e fermentado por um período de 6 a 10 horas, dando origem ao vinho bruto (mosto fermentado) com concentrações de 7% a 12% de álcool (SANTOS et al., 2013).

As centrífugas realizam a separação do vinho bruto em vinho de levedurado e creme de levedura, além de extraírem mecanicamente grande parte da contaminação bacteriana do ecossistema fermentativo, uma vez que estes contaminantes saem preferencialmente com o vinho centrifugado e são enviados para a destilaria, contribuindo de certa forma com a desinfecção industrial. O creme de levedura é posteriormente conduzido ao tratamento ácido nos pré-fermentadores, amplamente conhecidos como “cubas”.

A escolha da tecnologia usada na produção do bioetanol passa por avaliações técnico-econômicas que atendam as expectativas dos produtores, uma vez que os valores de CAPEX (investimentos em bens de capital) podem ser bastante diferentes de acordo com a configuração de processo. No caso da tecnologia para o processo de fermentação a partir do melaço e caldo de cana-de-açúcar para produção de etanol, existem significativas diferenças em função de alguns parâmetros adotados como produção contínua, batelada e dezenas de formulações que possam surgir destas duas (LORA; VENTURINI, 2012).

Lora e Venturini (2012) definem que o processo de produção operado em modo contínuo, comparado com as outras tecnologias de fermentação, apresenta como principais características o menor investimento, elevada produtividade, bom rendimento, porém com elevado consumo de potência, custos de manutenção e operação. A Figura 5 mostra uma representação esquemática desta configuração.

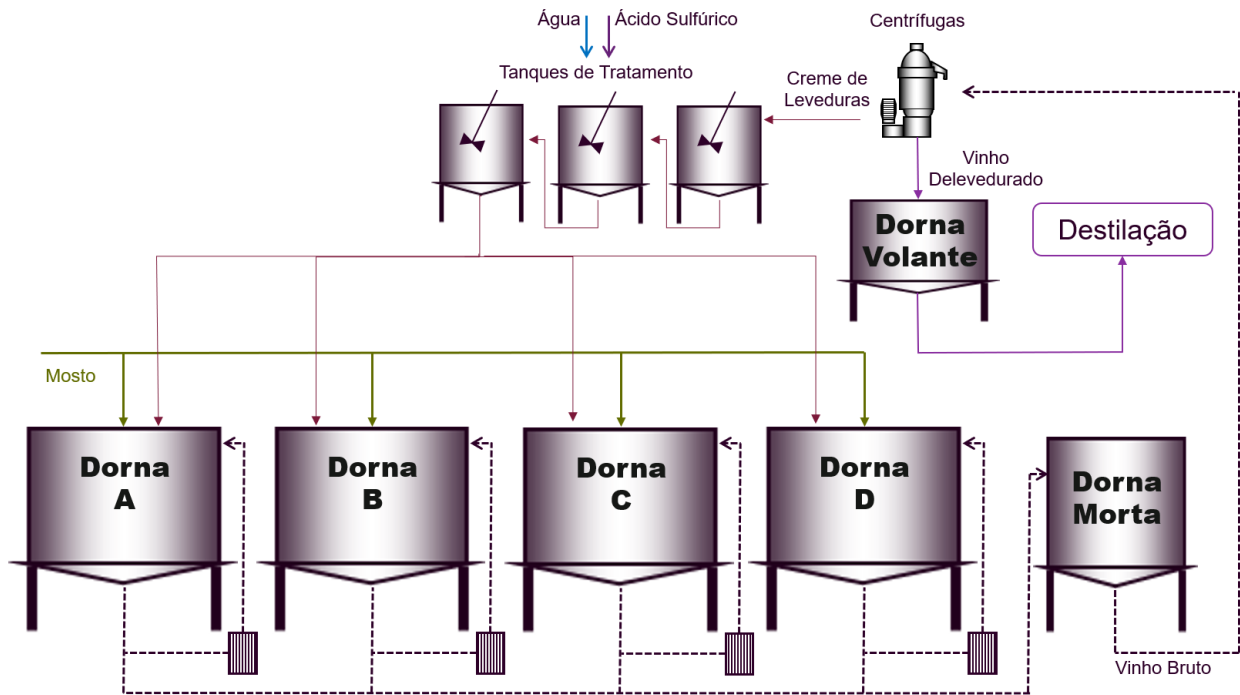
Figura 5. Configuração do processo de produção contínuo.



Fonte: Adaptado de Lora e Venturini, 2012.

No entanto, a tecnologia fermentativa mais adotada pelas Usinas da indústria sucroenergética é o processo de fermentação em batelada com recirculação das leveduras após tratamento ácido. Neste processo, uma série de biorreatores, usualmente chamados de dornas, alimentam um conjunto de centrífugas, e uma produção semi-contínua de vinho é obtida em um reservatório que alimenta a destilaria. Cada dorna é preenchida e esvaziada a cada nova batelada, o sistema de limpeza é mais fácil e, conseqüentemente, tende a trabalhar com mais baixo índice de infecção microbológica. No entanto, pode possuir produtividade inferior e maior custo de investimento que o processo contínuo, visto que exige maior quantidade de dornas, tubulações, válvulas, trocadores de calor, centrífugas e sensores de controle dedicados. Parte do concentrado de leveduras é tratada com ácido sulfúrico para regenerar sua atividade biológica e ser utilizada como cultivo em uma nova fermentação. Deste modo é reduzido o consumo de substrato e se incrementa os rendimentos de etanol por quilo de substrato, além de diminuir o tempo de fermentação o que propicia um maior percentual alcoólico no vinho fermentado, este processo é ilustrado através da Figura 6 (LORA; VENTURINI, 2012).

Figura 6. Configuração do processo em batelada.



Fonte: Adaptado de Lora e Venturini, 2012.

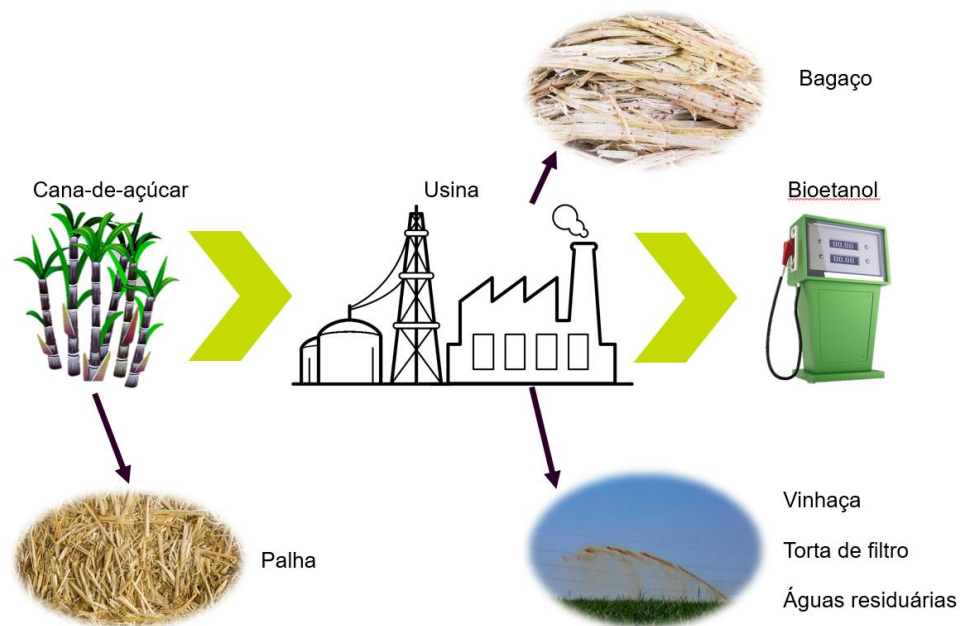
3.5. Cana-de-açúcar como matéria-prima e seus derivados

O aumento da produção de etanol para atender as demandas interna e externa promoveu crescimento das plantações que causam uma enorme produção de resíduos como bagaço e vinhoto. Há também outros subprodutos originados em grande volume na indústria sucroenergética como a palha proveniente da matéria-prima: bagaço gerado na extração do caldo; mel final após esgotar a recuperação do açúcar na fábrica; vinhaça e torta de filtro são resíduos de alto potencial poluidor, provenientes respectivamente da destilação para recuperação do álcool e clarificação do mosto para fermentação (BONASSA, 2015).

Deste modo, pode-se aproveitar praticamente tudo da cana-de-açúcar. Do bagaço, originado da cana-de-açúcar, obtém-se a biomassa utilizada pela própria usina e em termoelétricas para geração de vapor e energia elétrica, além de um hidrolisado usado na alimentação animal, diversos tipos de papéis, fármacos e produtos como furfural, de alta

reatividade, para síntese de compostos orgânicos, com grande número de aplicações na indústria química e farmacêutica. Do melaço, originado no processo de produção de açúcar, pode ser utilizado com matéria prima para produção de ácido cítrico, ácido láctico, etanol, glutamato monossódico, além do levedo. Do etanol, podem ser fabricados polietileno, estireno, cetona, acetaldeído, poliestireno, ácido acético, éter, acetona e grande número de produtos que são obtidos a partir do petróleo. A vinhaça diluída (vinhoto), efluente oriundo do processo de destilação de vinho fermentado pode ser utilizada como fonte de matéria orgânica para produção de biometano, biogás, e também como fertilizante na cultura da cana-de-açúcar, em operação denominada fertirrigação. Existem ainda, outros derivados, destacando-se dextrana, xantana, sorbitol, glicerol, cera refinada de torta, antifúngicos, dentre outros. A Figura 7 apresenta o fluxo de aproveitamento da cana-de-açúcar e seus principais subprodutos durante a produção de etanol.

Figura 7. Fluxograma dos Subprodutos gerados na produção de bioetanol a partir da cana-de-açúcar no Brasil.



Fonte: Adaptado de Bonassa et al., 2015.

3.6. Aplicação de enzimas em processo fermentativo de produção de bioetanol

A maioria dos produtos e bens consumidos pelo homem envolvem processos industriais com reações químicas, os quais muitas vezes os catalisadores químicos podem ser substituídos por enzimas. Desta forma, as enzimas são moléculas capazes de acelerar os processos químicos oferecendo a vantagem de serem ecologicamente mais viáveis (MONTEIRO; SILVA, 2009). Além disso, devido a sua alta especificidade, não prejudica o metabolismo das leveduras e possibilita melhorar a assimilação dos nutrientes, o que favorece o aproveitamento de íons, aminoácidos e energia. Refletindo na melhor eficiência produtiva, representando economia no custo final e benefícios ao meio ambiente (BARBOSA et al., 2014).

É produzida por fontes vegetais, animais e por microrganismos (fungos e bactérias), sendo a maioria adquirida por meio dos processos fermentativos (CAMPESTRINI et al., 2005). As características da enzima como temperatura e pH ideais, estabilidade e a composição dos ingredientes são fatores que influenciam os efeitos da adição de enzimas ao processo para biotransformação do substrato (CAMPESTRINI et al., 2005; PEIXOTO-NOGUEIRA et al., 2013). Além de temperatura e pH ideais, outros três parâmetros são muito relevantes durante o processo industrial para que as enzimas possam desempenhar adequadamente a sua função, assim a agitação do meio faz com que novas moléculas do substrato possam entrar em contato com estes biocatalizadores, o tempo de ação para garantir que todo substrato seja exposto, visto que o volume de substrato é consideravelmente maior que o volume de enzima e a concentração da enzima, pois se estiver muito diluída será necessário aumentar o tempo de contato e, se estiver em excesso, poderá impactar negativamente no custo da operação.

No mecanismo de ação, as enzimas têm sítio ativo que contém aminoácidos, os quais através das cadeias laterais ligam-se ao substrato específico, formando complexo enzima-substrato que permanece ativo por algum tempo, atuando na hidrólise de molécula ou transformação de determinada ligação química (NELSON; COX, 2014).

Observamos diariamente o aparecimento de novos processos industriais que utilizam enzimas como catalisadores, dentre as quais se destacam enzimas na área de alimentos, cuidados domésticos, saúde humana e animal, indústria farmacêutica, tratamento de efluentes, papel e indústria têxtil, além do crescente uso no setor sucroenergético visando à produção de açúcar e bioetanol.

Mediante este cenário em crescimento, novas enzimas ou aprimoramento de enzimas já conhecidas tem sido o foco de indústrias que atuam globalmente neste setor. A busca de microrganismos que possam produzir essas enzimas é constante e várias técnicas de biologia molecular estão disponíveis atualmente para aumentar a escala de produção. Possivelmente a maior dificuldade da indústria seja encontrar enzimas capazes de suportar algumas condições industriais específicas como variação de temperatura e pH (MONTEIRO; SILVA, 2009).

Para evitar nomeação aleatória de uma mesma enzima estudada por diferentes centros de pesquisa, foi estabelecida uma comissão internacional de bioquímica para classificar e nomear as enzimas separando-as em seis classes de acordo com o tipo de reação catalisada. Monteiro e Silva (2009) exemplificam as classes enzimáticas como sendo (i) oxirredutases, responsáveis por catalisar reações de oxi-redução ou transferência de elétrons; (ii) transferases, transferem grupos funcionais entre moléculas; (iii) hidrolases responsáveis por hidrolisar reações de hidrólise em ligação covalente; (iv) liases, realizam adição de grupos a duplas ligações ou remoção de grupos formando dupla ligação; (v)

isomerases, interconvertem isômeros ópticos ou geométricos; (vi) ligases, capazes de interligar duas moléculas, com consumo de energia, usualmente adenosina-trifosfato (ATP).

Como o objetivo deste trabalho foi converter poli e oligossacarídeos presentes nas dornas de fermentação em monossacarídeos fermentescíveis, foram empregadas enzimas carboidrases capazes de hidrolisar diferentes polímeros de carbono em moléculas facilmente metabolizáveis para as leveduras.

3.6.1. Carboidrases

As carboidrases compreendem as amilases, xilanases, pectinases, β -glucanases, arabinoxilanases, celulasas e hemicelulasas, cujos substratos são respectivamente, o amido, pectinas, β -glucanos, arabinoxilanos, celulose e hemicelulose (OLIVEIRA; MORAES, 2007).

Os fungos do gênero *Aspergillus* produzem a maioria das enzimas carboidrases utilizadas para hidrolisar os polissacarídeos, clivando os carboidratos em açúcares simples, sendo classificadas em enzimas que hidrolisam o amido, além dos polissacarídeos não amiláceos presentes na biomassa vegetal (FIREMAN; FIREMAN, 1998).

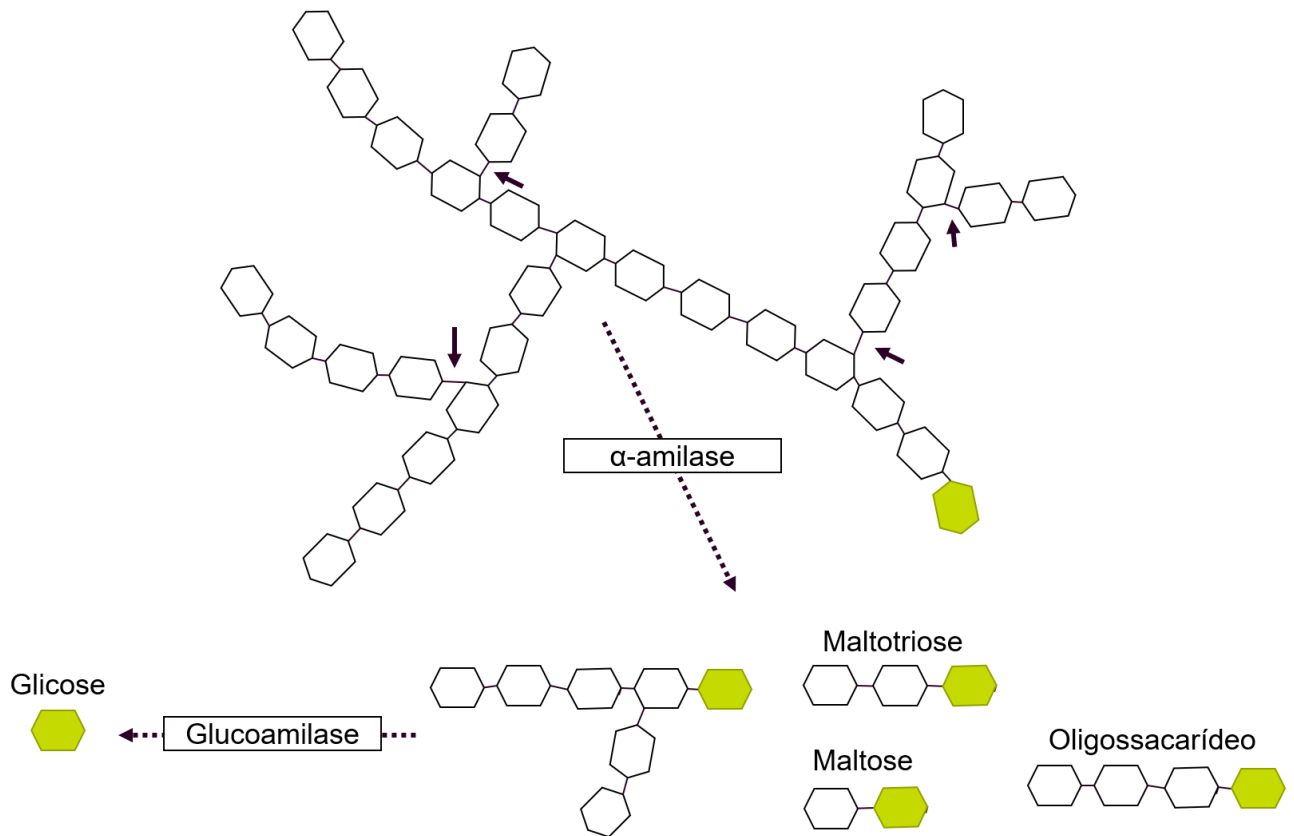
3.6.2. Amilases

A amilase é capaz de hidrolisar a molécula de amido, em bioprodutos com massa molares menores (MENEGHETTI, 2013), sendo aplicada em substratos amiláceos com o objetivo de aumentar a eficiência da degradação do amido (PESSÔA et al., 2012), decompondo-o em amilose e amilopectina (MENEGHETTI, 2013).

Notoriamente as enzimas α -amilase e glucoamilase são as mais empregadas na indústria de açúcar e etanol. A alfa-amilase realiza a clivagem aleatória entre as ligações α -

1,4, não atuando sobre as ligações α -1,6. Essa quebra resulta em uma produção de 70 a 90% de maltose, oligossacarídeos e dextrinas, além de pequenas quantidades de monossacarídeos glicose e frutose (PARAZZI et al., 2017). As amiloglicosidases, comercialmente disponíveis, são produzidas por linhagens de *Aspergillus* e *Rhizopus* e atuam na quebra das ligações α -1,6 do amido. Essas enzimas apresentam atividade de trabalho ótima em torno de 50°C, e perdem estabilidade acima desta faixa de temperatura, sendo inativadas em temperaturas superiores a 65°C. A glucoamilase, também conhecida como amiloglicosidase, hidrolisa as ligações glicosídicas α -1,4, α -1,6 e α -1,3 do amido, liberando a glicose. A glucoamilase é utilizada no estágio de sacarificação de amido liquefeito e na produção de glicose (PARAZZI et al., 2017). A Figura 8 apresenta a estrutura da molécula de amido e a ação das duas principais amilases, alfa-amilase e glucoamilase, indicando os pontos de quebra das ligações ramificadas até formação de estruturas menores como oligossacarídeos, trissacarídeos e dissacarídeos, em seguida a ação da glucoamilase formando glicose.

Figura 8. Hidrólise do amido por amilases com diferentes especificidades.



Fonte: Adaptado de Elba, et al., 2008.

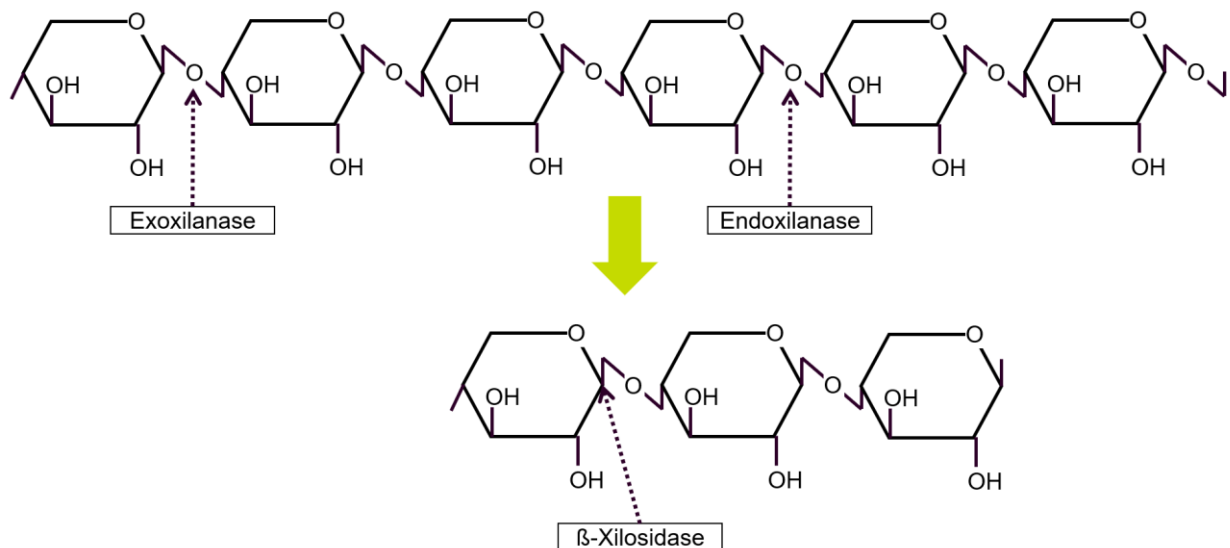
3.6.3. Xilanases

As hemiceluloses são polímeros formados por pentoses e hexoses conectadas por ligações β -1,4. Eventualmente podem estar presentes no mosto de fermentação carregadas pelas fibras de bagaço após o esmagamento da cana e passagem pelo sistema de tratamento de caldo. Em função destas macromoléculas serem formadas por diversos resíduos de açúcares e comporem a estrutura que envolve a molécula de celulose (LOPES, 2010), precisam ser removidas para que a celulose seja acessada e forneça uma fonte adicional de carbono para o processo fermentativo. No entanto, sua estrutura é complexa e heterogênea, requerendo uma variedade de enzimas e muitas vezes um pré-tratamento

para que a recuperação destas moléculas de monossacarídeos seja eficiente (NUNES, 2010).

A utilização de xilanase contribui na redução dos polissacarídeos não amiláceos (PNA's) insolúveis através da redução da viscosidade e a liberação de nutrientes pela hidrólise (DE BARROS, 2016; DELMASCHIO, 2018; OTT, 2005), além de aumentar a digestão de moléculas de xilanas e arabinoxilanas (DE BARROS, 2016). A Figura 9 apresenta a estrutura da molécula de xilana e os pontos de clivagem de três diferentes xilanases, sendo que a endo- β -1,4-xilalanase realiza a hidrólise das ligações glicosídicas β -1,4 internas da molécula de xilana, enquanto que as exo- β -xilanases liberam xilose a partir das extremidades não redutoras das xilanas e por fim as β -xilosidases liberam xilose a partir da xilobiose ou xilooligossacarídeos curtos (GOMES, 2007).

Figura 9. Hidrólise da molécula de hemicelulose pelo complexo de xilanases.



Fonte: Gomes, 2007.

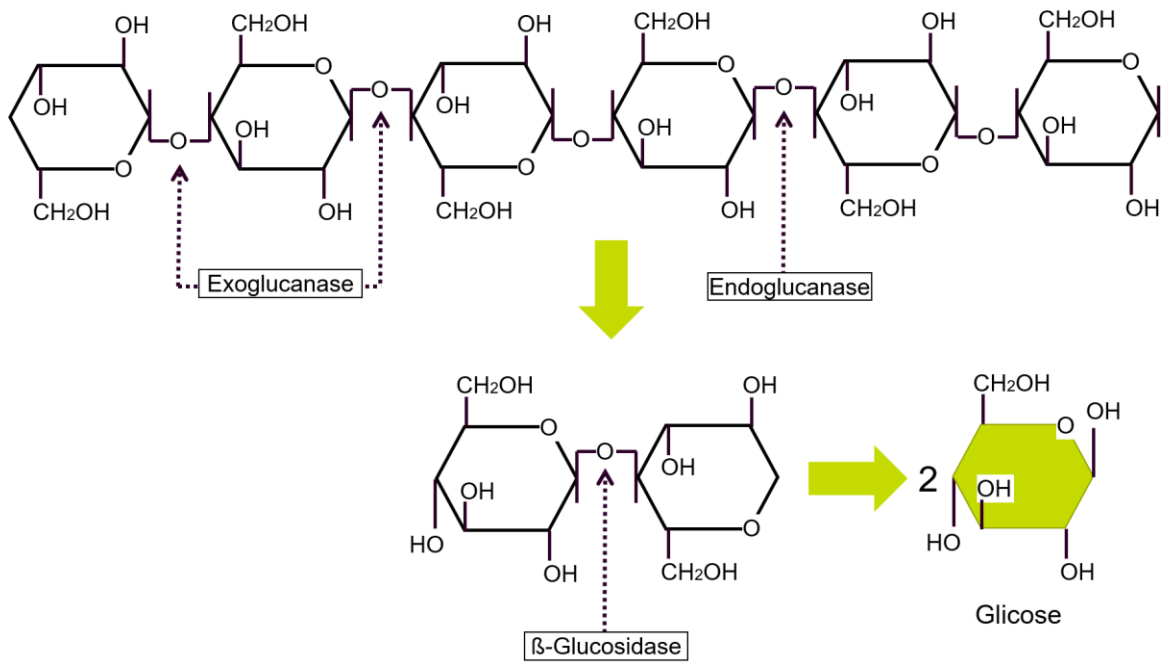
3.6.4. Celulases

Gaete et al. (2020) afirmam que as celulases são enzimas induzíveis, produzidas por diversos microrganismos principalmente fungos e bactérias durante a fase de crescimento em resíduos vegetais, e a capacidade de decomposição da celulose exige sinergia de diferentes enzimas para completa hidrólise do polissacarídeo. No segmento de biocombustíveis a celulase tem importante atuação no processo de etanol de segunda geração produzido a partir da biomassa lignocelulósica. O potencial de uso desta enzima dá-se pela conversão desta fonte de carbono que pode ser utilizada para gerar uma série de produtos de valor agregado. No processo industrial de produção 1G de bioetanol, pode ocorrer a passagem de fibras contendo estruturas com celulose caso o processo de filtração e tratamento do caldo não seja eficiente, causando o aparecimento destas estruturas no mosto de fermentação. Além disso, o uso das celulases contribui na quebra de outros oligossacarídeos como maltose e maltotriose.

A celulase comercial utilizada na produção de bioetanol de segunda geração trabalha com pH entre 5,5 e 5,6 sendo sua temperatura ótima de atuação 55°C para se alcançar máxima atividade enzimática. Como as condições de trabalho na fermentação de mosto de cana-de-açúcar acontecem com pH de 4,4 e temperatura 32°C, assim, é esperado que a atividade enzimática da celulase não desempenhe sua melhor catálise por estar fora dos parâmetros ideais, necessitando de uma sobre dosagem para compensação. A Figura 10 apresenta este complexo enzimático das celulases que atuam em sinergia, de modo que as endo- β -1,4-glucanases são responsáveis por hidrolisar as ligações glicosídicas ao acaso na fibra de celulose, as exo- β -1,4-glucanases ou celobiohidrolases realizam a clivagem das extremidades redutoras e não redutoras dos polímeros e oligômeros gerados pelas endo,

liberando celobioses que por sua vez serão hidrolisadas até glicose pela β -1,4-glicosidases (ELBA, 2008).

Figura 10. Hidrólise da molécula de celulose pelo complexo de celulases.



Fonte: Adaptado de Elba, 2008.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente um teste preliminar de hidrólise enzimática de vinho bruto centrifugado oriundo de processo fermentativo industrial foi realizado na empresa fabricante do preparado enzimático (contendo 67,5% de celulasas, 22,5% de amilases e 10% de xilanase), em bancada de laboratório com o objetivo de avaliar o potencial de liberação de açúcares fermentescíveis pela levedura. Na sequência, o trabalho foi separado em dois segmentos através da aplicação do preparado enzimático em processo fermentativo etanólico de caldo de cana-de-açúcar em escala industrial em duas Usinas distintas para avaliar a relação existente entre a estratégia de produção com a configuração do parque industrial (processo operado em batelada e contínuo). O monitoramento dos parâmetros dos processos industriais, como por exemplo, boletins, formulários e análises foram fornecidos pelas próprias Usinas, bem como resultados de hidrólise enzimática verificados na etapa de escala de laboratório da empresa fabricante do preparado enzimático.

4.1. Aplicação do preparado enzimático em laboratório (pré-teste industrial)

Esta análise prévia foi realizada em uma usina sucroalcooleira da região de Ribeirão Preto/SP no mês de Junho de 2019. A execução desta etapa deu-se por meio da coleta diária de 300 mL de vinho de levedurado na saída da centrífuga do processo industrial em intervalos de 8h e procedeu-se uma nova centrifugação nas amostras por 15 min a 3.600 rpm em bancada de laboratório, congelando-se imediatamente os sobrenadantes e reservando-os em frascos plásticos. Este processo foi realizado durante 3 dias, totalizando 9 amostras que foram imediatamente congeladas após a coleta de campo. Após o período de três dias de coleta industrial, as amostras foram descongeladas e tratadas termicamente

a 100°C por 10 min em banho-maria com o objetivo de minimizar os efeitos biológicos sobre o potencial de liberação de glicose. Já com as amostras a 25°C realizou-se a subdivisão das amostras em tubos de centrifuga estéreis de 50 mL contendo 30 mL de vinho bruto centrifugado, totalizando 9 tubos para cada horário por dia coletado, caracterizando análise em triplicata, sendo três tubos para controle, três tubos com concentração de 30 mg.L⁻¹ do preparado enzimático e outros três tubos com 150 mg.L⁻¹ do preparado enzimático, finalizando 27 tubos por dia e 81 amostras ao final de três dias (Figura 11). Como os volumes das amostras eram pequenos (30 mL), foi necessário diluir o preparado enzimático 30 vezes, adicionando-se 1 grama do preparado enzimático, com o uso de balança analítica de precisão, em balão volumétrico de 25 mL e avolumando com água destilada até o menisco. Feita a homogeneização, as amostras com 30 mg.L⁻¹ receberam 22,5 µL do preparado enzimático diluído ao enquanto que as amostras com 150 mg.L⁻¹ receberam 112,5 µL com auxílio de micropipetas automáticas e ponteiros plásticos descartáveis.

Figura 11. Análise das triplicatas de processo contendo vinho centrifugado caracterizado controle, aplicação de 30 mg.L⁻¹ e aplicação de 150 mg.L⁻¹ do complexo enzimático.



Fonte: próprio autor.

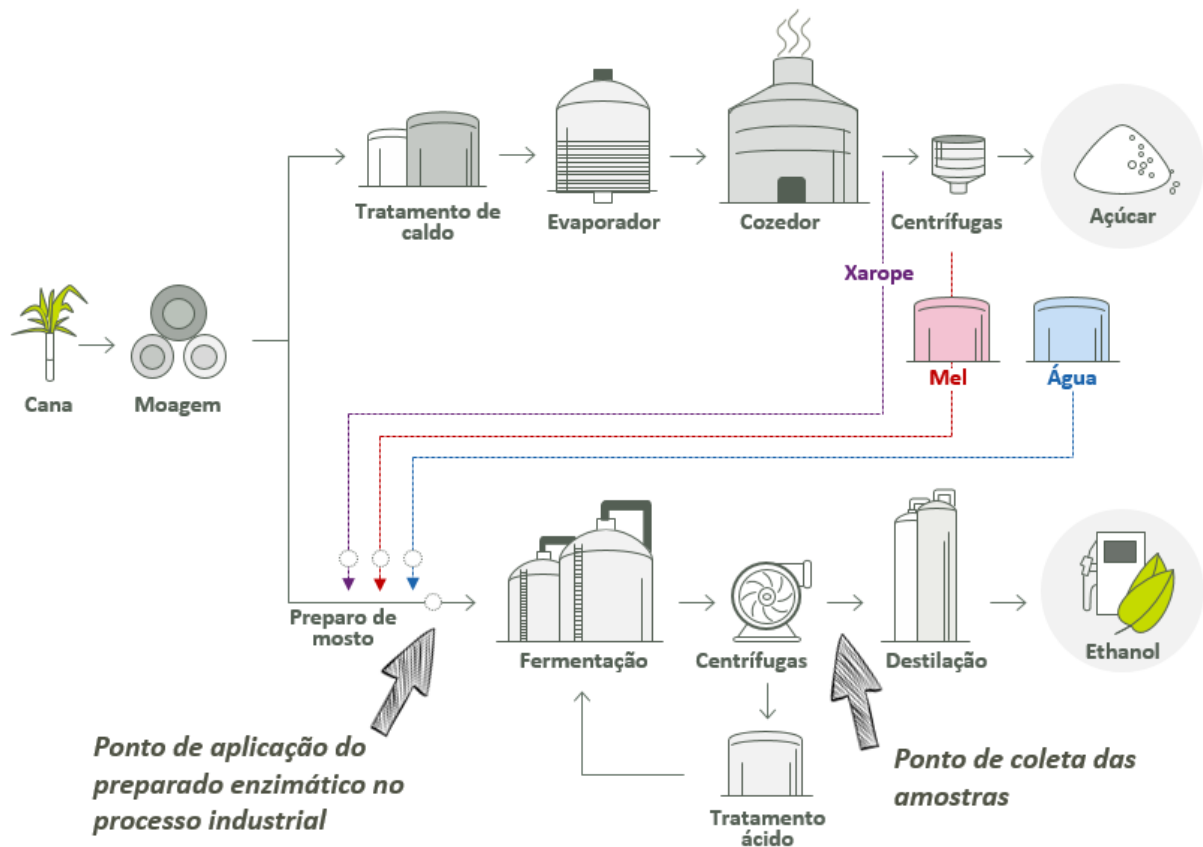
Na sequência da adição do preparado enzimático considerando os três tratamentos mencionados anteriormente, os tubos de centrifuga foram deixados em incubadora *shaker* por 8 h sob agitação horizontal de 50 rpm e 32°C reproduzindo o ambiente fermentativo e ao término deste período todos foram rapidamente congelados para posterior análise.

A análise de sacarose, glicose e frutose presentes nas amostras foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando cromatógrafo modelo Ultimate 3000 da Thermo equipado com pré-coluna e coluna para açúcares BioRad Aminex 87P (7 x 30 mm), fase móvel água ultrapura, vazão de 0,6 mL.min⁻¹, temperatura de coluna de 50°C e temperatura do detector de índice de refração de 60°C. Foi elaborada uma curva analítica de cada composto contendo 7 pontos e as amostras submetidas a diluição de 2 vezes com água ultrapura.

4.2. Aplicação industrial do preparado enzimático contendo atividade de Carboidrases

A Figura 12 apresenta um fluxograma de fabricação de açúcar e etanol que mostra de forma resumida que a principal fonte de carbono durante a fermentação sacarínea origina-se do caldo extraído da cana-de-açúcar. Este caldo pode ser concentrado e diretamente enviado para a fermentação nas destilarias autônomas ou nas plantas com fábrica de açúcar anexa, utilizando os subprodutos da produção de açúcar como xarope e mel final, que quando diluídos com água formam o mosto. De forma geral, o mosto na maioria das usinas de cana-de-açúcar no Brasil atinge valores de grau Brix° entre 18 a 22% (massa/volume) de açúcar (WALKER; BASSO, 2020) e é composto por uma mistura de água, xarope, mel, dependendo do “*mix*” de produção definido pela estratégia de mercado entre açúcar ou etanol.

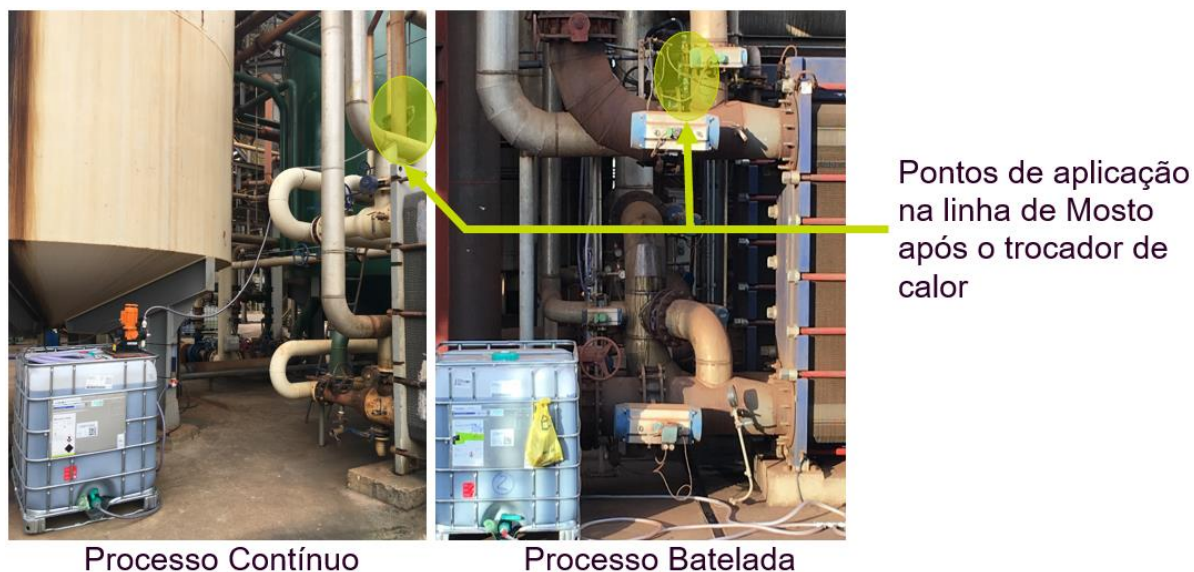
Figura 12. Ponto de aplicação do preparado enzimático no processo industrial de produção de bioetanol utilizando cana-de-açúcar como matéria-prima.



Fonte: próprio autor

O ponto de aplicação foi automatizado em relação à vazão de vinho centrifugado do sistema de dornas fermentativas, sendo a válvula instalada após o trocador de calor (Figura 13) evitando temperaturas superiores a 90°C que poderiam desnaturar as enzimas antes mesmo que elas pudessem cumprir com suas ações catalíticas sobre os açúcares fermentescíveis presentes no sistema. Nesta etapa o preparado enzimático foi administrado em containers de 1.000 kg denominados IBCs (do inglês Intermediate Bulk Container).

Figura 13. Ponto de aplicação do preparado enzimático na saída do trocador de calor em duas aplicações de escala industrial.



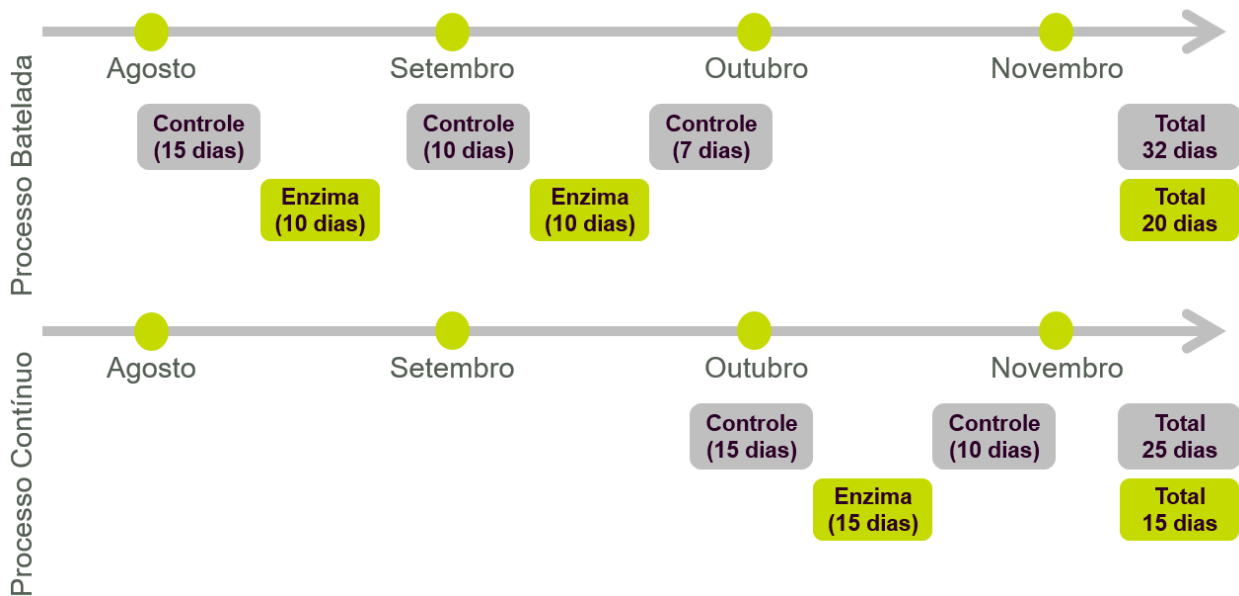
Fonte: próprio autor.

Além disso, valendo-se do anel de recirculação instalado após as placas dos trocadores de calor, foi possível conduzir uma melhor distribuição do mosto e maior homogeneidade da mistura. A dosagem do preparado enzimático foi calculada com base em 30 mg de preparado enzimático (densidade=1,2 g.mL⁻¹) por litro de vinho fermentando bruto (30 mg.L⁻¹). Embora o ponto de aplicação do preparado enzimático ocorra no mosto de alimentação das dornas, o cálculo da aplicação foi realizado com base no volume de vinho bruto centrifugado, pois as carboidrases atuam considerando o volume de dorna cheia e durante o processo de enchimento, pelo diagrama de ocupação da destilaria, mais de uma dorna pode receber o mosto.

Optou-se por realizar períodos de aplicação enzimática descontinuados em função das dificuldades operacionais envolvidas com a rastreabilidade dos dados e mistura do fermento tratado e não tratado, assim, o teste ocorreu de modo contínuo aplicando o preparado enzimático em todas as dornas do parque fermentativo durante o período

chamado “tratamento” e descontinuado no período seguinte com o mesmo número de dias para compreender a resposta do processo na presença e ausência do preparado enzimático. As aplicações ocorreram no segundo semestre de 2019 totalizando 32 dias de controle e 20 dias de aplicação em uma usina com estratégia de produção em batelada e 25 dias de controle e 15 dias de aplicação em outra usina com estratégia de produção contínua de etanol, conforme ilustrado na Figura 14.

Figura 14. Linha do tempo de aplicação industrial do preparado enzimático em duas Usinas com diferentes estratégias tecnológicas de produção de etanol em 2019.



Fonte: próprio autor.

4.3. Amostragem em processo industrial de produção de bioetanol

A coleta das amostras foi realizada pelos analistas de laboratórios durante os três turnos de operação da Usina, permitindo o monitoramento 24 h por dia dos parques fermentativos tanto no período do controle quanto no período de tratamento enzimático.

Conforme apresentado na Figura 12, o ponto de coleta estabelecido para avaliar os efeitos da aplicação do preparado enzimático em relação a liberação de glicose no processo

industrial foi à saída da centrífuga, coletando-se manualmente o vinho centrifugado delevedurado a ser enviado para a dorna volante ou destilaria. A frequência das coletas foi de quatro em quatro horas, observando-se que fossem imediatamente centrifugadas a 3.600 rpm por 10 min e os sobrenadantes armazenados com volumes de 4 mL de cada coleta para formação de compostas diárias que foram congeladas em freezer a -20°C no laboratório; as amostras permaneceram congeladas durante todo o período avaliado para posterior envio a empresa fabricante das enzimas com objetivo de realizar análises cromatográficas.

Outros fluidos como mosto e vinho bruto fermentado também foram coletados e analisados. As coletas de mosto e vinho bruto fermentado foram realizadas por amostragem contínua, sendo que a cada 5 min a válvula automática de coleta foi aberta automaticamente coletando a amostra (ficando aberta por 5 segundos), o fluido coletado 15 mL, foi armazenado em um frasco de plástico e estocado em geladeira a 5°C. A cada 4 h as amostras de mosto e vinho bruto fermentado foram coletadas e enviadas para o laboratório pelos analistas para determinação dos açúcares totais e residuais, teor alcoólico, e parâmetros microbiológicos como nível de contaminação, floculação e viabilidade da levedura.

As amostras de fermento tratado foram coletadas diretamente nas cubas por meio de frascos de aço inoxidável mergulhado como pescador e a amostra vertida em frascos plásticos imediatamente conduzidos ao laboratório para medição o pH e parâmetros microbiológicos citados acima.

A Tabela 3 resume todos os métodos analíticos realizados durante os ensaios no processo. O Apêndice A descreve em detalhes a metodologia de cada procedimento analítico descrito na Tabela 3.

Tabela 3. Procedimentos analíticos realizados durante amostragens do processo de produção de bioetanol.

Amostras	Tipo de análise	Método analítico
Mosto	Açúcares	Cromatografia líquida (CLAE)
	Teor de impurezas	Centrifugação
Fermento tratado	Teor de levedo	Centrifugação
	pH	pHmetro digital
Vinho bruto fermentado	Teor de etanol	Densímetro digital
	Nível de contaminação	Microscopia óptica
	Nível de floculação	Observação em proveta
	Viabilidade celular	Microscopia óptica
Vinho delevedurado	Açúcares, etanol e ácidos orgânicos	Cromatografia Líquida (CLAE)

Fonte: próprio autor

4.4. Análise dos parâmetros industriais

O acompanhamento da aplicação enzimática na fermentação foi realizado através das análises físico-químicas no laboratório da área de fermentação da Usina, as metodologias seguem Caldas (2012). O fornecimento dos dados referentes aos parâmetros microbiológicos, processo fermentativo, qualidade da matéria-prima, bem como insumos de fermentação deveu-se ao próprio laboratório de controle de qualidade destas usinas onde os testes foram conduzidos.

Para garantir estabilidade do processo industrial, seguiu-se como critério de utilização desses parâmetros da Tabela 3, algumas condições de fermentação devem estar dentro da faixa de controle para que possamos avaliar o produto em situação representativa de processo. Pela experiência em fermentação etanólica de cana-de-açúcar, foram definidos os seguintes níveis de controle, apresentados conforme a Tabela 4. Quando um ou mais desses parâmetros estiverem fora da faixa de controle, os resultados do dia não foram considerados para critério de sucesso desta aplicação enzimática. Além disso, outro parâmetro para avaliar a estabilidade do processo industrial é considerar o volume médio

diário de etanol hidratado produzido, se a produção em um determinado dia indicar um valor inferior a 50% da média dos últimos 7 dias, então este valor é excluído da análise em função do elevado potencial de distorção estatística dos resultados pelo esgotamento de processo que influencia o balanço de massas.

Tabela 4. Detalhamento dos parâmetros críticos para monitoramento da estabilidade da fermentação.

Parâmetro	Método de análise	Ponto de amostra	Faixa de controle (médias diárias)
Contaminação bacteriana	Microscopia	Amostrador individualizado por centrífuga	$< 4,0 \times 10^7$
Viabilidade	Microscopia	Amostrador individualizado por dornas	$> 50 \%$
Floculação	Observação proveta	Amostrador individualizado por dornas	$< 50 \%$
Temperatura média da fermentação	Termômetro de processo	Média do dia referente a todas as dornas	$< 37^\circ\text{C}$
Teor alcoólico no vinho bruto	Densímetro digital	Amostrador contínuo de vinho bruto	Entre 8-13 %
Concentração de levedo no vinho bruto	Centrifugação	Amostrador contínuo de vinho bruto	Entre 8-12 %
pH de levedo tratado	pHmetro digital	Levedo tratado nas cubas no final do tratamento ácido	Entre 2,2-3,0

Fonte: próprio autor

4.5. Obtenção da Taxa de Performance Industrial (TPI)

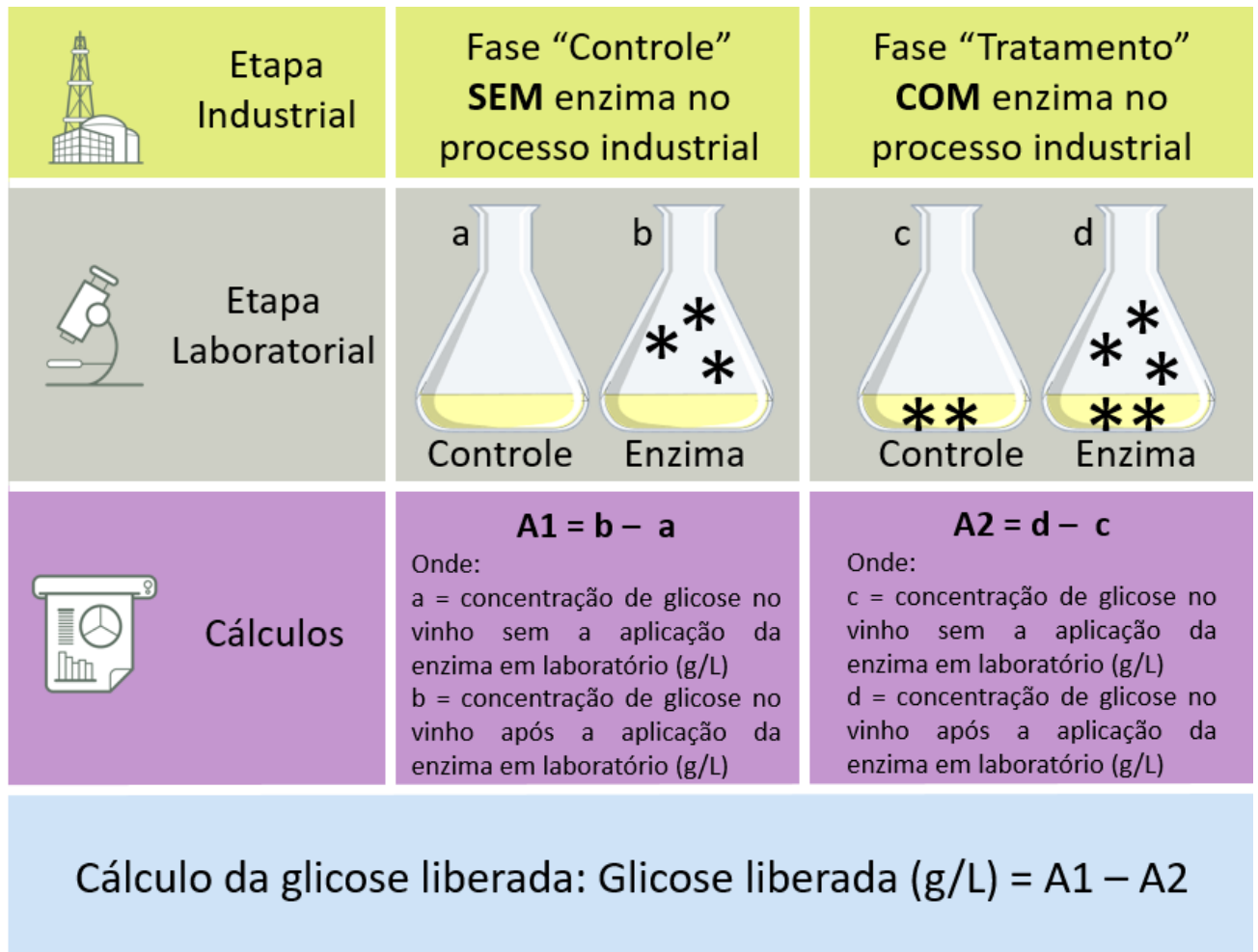
Para calcular a Taxa de Performance Industrial (TPI), foram quantificados os polissacarídeos e oligossacarídeos mediante hidrólise enzimática das amostras compostas de vinho centrifugado e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) no laboratório do fabricante do preparado enzimático. Assim, cada amostra, após seu descongelamento, foi separada em quatro alíquotas de 10 mL, em tubos de centrifuga

estéreis de 15 ml, posteriormente submetidas por 10 min em banho-maria a 100°C para a inativação de enzimas e eliminação dos possíveis microrganismos contaminantes. Após a etapa de tratamento térmico as amostras foram deixadas na bancada para atingirem a temperatura de 25°C.

A diluição do preparado enzimático para esta etapa foi feita transferindo-se 1 mL do preparado enzimático em um balão volumétrico de 100 mL e completando o volume com água destilada até o menisco. Homogeneizado o balão, procedeu-se com a hidrólise enzimática em ensaios com duplicatas aplicando-se o equivalente a 30 mg.L⁻¹ por meio da transferência de 25 µL do preparado enzimático diluído em cada amostra de 10 mL do vinho centrifugado, dando origem ao que foi classificado como (A₂). As amostras controle (A₁) receberam o mesmo tratamento, porém com adição de 25 µL de água ultrapura. (A₁) e (A₂) foram preparados em bancada e laboratório tanto com as amostras correspondentes ao controle quanto às correspondentes do tratamento industrial e os quatro tubos de cada amostra foram deixados em incubadora *shaker* a 32°C com agitação orbital de 50 rpm por 8 h. Em seguida cada tubo foi filtrado (0,22 µm) e posteriormente encaminhados para quantificação de glicose por CLAE utilizando-se uma coluna de troca iônica da Aminex HPX87P, fase móvel de água ultrapura, temperatura de forno a 50°C, detector de índice de refração (IR) a 60°C e fluxo de 0,6 mL.min⁻¹.

A Taxa de Performance Industrial (TPI) foi calculada com os valores encontrados de glicose (g.L⁻¹), subtraindo-se (A₂) de (A₁) para minimizar os efeitos de oscilação de fluxo no processo fermentativo em escala industrial, conforme apresentado na Figura 15. Deste modo, foi possível quantificar a real taxa de liberação de glicose do mosto após a fermentação com base no potencial de liberação que poderia ser alcançado em condições controladas como em laboratório.

Figura 15. Estratégia de preparação das amostras para cálculo da taxa de performance industrial (TPI).



Fonte: próprio autor

4.6. Análise Estatística

Para realizar os trabalhos estatísticos apresentados nos resultados desta qualificação, utilizou-se o software estatístico JMP (versão 15.0, do fabricante SAS Institute). Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo modelo método matemático de Tukey considerando nível de significância (α) de 0,05, buscando-se como significância estatística a hipótese de que a presença do

complexo enzimático é capaz de produzir alterações no processo fermentativo através da liberação de glicose e que a não liberação desta glicose caracteriza a hipótese nula.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação do ensaio de liberação de glicose em escala de laboratório (pré-teste industrial)

A fim de avaliar o potencial de liberação de glicose mediante a aplicação do preparado enzimático objeto deste trabalho, tomou-se o cuidado de avaliar previamente em escala de bancada de laboratório a liberação de glicose por meio de hidrólises enzimáticas em amostras do processo industrial durante três dias consecutivos, considerando três tratamentos: controle (ausência de enzimas), tratamento com preparado enzimático (30 e 150 mg de preparado enzimático por litro de vinho).

O objetivo desta etapa foi conhecer o potencial de conversão de polissacarídeos e oligossacarídeos em glicose, além de verificar se a dosagem de 30 mg.L⁻¹ de preparado enzimático seria tecnicamente viável para esta finalidade, pois uma dosagem de 150 mg.L⁻¹ poderia gerar um alto volume de aplicação, e se o potencial de liberação de glicose com 30 mg.L⁻¹ for compatível seria uma escolha mais adequada para aquela aplicação.

Os resultados da Tabela 5 apresentam os valores médios de liberação de glicose, frutose e sacarose quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) durante os 3 dias de aplicação do preparado enzimático.

A concentração de glicose no controle foi de 0,071 g.L⁻¹ ao passo que através do tratamento com 30 mg.L⁻¹ de preparado enzimático foram liberados 0,168 g.L⁻¹, aumento de 57,6% e aplicando 150 mg.L⁻¹ de enzima foram liberados 0,209 g.L⁻¹, aumento de 65,8%. Mesmo aumentando 5 vezes a concentração do preparado enzimático durante a aplicação, o potencial de liberação extra de glicose entre as aplicações de 30 e 150 mg.L⁻¹ foi de apenas 8,2%, não justificando uma dosagem excessiva. Houve significância estatística

entre os tratamentos controle e aplicação apenas para o parâmetro de glicose, confirmando a hipótese de liberação principalmente deste monossacarídeo pela ação das enzimas carboidrases presentes no complexo testado. Os resultados também mostram que a ação do preparado enzimático sobre o vinho favorece a formação de glicose, pois as concentrações de frutose e sacarose foram menores após os dois tratamentos com adição de preparado enzimático quando comparado ao tratamento controle, sem enzima.

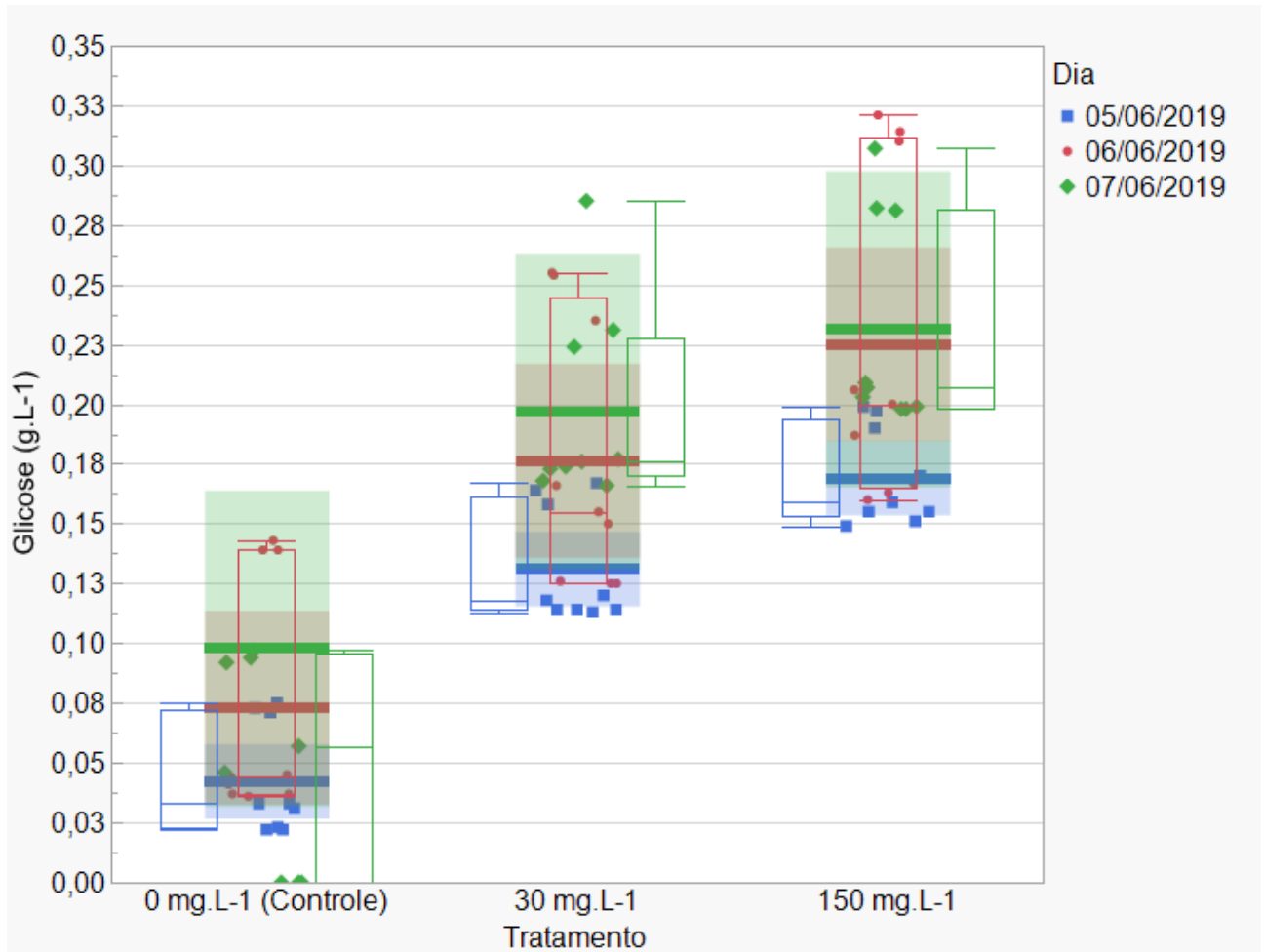
Tabela 5. Concentração de glicose, frutose e sacarose de hidrólise enzimática realizada nas amostras de vinho bruto em escala de laboratório e seus desvios padrões.

Parâmetro	Tratamentos		
	30 mg.L ⁻¹	150 mg.L ⁻¹	Controle (sem enzima)
Glicose (g/L)	0,168 ± 0,049 ^{a*}	0,209 ± 0,055 ^a	0,071 ± 0,094 ^b
Frutose (g/L)	0,110 ± 0,062 ^a	0,114 ± 0,062 ^a	0,143 ± 0,195 ^a
Sacarose (g/L)	0,070 ± 0,039 ^a	0,071 ± 0,036 ^a	0,126 ± 0,266 ^a

(a) e (b) representam o Teste de probabilidade de Tukey-Kramer (HSD), valores seguidos da mesma letra não apresentam diferença estatística.

A Figura 16 mostra os resultados de liberação de glicose nos três tratamentos durante cada dia de coleta das amostras. É interessante observar que embora a tendência de liberação de glicose seja crescente pela adição de 30 e 150 mg.L⁻¹ de proteínas do preparado enzimático, há uma grande variação da presença dos açúcares fermentescíveis pelas leveduras em cada um dos dias coletados e dentro de cada horário, o que pode ser observado pelo desvio padrão, cujo valor modular chega a ser superior a própria média diária da análise, demonstrando a grande amplitude composicional que pode ocorrer no processo industrial dentro de um mesmo dia e em horários diferentes em função dos diversos pontos de colheita da matéria-prima que é entregue na Usina.

Figura 16. Hidrólise enzimática em triplicata do vinho bruto centrifugado para cada tratamento em diferentes dias com os respectivos desvios padrões



Fonte: próprio autor.

Estas informações permitiram estimar que há potencial de liberação de glicose da ordem de 60% com a aplicação de 30 mg.L⁻¹ e portanto, procedeu-se com o teste industrial nesta mesma unidade que operava a fermentação em modo batelada e repetiu-se o mesmo teste em outra unidade de fermentação operada em modo contínuo na região de São José do Rio Preto/SP. Os resultados de liberação de glicose e outros parâmetros dos processos fermentativos em escala industrial serão apresentados nos próximos tópicos.

Em função da dificuldade resultante do longo período de análise, requerendo hidrólise enzimática, incubação por 8h e posterior preparo das amostras para análise por

cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), associado ao fato de muitas usinas ainda não possuírem este equipamento, buscou-se na literatura outra tecnologia capaz de simplificar esta triagem por polissacarídeos e oligossacarídeos na matéria prima. Eggleston (2008), em seu estudo desenvolveu curvas de correlação mostrando que a presença de manitol é um forte indicativo de deterioração da cana-de-açúcar e que é possível por meio de uma rápida hidrólise enzimática detectar a presença deste composto no caldo. Deste modo, para futuras triagens, o monitoramento da presença de manitol no mosto de fermentação pode acelerar a resposta gerencial da usina com o objetivo de aumentar a produção de etanol com a mesma quantidade de matéria-prima disponível.

5.2. Avaliação da liberação de glicose em processo de produção de bioetanol em escala industrial

O objetivo principal deste trabalho é analisar a liberação de glicose através da aplicação de preparado enzimático (contendo carboidrases) em processo fermentativo em escala industrial e verificar como este tratamento pode impactar à produção de etanol nas usinas. Os processos industriais de produção de etanol são distintos em cada usina, desta forma, os dados apresentados neste trabalho representam dois processos, sendo um operado com tratamento contínuo do fermento e posterior fermentação em batelada e outro processo operado em modo totalmente contínuo tanto no tratamento quanto na fermentação. Os estudos dos parâmetros foram desenvolvidos separadamente para que não incorressem variações típicas de cada condição operacional, além das variações climáticas, do solo, tipo de matéria prima, período da safra e modelo técnico econômico que pode alterar o “*mix*” de produção para etanol hidratado, etanol anidro ou açúcar.

As amostras compostas dos vinhos fermentados coletados na saída da centrífuga dos parques industriais das Usinas foram analisadas por CLAE na empresa fabricante das enzimas e os parâmetros de processo fornecidos por cada usina serviram como fonte de análise dos resultados apresentados nos itens 5.3 e 5.4, respectivamente. Tanto o período controle quanto o período de tratamento enzimático, foram analisados sob o crivo do teste estatístico de Tukey para verificar se a presença da enzima realmente pode contribuir com alterações de desempenho da fermentação. Este teste de Tukey normalmente é aplicado sobre repetições experimentais nas quais as condições são fielmente reproduzidas em replicadas, no entanto, decidiu-se aplica-las em todas as análises, visto que cada conjunto de dornas pode ser reprocessado em média duas vezes ao dia e no caso de fermentações contínuas, o mesmo processo oscila o tempo todo. Associado a isso, como os testes em escala industrial ocorreram computando dados de vários dias de aplicação e também de controle no mesmo processo, entendeu-se que seria a ferramenta mais adequada neste caso.

Todos os trabalhos foram realizados considerando a dosagem de 30 mg.L^{-1} de preparado enzimático sobre a vazão de vinho bruto enviado para as centrífugas para que a concentração mássica da enzima estivesse proporcional ao vinho fermentado pelo processo, sendo que o ponto de aplicação ocorreu no mosto de alimentação. Os dados de quantificação da glicose liberada consideraram as amostras coletadas na saída da centrífuga após o término da fermentação.

5.3. Avaliação de ensaio de processo de produção de bioetanol em escala industrial operado em modo batelada

Inicialmente serão apresentados os dados de uma usina da região de Ribeirão Preto/SP, mesma unidade onde foram realizados os testes prévios de escala de laboratório. A Tabela 6 apresenta os teores de glicose, frutose, ácidos orgânicos (lático e acético), glicerol e etanol das amostras de vinho fermentado durante o período controle e o tratamento enzimático.

Tabela 6. Teores de substrato, bioprodutos e subprodutos de vinho bruto de processo industrial de etanol operado em modo batelada após os tratamentos com e sem adição de preparado enzimático.

Parâmetros (g.L ⁻¹)	Controle (sem Enzima)	Tratamento (com Enzima)	Diferença Percentual (%)
Glicose	0,308 ^a	0,607 ^b	+96,8
Frutose	1,082 ^a	1,023 ^a	-5,4
Ácido Lático	1,881 ^a	1,738 ^a	-7,6
Glicerol	3,698 ^a	3,412 ^a	-7,7
Ácido Acético	1,156 ^a	0,533 ^b	-53,8
Etanol	71,641 ^a	71,883 ^a	+0,3

**(a) e (b) representam o Teste de probabilidade de Tukey-Kramer (HSD), valores seguidos da mesma letra não apresentam diferença estatística.*

Aplicando o modelo matemático de Tukey com significância (α) de 5%, constata-se que apenas a glicose e o ácido acético tiveram comportamentos estatisticamente divergentes durante os tratamentos (Tabela 6). A concentração de glicerol sofreu uma pequena redução (7,7%), o que evidencia que o aumento da concentração de glicose por meio do tratamento enzimático não foi suficiente para impactar negativamente a pressão osmótica do meio, o que poderia provocar o estresse das leveduras (WALK; BASSO, 2020) (Tabela 6). Esta constatação é importante, pois não é desejável que esta tecnologia acarrete condições desfavoráveis para as leveduras.

A concentração de etanol apresentou um ligeiro aumento de 0,3% no ensaio com tratamento enzimático, sendo que o teste estatístico não indicou diferenças significativas entre os períodos controle e o tratamento enzimático. As concentrações de ácidos orgânicos (lático e acético) apresentaram reduções de 7,6% e 53,8%, respectivamente. Todavia, os teores de ácido lático dos períodos controle e tratamento enzimático não apresentaram diferenças significativas, diferentemente dos teores de ácido acético. A acentuada redução do ácido acético pode estar relacionada à biotransformação deste composto em outra molécula, segundo Perna et al. (2019) o mecanismo envolvido na bio-conversão do ácido acético a etanol e biomassa, depende do pH e disponibilidade de oxigênio. Leveduras não *Saccharomyceas* como *Meyerozyma guilliermondii* e *Candida guilliermondii* são capazes de realizar este trabalho a através da entrada no ciclo de Krebs via Acetil-CoA, uma vez que o ácido acético, por ser um ácido fraco ($pK_a=4,7$), encontra-se na forma dissociada como acetato no pH de fermentação (LIMA, 2002). Contudo seriam necessários novos estudos em laboratório e em escala industrial de produção de bioetanol a partir de cana-de-açúcar para investigar a contaminação por leveduras nativas e confirmar a presente teoria.

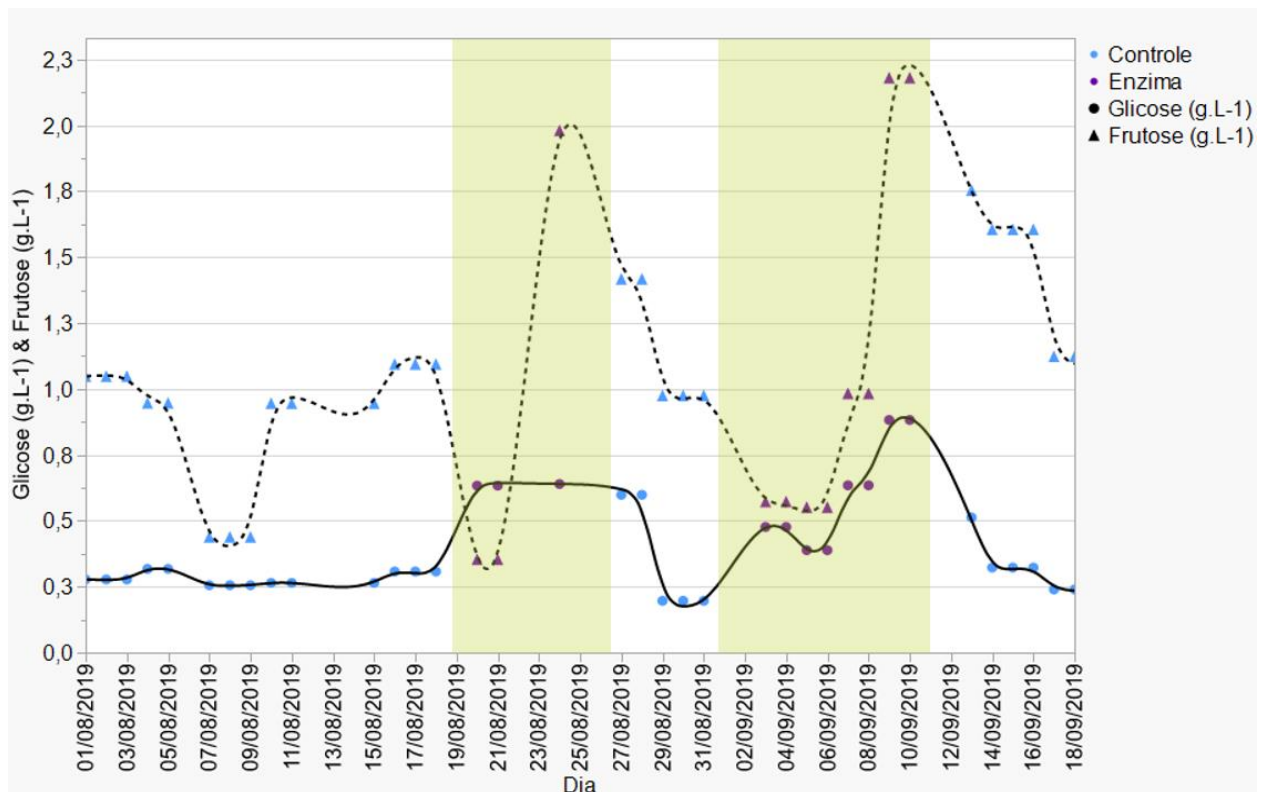
A Tabela 6 indica que houve liberação de glicose durante o período de tratamento enzimático ($0,607 \text{ g.L}^{-1}$) em comparação ao período controle ($0,308 \text{ g.L}^{-1}$), aumento de 96,8%, evidenciando que a presença do preparado enzimático tem potencial de converter os oligossacarídeos e polissacarídeos presentes no mosto em glicose, que é facilmente metabolizável pelas leveduras. Também é possível averiguar que a concentração de frutose não sofreu grande variação entre os períodos controle e o tratamento enzimático.

A Figura 17 apresenta os perfis dos teores de glicose e frutose dos vinhos fermentados em função do período dos ensaios fermentativos. Alguns pontos cujos parâmetros se diferenciavam drasticamente do comportamento normal da curva e estavam

contemplados na Tabela 4 foram removidos da análise por se tratarem de “*outliers*”. Os períodos hachurados correspondem ao tratamento enzimático, enquanto os não hachurados correspondem ao controle sem adição de enzima. Nota-se que embora a quantidade de glicose tenha aumentado, a frutose liberada foi ainda maior, no entanto, mantendo a ordem de consumo de glicose seguido de frutose por parte dos microrganismos presentes na dorna de fermentação.

A evolução dos demais parâmetros indicados na Tabela 6 podem ser observados em função do tempo no Apêndice B.

Figura 17. Teores de glicose e frutose em função dos períodos de aplicação e controle realizados em escala industrial com Fermentação em Batelada para produção de etanol de cana-de-açúcar.



Fonte: próprio autor.

Pode-se constatar ainda que as enzimas converteram os polissacarídeos e oligossacarídeos em glicose e frutose, aumentando principalmente a concentração de glicose no meio, suprindo mais rapidamente a demanda de carbono pelos microrganismos e não impactando no consumo de frutose pelas leveduras. Além disso, é possível observar que em alguns dias o perfil de consumo de frutose aproxima-se da curva de glicose, pois alguns microrganismos contaminantes apresentam preferência pelo consumo da frutose em detrimento da glicose o que explica a flutuação do delta entre as curvas durante o período analisado (COSTA et al., 2008) (Figura 17).

Por se tratar de um complexo enzimático que configura um produto em desenvolvimento, não há dados na literatura e nem mesmo na empresa fabricante que possam arguir os dados observados. Deste modo, a medida que novas aplicações forem sendo realizadas, o banco de dados ficará mais robusto para atender este mercado em potencial.

5.4. Avaliação de ensaio de processo de produção de bioetanol em escala industrial operado em modo contínuo

Como no Brasil é comum encontrarmos processos fermentativos para operado em modo contínuo, houve um esforço para analisar a aplicação do preparado enzimático também nesta configuração operacional. A usina onde o teste ocorreu fica na região de São José do Rio Preto/SP. A Tabela 7 apresenta os teores de glicose, frutose, ácidos orgânicos (lático e acético), glicerol e etanol das amostras de vinho fermentado durante o período controle e o tratamento enzimático seguindo a mesma lógica de análise adotada no item 5.2.

Em função de o processo ser operado em modo contínuo, há maior exposição à contaminação bacteriana neste “*layout*” produtivo. A Tabela 7 mostra que durante os dias de teste industrial houve aumento de 25,4% da concentração de ácido láctico durante a aplicação da enzima em comparação ao período controle, isso indica que houve aumento da contaminação e nos próximos tópicos analisaremos os parâmetros microbiológicos que confirmarão esta constatação.

Tabela 7. Teores de substrato, bioprodutos e subprodutos de vinho bruto de processo industrial de etanol operado em modo contínuo após os tratamentos com e sem adição de preparado enzimático

Parâmetros (g.L⁻¹)	Controle (sem Enzima)	Tratamento (com Enzima)	Diferença Percentual (%)
Glicose	0,252 ^{a*}	0,348 ^b	+37,9
Frutose	3,786 ^a	4,376 ^a	+15,6
Ácido Láctico	7,788 ^a	9,770 ^b	+25,4
Glicerol	4,958 ^a	5,274 ^a	+6,4
Ácido Acético	2,002 ^a	1,866 ^a	-6,8
Etanol	74,296 ^a	77,072 ^a	+3,7

^{*}(a) e (b) representam o Teste de probabilidade de Tukey-Kramer (HSD), valores seguidos da mesma letra não apresentam diferença estatística.

O aumento da glicose liberada no processo contínuo foi de 37,9% (Tabela 7), inferior ao aumento constatado no processo operado em modo batelada 96,8% (Tabela 6), no entanto, as características do processo contínuo não permitem que ocorra um grande aumento da concentração de açúcares redutores ao final do circuito fermentativo, visto que à medida que mais glicose é liberada pela conversão dos polissacáridos e oligossacarídeos infermentescíveis para as leveduras comerciais, este carboidrato é bombeado da primeira dorna até a quarta ou sexta dorna, dependendo das instalações disponíveis.

Neste processo, por se tratar de um sistema fechado em que grande parte da biomassa retorna para o processo e conseqüentemente contem etanol e contaminantes residuais oriundos do vinho, o aumento de 3,7% no teor de etanol reportado na Tabela 7 foi

mais sensível, todavia, ainda insuficiente para resultar em uma diferença significativa através do método de Tukey. Houve um pequeno aumento de 6,4% na produção de glicerol, possivelmente causado pelo acentuado aumento do ácido láctico e também pelos aumentos de glicose e frutose liberadas.

A Tabela 7 ainda confirma um comportamento reportado também na Tabela 6 em relação à redução da concentração de ácido acético durante o período do tratamento enzimático. Por se tratar de um preparado enzimático único, não existe histórico na literatura para afirmar o mecanismo que explique o fato observado de redução do ácido acético, assim, três hipóteses podem ser consideradas. A primeira considera que a presença do preparado enzimático contribua com o desvio da rota bioquímica desta molécula, convertendo-a em outra substância, ou ainda, a segunda hipótese parece favorecer o crescimento de outro microrganismo e desfavorecer o crescimento do principal microrganismo responsável pela produção de ácido acético durante a fermentação etanólica. Já a terceira hipótese por se tratar de um processo industrial com diversas operações unitárias envolvidas, é possível que algum outro composto químico como o sulfito possa influenciar no pH e estágio de protonação fazendo com que o ácido acético não seja quantificado pelo cromatógrafo.

Contudo, a concentração de ácido acético reportada no período controle não apresentou diferença estatística significativa em relação a concentração de ácido acético do período com tratamento enzimático, mesmo apresentando redução percentual de 6,8%.

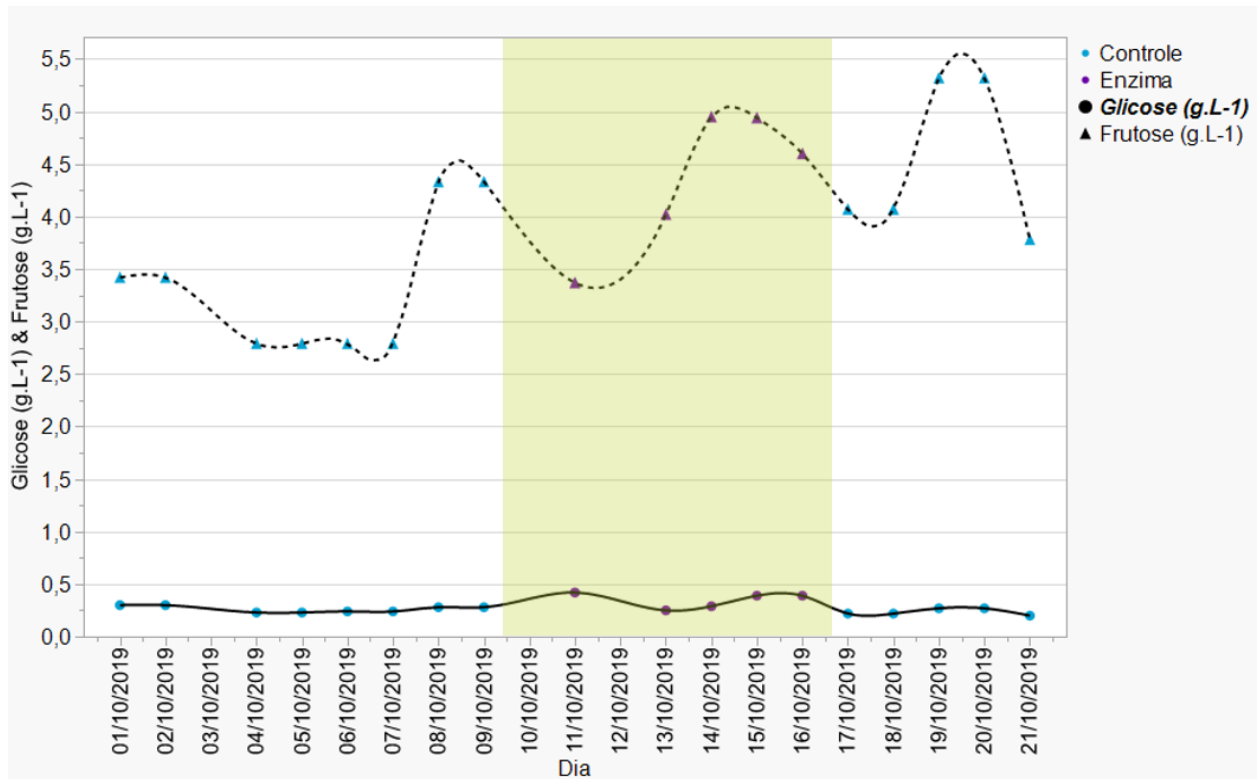
A Figura 18 apresenta os perfis de glicose e frutose, na saída da centrífuga do processo contínuo, em função dos períodos dos ensaios fermentativos, sendo a área hachurada correspondente ao período de aplicação do complexo enzimático no processo industrial. Neste caso, ficou claro que a frutose apresentou maior concentração ao final da

fermentação, em função de não ser a principal fonte de carbono das leveduras, embora ela tenha sido liberada pela ação das enzimas, não foi aproveitada no tempo de fermentação fixo estabelecido para o processo.

Novamente, neste ponto a realização de novos testes industriais poderá contribuir substancialmente para obtenção de dados e melhor entendimento da aplicação do preparado enzimático contendo carboidrases para conversão dos oligo e polissacarídeos em glicose no processo industrial de produção de bioetanol a partir de cana-de-açúcar. Não há na literatura a aplicação de um produto com as mesmas características para este objetivo.

A evolução dos demais parâmetros indicados na Tabela 7 podem ser observados em função do tempo no Apêndice C.

Figura 18. Teores de glicose e frutose em função dos períodos de aplicação e controle realizados em escala industrial com Fermentação Contínua para produção de etanol de cana-de-açúcar.



Fonte: próprio autor.

5.5. Análise da Taxa de Performance Industrial (TPI)

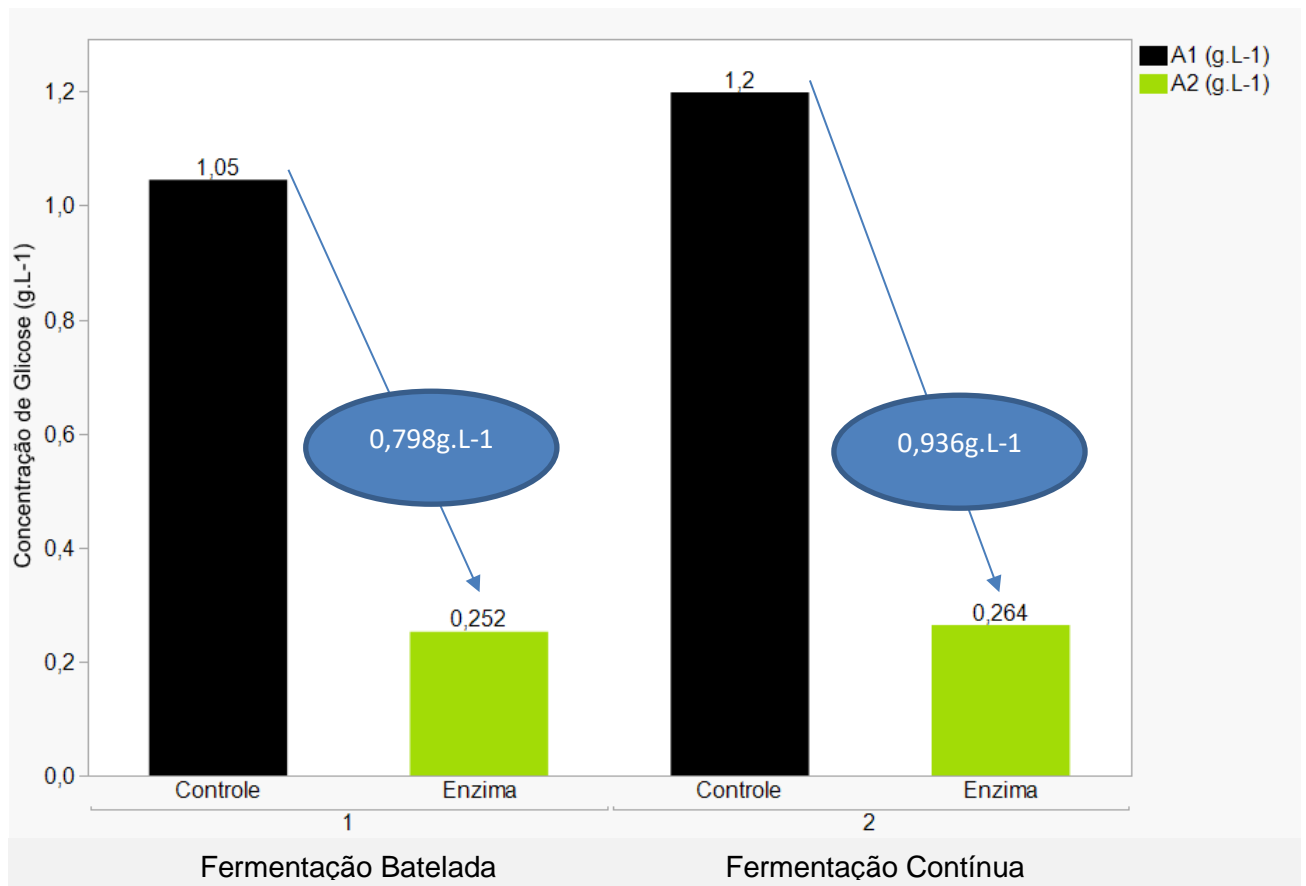
Como no ambiente de fermentação etanólica em escala industrial, diversos fatores controláveis e outros incontroláveis exercem forte influência sob o consumo dos açúcares fermentescíveis pelos microrganismos e produção de etanol, adotou-se o termo Taxa de Performance Industrial (TPI) para analisar as amostras coletadas nas indústrias e tratá-las em condições laboratoriais controladas por meio de hidrólise enzimática e assim minimizar as interferências citadas para melhor entendimento da taxa de conversão real alcançada pelas enzimas em cada usina.

A TPI foi considerada para mitigar as interferências do processo como oscilação de °Brix na alimentação das dornas, variações nas concentrações de fermento, diferentes populações de bactérias contaminantes, vazão de alimentação, temperatura e acidez total. É sabido que mesmo sob condições estáveis de processo, existem pontos de descontrole de temperatura e pH no interior das dornas de fermentação, proporcionando uma menor eficiência das enzimas em escala industrial quando comparadas a escala laboratorial.

Esta informação evidencia o panorama de desempenho destas carboidrases no mosto de fermentação sob influência das diversas oscilações em escala industrial, e ainda é possível prever quanto destes açúcares infermentescíveis podem variar de região para região de acordo com a variedade da cana, tempo de corte e assepsia do processo, bem como a influência destes fatores impactando a atividade enzimática.

Por meio da análise de TPI observou-se um valor médio de $0,798 \text{ g.L}^{-1}$ de liberação de glicose em processo operado em modo batelada indicado à esquerda (Figura 19). Esta liberação deu-se através da conversão dos oligo e polissacarídeos presentes no vinho bruto após a fermentação. No caso do processo operado em modo contínuo, indicado à direita na Figura 19, a disponibilização de glicose manteve-se em $0,936 \text{ g.L}^{-1}$. Portanto, a taxa de performance industrial foi de 75,9% na Usina 1 e 80,4% na Usina 2 em relação aos controles, liberando em média 0,867 gramas de glicose por litro de vinho bruto fermentado.

Figura 19. Valores de glicose liberada (g.L-1) nos processos fermentativos Batelada (esquerda) e Contínuo (direita), aplicando o conceito de Taxa de Performance Industrial (TPI).



Fonte: próprio autor.

Segundo Eggleston e Cote (2003), esta quantidade de açúcares infermentescíveis pode variar de acordo com a variedade da cana-de-açúcar utilizada como matéria prima, condições climáticas nas quais o vegetal se desenvolveu antes de ser transportado do campo, tipo e tempo de transferência da cana entre o corte realizado durante a colheita e seu processamento.

A maior quantidade de oligossacarídeos e polissacarídeos encontra-se nas pontas e em plantas que não atingiram a maturidade. Decisões estratégicas de mercado como alteração do “mix” de produção priorizando o aumento de açúcar ensacado que faz com que

ocorra maior esgotamento do mel de açúcar, reduzindo a pureza deste mel que posteriormente será enviado para a destilaria para produção de etanol, com o “mix” de produção virado para açúcar a maior parte do caldo primário da cana segue para a fábrica e conseqüentemente o mosto da fermentação irá conter mais melaço, contribuindo para o aumento de açúcares infermentescíveis pelas leveduras, uma vez que o processo de cozimento do açúcar na fábrica com o esgotamento das massas A e B, eleva o tempo de cozimento do xarope, contribuindo para o avanço das reações de Maillard com aparecimento das melanoidinas, e concentrando mais os sais, ácidos orgânicos e açúcares infermentescíveis.

Utilizando o software estatístico (JMP 15.0) foi possível analisar o efeito do tratamento enzimático nas usinas entre controle e aplicação do preparado enzimático e confirmar a significância estatística pelo teste de Tukey-Kramer com variância de 5%, sendo os resultados expressos na Tabela 8.

Tabela 8. Análise da glicose liberada em processo de produção de etanol operado em modo batelada e contínuo.

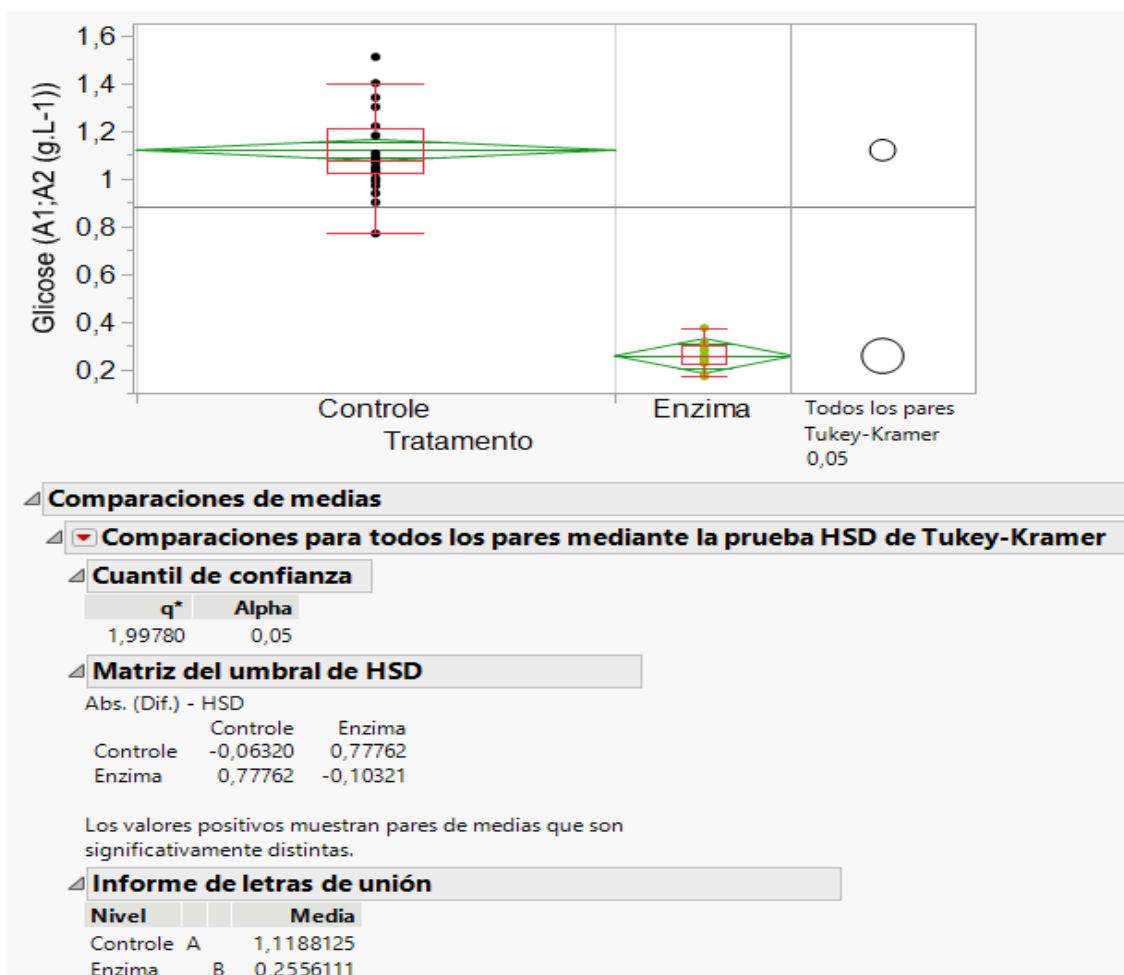
Processo	Controle (g.L ⁻¹) (sem Enzima)	Tratamento (g.L ⁻¹) (com Enzima)	Diferença Percentual (%)
Usina 1 (Batelada)	1,045 ± 0,102 ^{a*}	0,252 ± 0,05 ^b	-75,9%
Usina 2 (Contínuo)	1,198 ± 0,208 ^a	0,264 ± 0,05 ^b	-80,4%

**(a) e (b) representam o Teste de probabilidade de Tukey-Kramer (HSD), valores seguidos da mesma letra não apresentam diferença estatística.*

É possível confirmar estatisticamente que os resultados obtidos antes e após a aplicação enzimática são distintos, portanto, houve significância durante os testes em escala industrial. A informação de letras distintas (a) para controle e (b) para aplicação enzimática confirmam a relevância dos dados durante o tratamento. Além disso, a representação gráfica da Figura 20 permite uma rápida interpretação através dos diamantes em cada variável, sendo que a linha mediana de cada diamante representa a média

calculada para cada respectiva variável. De forma gráfica, quanto mais afastados os círculos estão entre si, maior a significância estatística presente no cálculo. Desta forma, é possível separar os resultados do período controle e do período de aplicação enzimática, uma vez que as circunferências se encontram deslocadas mais para cima “controle” e mais para baixo “aplicação enzimática” da linha mediana do gráfico. Estes dados mostram que independente da estratégia industrial adotada, a aplicação do preparado enzimático foi capaz de aumentar a liberação de glicose fermentescível com significância estatística.

Figura 20. Análise univariável dos tratamentos enzimáticos nos dois processos fermentativos (batelada e contínuo) de acordo com o método de comparação de médias de Tukey-Kramer.



Fonte: próprio autor.

A concentração média de glicose liberada pela conversão dos polissacarídeos e oligossacarídeos através da hidrólise enzimática ao final do processo fermentativo foi 1,118 g.L⁻¹ e nomeamos de A₁ (referindo-se à hidrólise no período controle) ao passo que A₂ foi 0,255 g.L⁻¹ (referindo-se à hidrólise durante a aplicação enzimática industrial). Este delta resultou em 0,863 g.L⁻¹ de glicose liberada que foi potencialmente utilizada pelo ecossistema fermentativo para produção de etanol e manutenção metabólica.

5.6. Avaliação de indicadores de desempenho do processo fermentativo de produção de bioetanol em resposta à aplicação de preparado enzimático

Os parâmetros de processo foram fornecidos pelas próprias Usinas onde os testes ocorreram e suas quantificações foram realizadas nos laboratórios industriais para acompanhamento da qualidade e rotina industrial. Neste tópico serão apresentados primeiramente os resultados oriundos da Usina 1, a qual opera em processo batelada e na sequencia serão apresentados os resultados da Usina 2, a qual opera em processo contínuo, visto que o tipo de processo e também o período de aplicação influenciam nos resultados e deste modo não será possível consolidá-los de forma conjunta.

Para o processo operado em modo batelada, foi constatado alguns parâmetros microbiológicos mais comuns indicados na Tabela 9, onde é apresentada um nível de contaminação bacterina popularmente denominada pelos profissionais da área como sendo dez a sexta média (aproximadamente 6×10^6 células.mL⁻¹), embora a Tabela 9 indique que houve um aumento na dosagem de antibiótico, no entanto, não é possível correlacionar o aumento deste insumo à aplicação enzimática, pois o teste de Tukey (do nível da contaminação bacteriana e consumo de antibiótico) permaneceram com as mesmas letras, confirmando que as médias estatísticas entre os tratamentos não divergem entre si.

A análise de viabilidade celular das leveduras indica o quanto da população de leveduras que se encontram ativas no bioprocesso e representa um fator extremamente importante na fermentação etanólica, pois todo o balanço de massa e energético depende da saúde das leveduras. Não houve aumento significativo da viabilidade durante o tratamento enzimático em comparação ao controle sem adição de enzima (Tabela 9). Também foi constatado um aumento no teor de floculação, no entanto, pode-se atribuir este aumento ao fato da Usina estar produzindo açúcar branco e por isso terem aumentando significativamente o sulfito no mosto (449,2%), ver Tabela 9, e tanto o processo de sulfitação quanto o processo de calcinação provocam um aumento na floculação das leveduras.

A Tabela 9 ainda indica que os parâmetros de consumo específicos de dispersante, antiespumante e dióxido de cloro apresentaram reduções durante o tratamento enzimático, embora sem significância estatística pelo método de Tukey. A redução e diferença estatística apresentada pelo teor de ácido sulfúrico podem estar mais relacionadas à recuperação do processo de um período de chuvas do que propriamente em função da enzima, uma vez que se trata de um processo mecânico sob o qual não houve sugestão de alteração neste trabalho.

Foi averiguado que o teor de açúcar redutor total (ART) do mosto aumentou em 7,7% a oferta de glicose durante o período de aplicação enzimática, quando comparado ao período controle, o que resultou em aumento de 14,8% na produção de etanol (100%) finalizando a fermentação com açúcar redutor residual total reduzido em 43% (Tabela 9).

Tabela 9. Parâmetros industriais referentes às análises microbiológicas, consumos específicos de insumos, parâmetros físico-químicos, gestão industrial e qualidade da matéria-prima em uma Usina com modo de produção em batelada.

Parâmetros	Período Controle	Período Tratamento	Diferença Percentual
Contaminação vinho bruto (Bastonete/mL)	6,92E+06 ^{a*}	6,44E+06 ^a	-6,9%
Viabilidade (%)	87,86 ^a	89,41 ^a	1,8%
Floculação (%)	3,59 ^a	4,15 ^b	15,7%
Dispersante (kg/m ³ Etanol)	0,176 ^a	0,146 ^a	-17,2%
Antiespumante (kg/m ³ Etanol)	0,603 ^a	0,482 ^a	-20,1%
Dióxido de cloro (kg/m ³ Etanol)	0,114 ^a	0,059 ^a	-48,7%
Antibiótico (kg/m ³ Etanol)	0,013 ^a	0,031 ^a	132,4%
Ácido Sulfúrico (kg/m ³ Etanol)	6,552 ^a	5,377 ^b	-17,9%
ART Mosto (%)	18,74 ^a	20,18 ^b	7,7%
Vazão de Mosto (m ³ /dia)	9.923,82 ^a	10.530,92 ^b	6,1%
Sulfito no Mosto(ppm)	5,61 ^a	30,82 ^b	449,2%
Teor de levedo no creme (%)	70,41 ^a	70,55 ^a	0,2%
pH levedo tratado	2,26 ^a	2,34 ^b	3,5%
Teor de levedo no vinho bruto (%)	11,67 ^a	11,75 ^a	0,7%
Teor de levedo no vinho centrifugado (%)	1,34 ^a	1,52 ^b	13,4%
Teor alcoólico vinho bruto (%)	9,20 ^a	9,78 ^b	6,3%
Tempo de alimentação (horas)	5,44 ^a	5,44 ^a	-0,1%
Tempo de fermentação (horas)	7,66 ^a	7,35 ^a	-4,0%
Concentração das Centrifugas (%)	70,41 ^a	70,55 ^a	0,2%
Acidez no Vinho (g/L)	1,82 ^a	1,59 ^b	-12,6%
Temperatura máxima vinho bruto (°C)	34,25 ^a	34,28 ^a	0,1%
ARRT vinho bruto (%)	0,070 ^a	0,040 ^a	-43,0%
Produção de álcool (100%) (L/dia)	1.071.248,53 ^a	1.229.317,77 ^b	14,8%
Rendimento Fermentativo (%)	93,14 ^a	92,38 ^a	-0,8%
Pureza mel estoque (%)	58,34 ^a	61,54 ^a	5,5%
Brix do mel estoque	78,00 ^a	79,04 ^a	1,3%
Acidez do Mel estoque (g H ₂ SO ₄ /L)	5,73 ^a	4,96 ^b	-13,4%
Moagem (Tonelada/dia)	24.932,33 ^a	25.818,90 ^a	3,6%
Mix produção (% ensacado)	39,99 ^a	44,00 ^a	10,0%
Impurezas Minerais (kg/tonelada)	4,34 ^a	4,45 ^a	2,5%
Impurezas Vegetais (kg/tonelada)	50,76 ^a	73,08 ^a	44,0%
Chuva (mm)	0,93 ^a	0,52 ^a	-43,7%

**(a) e (b) representam o Teste de probabilidade de Tukey-Kramer (HSD), valores seguidos da mesma letra não apresentam diferença estatística.*

Durante a aplicação enzimática o tempo de alimentação, indicado pelo momento em que o fermento é transferido do tratamento ácido para o interior das dornas e o mosto começa a ser dosado e dura até o momento que a dorna atinge o volume final, e o tempo de fermentação, ilustrado pelo início com a transferência do fermento até o término da fermentação, ambos foram inferiores durante o tratamento com o preparado enzimático, quando comparado ao período controle, e mesmo sem apresentar diferença estatística sugerem uma tendência de aceleração da fermentação pela maior liberação de açúcares simples e rapidamente metabolizáveis pelos microrganismos. Parte desta glicose possivelmente foi assimilada para formação de biomassa pelas leveduras, visto que os parâmetros de teor de levedo no creme, vinho bruto e vinho centrifugado foram maiores durante o período de tratamento enzimático. Embora as condições tenham melhorado conforme mencionado acima, o rendimento fermentativo verificado pela Usina 1 não apresentou aumento, reduzindo-se em 0,8%, sem diferença estatística, entre o período controle e período de tratamento enzimático.

A Tabela 9 ainda apresenta o cenário da Usina 1 durante o teste, visto que houve um pequeno aumento de moagem (3,6%) durante a aplicação das enzimas, porém o “*mix*” de produção priorizou em 10% a produção de açúcar, resultando no maior uso de mel estoque na composição do mosto para garantir o aumento de vazão de 6,1% e aumento da produção de álcool (100%) em 14,8%. Nesta aplicação o volume de chuvas foi equivalente, não havendo diferenças significativas durante o período de aplicação enzimática e o controle. Da mesma forma as impurezas mineral e vegetal não apresentaram diferenças estatísticas durante o período testado.

A mesma análise feita para o processo batelada foi também aplicada para o processo Contínuo e seus resultados estão registrados na Tabela 10. Importante ressaltar que o

período de aplicação na Usina 2 com produção contínua foi mais próximo do final da safra, conseqüentemente com maiores oscilações de fluxo e intemperismo.

A Tabela 10 indica que durante a aplicação da enzima o processo sofreu aumento de 32,7% no nível de contaminação bacteriana, impactando na redução da viabilidade celular em 3,8%, no entanto, embora tenha ocorrido este aumento no nível de contaminação, não houve grande variação no teor de floculação, com pequeno incremento de 1,7%. Em relação ao modelo estatístico de Tukey, apenas a viabilidade celular apresentou diferença estatística no período com tratamento enzimático em comparação ao período controle.

Os consumos específicos de químicos para controle de espuma, contaminação bacteriana e tratamento ácido do fermento estão representados na Tabela 10. Foi averiguado que mesmo durante o tratamento enzimático não houve diferença estatística pela análise de Tukey-Kramer.

Tabela 10. Parâmetros industriais referentes às análises microbiológicas, consumos específicos de insumos, parâmetros físico-químicos, gestão industrial e qualidade da matéria-prima em uma Usina com modo de produção contínuo.

Parâmetros	Controle (Sem Enzima)	Tratamento (Com Enzima)	Diferença Percentual
Contaminação vinho bruto (Bastonete/mL)	4,23E+07 ^{a*}	5,61E+07 ^a	32,7%
Viabilidade (%)	84,18 ^a	81,02 ^a	-3,8%
Floculação (%)	26,67 ^a	27,13 ^a	1,7%
Dispersante (kg/m ³ Etanol)	0,365 ^a	0,543 ^a	48,7%
Dióxido de cloro (kg/m ³ Etanol)	0,545 ^a	0,372 ^a	-31,8%
Ácido Sulfúrico (kg/m ³ Etanol)	10,231 ^a	10,408 ^a	1,7%
Brix do Mosto	25,07 ^a	24,77 ^a	-1,2%
ART Mosto (%)	20,55 ^a	20,91 ^a	1,8%
Impureza mosto (%)	0,10 ^a	0,11 ^a	6,0%
Vazão de Mosto (m ³ /dia)	4.110,14 ^a	4.161,80 ^a	1,3%
Teor de levedo no creme (%)	30,39 ^a	29,48 ^a	-3,0%
pH levedo tratado	2,40 ^a	2,46 ^a	2,4%
Teor de levedo no vinho bruto (%)	10,54 ^a	11,40 ^b	8,2%
Teor de levedo no vinho centrifugado (%)	1,01 ^a	3,17 ^b	214,8%
Teor alcoólico vinho bruto (%)	8,80 ^a	8,93 ^a	1,5%
Acidez no Vinho (g/L)	4,91 ^a	5,21 ^a	6,1%
ARRT vinho bruto (%)	0,35 ^a	0,27 ^b	-23,4%
Produção de álcool (100%) (L/dia)	517.675,07 ^a	517.127,00 ^a	-0,1%
Rendimento Fermentativo (%)	90,43 ^a	87,45 ^b	-3,3%
Pureza mel estoque (%)	64,69 ^a	68,26 ^b	5,5%
Brix do mel estoque	76,35 ^a	73,00 ^b	-4,4%
Acidez do Mel estoque (g H ₂ SO ₄ /L)	4,93 ^a	3,37 ^b	-31,5%
Moagem (Tonelada/dia)	14.388,34 ^a	15.092,16 ^a	4,9%
Mix produção (% ensacado)	59,98 ^a	61,01 ^a	1,7%
Impurezas Minerais (kg/tonelada)	5,43 ^a	5,30 ^a	-2,4%
Impurezas Vegetais (kg/tonelada)	69,62 ^a	81,00 ^a	16,3%
Dextrana (ppm)	233,79 ^a	219,00 ^a	-6,3%
Amido (ppm)	2.716,43 ^a	3.049,60 ^b	12,3%

**(a) e (b) representam o Teste de probabilidade de Tukey-Kramer (HSD), valores seguidos da mesma letra não apresentam diferença estatística.*

Outros parâmetros relevantes de processo contínuo de fermentação estão condensados na Tabela 10, indicando que houve diferença estatística nos seguintes

parâmetros: teor de levedo no vinho bruto (aumento de 8,2%), teor de levedo no vinho centrifugado (aumento de 214,8%), Açúcar Redutor Residual Total (ARRT) vinho bruto (redução de 23,4%) e produção de álcool (100%) houve redução de 0,1% impactado pela mudança de Mix que priorizou a produção de açúcar, passando de 59,98% para 61,01%. Com estas informações é possível correlacionar a liberação de glicose pela ação das enzimas com o aumento da biomassa indicada nos aumentos expressivos de biomassa nas dornas de fermentação. Por se tratar de um processo contínuo, este aumento de células não foi suficiente para consumir toda a glicose liberada, tendo sido relatado pelo supervisor do processo que houve passagem de dornas “vivas”, isto é, havia açúcar fermentescível até a última dorna do sistema e foi centrifugada ainda com atividade fermentativa. Neste ponto o processo operado em modo contínuo apresenta alguns desafios maiores quando comparado ao processo operado em modo batelada, pois não é possível aumentar o tempo de fermentação sem deslocar o fluxograma produtivo.

Durante os períodos de tratamento enzimático e controle, praticamente não houve alteração significativa nos valores de Brix, ART, Impureza e vazão de mosto. Teor de levedo no creme também não apresentou alteração significativa. Houve um aumento não muito expressivo no teor de etanol do vinho bruto durante a aplicação enzimática (aumento de 1,5%) contribuindo para a teoria de que aumentando a oferta de glicose pela ação das enzimas, há aumento na produção de etanol, no entanto, este aumento foi pequeno frente ao total de glicose liberada indicada nas Tabelas 7 e 8. A acidez no vinho bruto foi aumentada em 6,1% corroborando com o aumento do nível de contaminação bacteriana (Tabela 10).

Infelizmente não foi possível observar aumento do rendimento fermentativo em nenhum dos dois testes realizados, tanto no processo operado em batelada (Tabela 9), bem como o processo operado em modo contínuo (Tabela 10).

A moagem sofreu pequeno aumento durante o período de aplicação enzimática, conforme apresentando na Tabela 10. O “*mix*’ de produção também priorizou mais a fabricação de açúcar no período de teste”. As impurezas minerais e dextrana apresentaram redução de 2,4% e 6,3%, respectivamente, já as impurezas vegetais e amido tiveram aumento de 16,3% e 12,3%, respectivamente. Conceitualmente, espera-se uma maior presença de polissacarídeos e oligossacarídeos quando maiores quantidades de dextrana e amido.

5.7. Avaliação do potencial de agregação de valor e definição de custo da aplicação de preparado enzimático no processo fermentativo de produção de bioetanol

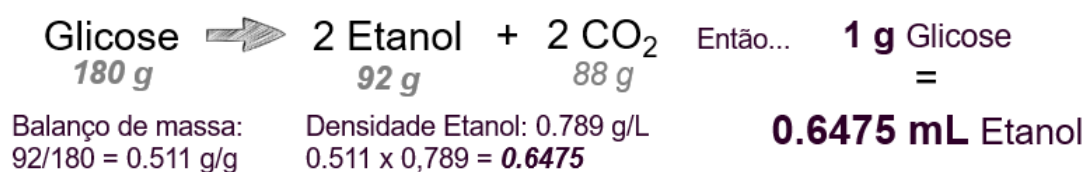
Por se tratar de um produto em desenvolvimento e que ainda não disponível no mercado, a avaliação do potencial de agregação de valor auxilia no entendimento e mensuração do possível custo do produto para aplicação do preparado enzimático no processo fermentativo em atendimento às demandas que podem surgir.

Diante do aumento da competitividade e mercados desafiadores, as Usinas produtoras de Bioetanol buscam por alternativas e mecanismos capazes de incrementar suas operações e agregar valor ao processo. Assim, a definição de valor está intimamente relacionada a percepção do cliente acerca dos benefícios obtidos em termos de realização, satisfação e do que este cede, incluindo fatores monetários e não monetários. No contexto estratégico, o valor diz respeito ao quanto os compradores estão dispostos a pagar por aquilo que os fabricantes estão dispostos a fornecer (IMLAU e GASPARETTO, 2014).

Buscou-se uma verificação simples do valor agregado pelo preparado enzimático em termos de liberação de glicose com potencial de incremento na produção de bioetanol durante a fermentação e com isso sugerir o preço considerando algumas premissas de mercado e benefícios pela aplicação do produto, ressaltando que a ciência de precificação não será exposta neste trabalho.

Considerando o delta de liberação de glicose, conforme apresentado na Figura 18, podem-se fazer algumas correlações considerando a estequiometria da fermentação etanólica de Gay-Lussac, onde uma molécula de glicose dará origem a duas moléculas de etanol e duas moléculas de dióxido de carbono (Figura 21).

Figura 21. Equação geral de Gay-Lussac para fermentação etanólica.



Fonte: próprio autor.

A Tabela 11 apresenta os resultados calculados durante a avaliação de custos para as duas Usinas em que a aplicação industrial foi realizada, assim, pode-se observar que os comportamentos de custos e são diferentes considerando o processo em batelada e contínuo, sendo que parte desta diferença pode estar relacionada com a estratégia de produção adotada e grande parte sofrer influência do processo e agentes contaminantes.

Aplicando o rendimento médio de produção de etanol das duas Usinas sucroalcooleiras como sendo de 92,38% e 87,45% respectivamente para os processos batelada e contínua; desta forma, pela estequiometria é possível incrementar o processo produzindo 0,477 mL e 0,530 mL de etanol por litro de vinho fermentado através das

conversões de 0,798 gramas e 0,936 gramas de glicose liberadas pela ação do preparado enzimático. Considerando os volumes de etanol produzidos por dia e seus teores alcoólicos, pode-se determinar o volume diário de vinho fermentado e ainda com base nos valores calculados de etanol pela conversão de açúcares fermentescíveis, adicionar 5.739 e 2.448 litros de etanol nos processos em batelada e contínuo aqui descritos. Isso acarreta um ganho extra teórico de rendimento fermentativo de 0,47% em cada um dos dois processos.

A geração de valor pode ser calculada considerando o preço de mercado do etanol hidratado como sendo R\$ 2,07 por litro (CEPEA, 2020) e multiplicando este valor pelo ganho diário de etanol em litros, que para efeito de cálculo resulta em R\$ 11.879,38 com ganho específico por metro cúbico de etanol produzido na ordem de R\$ 9,66 no processo em batelada e R\$ 5.068,05 com ganho específico de R\$ 9,80 no processo contínuo.

A precificação de forma simples, considerou a dosagem indicada de 30 mg.L⁻¹ do preparado enzimático sobre o volume diário de vinho fermentado e encontrando os valores de 361 kg.dia⁻¹ para a usina com processo em batelada e 139 kg.dia⁻¹ para a outra usina com processo contínuo. Como os portes das usinas eram diferentes, era esperado que os consumos também seriam diferentes. A sugestão de preço comercial do produto, considerando ganho de 60% para o fabricante desta biotecnologia enzimática e dividindo pelo consumo de enzima, teremos o valor sugerido de venda por quilo de R\$ 19,76 e R\$ 21,95 respectivamente para as Usinas em batelada e contínua.

Desta forma, o balanço do investimento apresenta resultados atraentes, pois mesmo custeando o preparado enzimático nos valores indicados anteriormente ainda é possível que as Usinas alcancem lucros diários de R\$ 4.751,75 no exemplo em batelada e R\$ 2.027,22 para o exemplo em processo contínuo. Extrapolando estes valores para ano safra

de 200 dias, as Usinas criariam acréscimos econômicos na ordem de R\$ 950.350,26 e R\$ 405.444,37, respectivamente para os exemplos Batelada e Contínua.

Tabela 11. Avaliação de custos das aplicações de preparado enzimático em processo batelada e contínuo de produção de bioetanol.

Parâmetros e Premissas		Processo Batelada	Processo Contínuo
Processo Industrial	Glicose Liberada (g.L ⁻¹ de vinho)	0,798	0,936
	Rendimento Fermentativo (%)	92,38	87,45
	Etanol adicional (L.L ⁻¹ de vinho)	0,477	0,530
	Teor alcoólico do vinho bruto (%)	9,78	8,93
	Produção diária de etanol (Litros)	1.229.317	517.127
	Volume diário de Vinho (Litros)	12.022.720	4.617.944
	Ganho diário de etanol (Litros)	5.739	2.448
	Aumento de rendimento (%)	0,47%	0,47%
Valor Gerado	Etanol Hidratado (R\$.L ⁻¹)	R\$ 2,07	R\$ 2,07
	Ganho econômico diário	R\$ 11.883,40	R\$ 5.068,05
	Ganho específico por m ³ de etanol produzido	R\$ 9,67	R\$ 9,80
Precificando	Consumo diário de enzima em (kg)	361	139
	Precificando o preparado enzimático como correspondente a 60% do ganho econômico diário e dividindo pelo consumo de enzima, teremos que o preço sugerido de venda do preparado enzimático pode ser de:	R\$ 19,77	R\$ 21,95
Balanço do Investimento	Custo diário com preparado enzimático com o preço sugerido	R\$ 7.130,04	R\$ 3.040,83
	Lucro diário da usina descontando o custo do preparado enzimático	R\$ 4.753,36	R\$ 2.027,22
	Lucro de Safra com 200 dias	R\$ 950.671,63	R\$ 405.444,37

Fonte: próprio autor.

6. CONCLUSÕES

Os resultados discutidos durante a aplicação em escala industrial do preparado enzimático para liberação de glicose no mosto de fermentação permitem concluir:

- I. A liberação da glicose por meio da hidrólise enzimática aplicando 30 mg.L^{-1} do preparado enzimático no processo fermentativo em escala industrial converteu 75,9% dos oligossacarídeos e polissacarídeos na Usina operada em modo batelada e 80,4% na Usina operada com fermentação contínua, conforme apresentado nos cálculos da Taxa de Performance Industrial. Ambos resultados foram estatisticamente significativos refutando a hipótese nula que estabelece igualdade entre os períodos controle e aplicação do preparado enzimático, deste modo, comprovando que o objetivo de conversão dos açúcares, infermentescíveis pela levedura, em glicose fermentescível ocorre em escala industrial;
- II. Não foi observado aumento real com significância estatística do rendimento do processo fermentativo durante a análise desta aplicação em escala industrial, possivelmente em função das grandes distorções volumétricas geradas pelas flutuações de processo e pela forma que é calculado o rendimento fermentativo, considerando o esgotamento do processo com o balanço de massa sujeito a mudanças de “*mix*” de produção e paradas, sejam elas programadas ou por chuvas;
- III. Constatou-se a redução do ácido acético da ordem de 53,8% no processo em batelada e 6,8% no processo contínuo. Os dados aqui apresentados não permitem concluir que esta redução está associada a redução de contaminação, sendo necessários novos estudos para esclarecimento;

- IV. O teor médio de levedo no vinho centrifugado aumentou 114,1% nas duas Usinas testadas, sendo 13,4% no processo em batelada e 214,8% no processo contínuo, indicando que a liberação de glicose extra pela ação do preparado enzimático sobre os polissacarídeos e oligossacarídeos forneceu condições de multiplicação dos microrganismos resultando em aumento de biomassa.
- V. O delta médio resultante destas duas aplicações foi de 0,863 gramas de glicose por litro de vinho fermentado, o que teoricamente pode contribuir com o aumento do rendimento fermentativo em 0,47%, de modo que a Usina operada em modo batelada se beneficiaria de 5.739 litros extras de etanol por dia e a Usina operada em modo contínuo poderia produzir outros 2.448 litros dia com a mesma matéria-prima.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, F. A. D. de. **Intensificação do processo de purificação do caldo da cana-de-açúcar por decantação química e adsorção**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco. Pernambuco, Brasil 2017.

BARBOSA, N.A.A. et al. Digestibilidade ileal de frangos de corte alimentados com dietas suplementadas com enzimas exógenas. **Comunicata Scientiae**, v. 5, n. 4, p. 361-369, 2014.

BNDES. CGEE. Banco Nacional para o Desenvolvimento Social e Econômico; Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. Bioetanol de cana-de-açúcar: Energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro: BNDES. CGEE, 2008. p.316.

BONASSA, Gabriela et al. Subprodutos Gerados na Produção de Bioetanol Bagaço Torta de Filtro água de Lavagem e Palhagem. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 4, n. 3, p. 144- 166, 2015.

BORGES, Eduardo P.; MORAES, Maria E.; GIL, Tainá P.; LOPES, Mário L.; AMORIM, Henrique V. Oligossacarídeos podem reduzir o rendimento em 1,8%. Disponível em: <http://www.portalfit.com.br/2014/Junho/13/oligossacarideos-podem-reduzir-o-rendimento-em-1/4>, acesso em 19 de dezembro de 2018, 2014.

BUCKERIDGE, Marcos S. et al. Comparação entre os sistemas fotossintéticos C3 e C4. Disponível em: <http://saulcarvalho.com.br/wp-content/uploads/2016/10/sistemas-c3-c4.pdf>, acesso em 25 de outubro de 2020, v. 4, 2009.

CALDAS, C. Novo Manual para Laboratórios Sucroalcooleiros, STAB, Piracicaba. 2012.

CAMPESTRINI, E; SILVA, V. T. M.; APPELT, M. D. Utilização de enzimas na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 2, n. 6, p. 254-267, 2005.

CAZETTA, M. L.; CELLIGOI, M. A. P. C. Aproveitamento do melaço e vinhaça de cana-de-açúcar como substrato para produção de biomassa protéica e lipídica por leveduras e bactéria. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 26, n. 2, p. 105-112, 2005.

CEPEA - Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. Etanol Agro CEPEA-ESALQ-USP. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/indicador/etanol.aspx>. Acesso em: 29 de Novembro de 2020.

CESAR, L, E. V. **Divergência genética e caracterização de variações de cana-de-açúcar para produção de cachaça artesanal**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Lavras. Minas Gerais, Brasil, 2013.

CONAB. País confirma recorde na produção de etanol: 35,6 bilhões de litros na safra 2019/20. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/3342-pais-confirma-recorde-historico-na-producao-de-etanol-35-6-bilhoes-de-litros-na-safra-2019-20>>. Acesso em: 25 de abril de 2020.

COSTA, V. M.; BASSO, T. O.; ANGELONI, L. H. P.; OETTERER, M.; BASSO, L. C. Produções de ácido acético, etanol e dos isômeros óticos do ácido láctico por linhagens de *Lactobacillus* isoladas de fermentações alcoólicas industriais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 2, p. 503-509, 2008.

DE BARROS, V.R.S.M. **Avaliação nutricional da fitase e suas interações para Frangos de corte**. Tese (Doutorado). Universidade federal de viçosa. Minas Gerais, Brasil 2016.

DELMASCHIO, I. B. Enzimas na alimentação de animais monogástricos – Revisão de literatura. **Revista Científica de Medicina Veterinária-UNORP**, v.2, n.1, p. 06-20, 2018.

EGGLESTON, Gillian; COTE, Gregory L. **Oligosaccharides in food and agriculture**. Washington, DC: Oxford University Press, 2003. Chapter 1, p. 1-14. (ACS Symposium Series. Volume n. 849).

EGGLESTON, Gillian; GRISHAM, Michael P. Oligosaccharides in cane and their formation on cane deterioration. In: EGGLESTON, G.; COTE, G.L. (editors). **Conformational Studies of Oligosaccharides**. Washington, DC: ACS Publications, 2003. p. 211-232. (ACS Symposium Series. Volume n. 849).

EGGLESTON, G.; MOREL DU BOIL, P.G.; WALFORD, S.N. A review of sugarcane deterioration in the United States and South Africa. **Proceedings of the South African Sugar Technologists Association**. v. 81. p. 72-85, 2008.

EGGLESTON, G.; LEGENDRE, B. L.; RICHARD, C. Effect of harvest method and storage time on cane deterioration. I: Cane quality changes. **International Sugar Journal**, v. 103, 331–338, 495-504. 2001.

ELBA, P. S. et al. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. **Interciência**, p. 249-262, 2008.

FARINE, S.; VERLUIJS, C.; BONNICI, P. J.; HECK, A.; L'HOMME, C.; PUIGSERVER, A.; BIAGINI, A. Application of high performance anion exchange chromatography to study invertase-catalysed hydrolysis of sucrose and formation of intermediate fructan products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, p. 55-60, 2001.
<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs002530000493>.

FIREMAN, F.A.T.; FIREMAN, A.K.B.A.T. Enzimas na alimentação de suínos. **Ciência Rural**. v. 28, n.1, p.173-178. 1998.

GAETE, A. V.; TEODORO, C. E. S.; MARTINAZZO, A. P. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de celulase: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, e567985785, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i8.5785>.

GIESE, Ellen C. et al. Produção, propriedades e aplicações de oligossacarídeos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 2, p. 683-699, 2011.

GOES, E. et al. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química nova**, v. 30, n. 1, p. 136-145, 2007.

GOMES, E. M. S., **Influência das concentrações de açúcares nos mostos sobre o desempenho da fermentação etanólica conduzida em batelada alimentada com vazão variável de alimentação**. Maceió, 21p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Alagoas, 2011.

GOMES, J. F. F. **Produção de Colmos e exportação de macronutrientes primários por cultivares de cana-de-açúcar (*Sacharum spp.*)**. Piracicaba, 65p. Dissertação (M. ESALQ/USP, 2003.

IMLAU, J. M.; GASPARETTO, V. Agregação de valor: estudo em uma agroindústria familiar de hortifrutigranjeiros. **PERSPECTIVA**. Erechim, v. 38, n. 142, p. 91-102, 2014.

KANDLER, O.; HOPF, H. Occurrence, metabolism, and function of oligosaccharides. In: PREISS, J. (ed.). *The Biochemistry of Plants. Volume 3: Carbohydrates Structure and function*. New York: Academic Press, 1980. p. 221-270.

LEVITT, J. **Response of Plants to Environmental Stresses**. 2nd. ed, New York: Academic Press, 1980. v. 1.

LIMA, L. H. U. **Efeito do ácido acético nas enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase de *Candida guilliermondii***. Dissertação. (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena. 2002.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de Etanol. In: LIMA, U. A. et al. (Coord.). **Biotecnologia Industrial. Processos Enzimáticos e Fermentativos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 3, cap. 1, p. 1-43.

LIONNET, G. R. E. A review of cane quality in South Africa and its impact on factory performance. **Proceedings of the Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists**, 13, p. 103–113. 1996.

LOPES, C. H.; GABRIEL, A. V. M. D.; BORGES, M. T. M. R. **Produção de etanol a partir da cana-de-açúcar: tecnologia de produção de etanol**. São Carlos: SEaD; UFSCAR, 2017.

LOPES, F.P. **Otimização da produção de xilanase por levedura silvestre**. 2010.89f. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2010.

LORA, E.E. S.; VENTURINI, O. J. **Biocombustíveis**. Rio de Janeiro: Interciência, 2012. v.1, p. 370-377.

PERNA, M. S. C.; FINGER, P. H.; GALLO, J. M. R. Avaliação da bioconversão de xilose em etanol pela levedura *Meyerozyma guilliermondii* isolada no processo de fabricação de etanol brasileiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOCATÁLISE, 20. São Paulo. 2019.

RODRIGUEZ, C.; VICENTE, C. The origin of soluble fructans in sugar cane juice. **International Sugar Journal**. v. 92, p. 155-159, 1990.

ROVIERO, Juliana Pelegrini. **Produção de etanol a partir de mosto hidrolisado hemicelulósico de ponta e palha de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2013.

MARQUES, Tadeu A.; RAMPAZO, Érick M.; MARQUES, Patricia A. A. Oxidative enzymes activity in sugarcane juice as a function of the planting system. **Food Science and Technology**, v. 33, n. 1, p. 146-150, 2013.

MENEGHETTI, C. **Associação de enzimas em rações para frangos de corte**. 2013. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, 2013.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista processos químicos**, v. 3, n. 5, p. 9-23, 2009.

MOREL DU BOIL, P. G. Cane deterioration—oligosaccharide formation and some processing implications. **Proceedings of the South African Sugar Technologists Meeting**, p. 146–154. 1995.

MOREL DU BOIL, P. G. The role of oligosaccharides in crystal elongation. **Proceedings of the South African Sugar Technologists Meeting**, v. 65, p. 171–178. 1991.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NÓBREGA, I. C. da C. **Apostila de Tecnologia de produtos Agropecuários – Tecnologia Pós colheita da cana-de-açúcar.** Universidade Federal Rural de Pernambuco – Departamento de Tecnologia Rural, Recife-PE, 2009.

NUNES, M. de F. **Atividades das enzimas celulase e xilanase durante a decomposição anaeróbia de macrófitas aquáticas** **Atividade das enzimas celulase e xilanase durante a decomposição anaeróbia de macrófitas aquáticas.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos. 2010.

OLIVEIRA, M.C.; MORAES, V.M.B. Mananoligossacarídeos e enzimas em dietas à base de milho e farelo de soja para aves. **Ciência Animal Brasileira**, v.8, n.3, p.339-357, jul./set. 2007.

OTT, R. P. **Utilização de carboidrases em dietas para frangos de corte.** Dissertação (Mestre em Zootecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia; Porto Alegre, 2005.

PARAZZI, C.; PAPIN, L. F.; SOUZA BELLUCO, A. E. Hidrólise enzimática do amido do caldo da cana-de-açúcar na fermentação etanólica. **Revista Ciência, Tecnologia & Ambiente**, v. 5, n. 1, p. 15-22, 2017.

PEIXOTO-NOGUEIRA, S.C. et al. Estabilidade xilanásica no rúmen e digestibilidade in vitro de volumosos tratados com extrato enzimático de *Aspergillus niger*. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.7, n.1, p. 46-60, 2013.

PESSÔA, G.B.S.; TAVERNARI, F.C.; VIEIRA, R.A.; ALBINO, L.F. Novos conceitos em nutrição de aves. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.13, p.755-774, 2012.

POLLACK, C. J.; CAIMS, A. J. Fructan Metabolism in Grasses and Cereals. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v. 42, p. 77-101, 1991.

PMGCA – Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar. – Catálogo de Variedades, 2003.

RAMOS, E. L.; RAVELO, S. Sugarcane oligosaccharides and their impact on sucrose quality and factory efficiency. **Sugar Tech**, v. 11, n. 2, p. 185-188, 2009.

RAVELO, S. B., RAMOS, E. L., MEJIRAS, R. Sugar cane deterioration and its implications in the factory. **International Sugar Journal**, v. 93, p. 82–86. 1991.

RAVELO, S. B., RAMOS, E. L.; TORRES, B. M. P. Origin of oligo-and polysaccharides in cane juice and their effect on sugar mill efficiency. **Proceedings of the International Society of Sugar Technologists Congress**, v. 21, n. 3, p. 894–905. 1995.

SANTOS, F.; COLODETTE, J.; QUEIROZ, J. H. Bioenergia e Biorrefinaria: Cana-de-açúcar e espécies florestais. Viçosa: Os Editores, 2013.

STUPIELLO, J.P. Pontas de cana: problema industrial? **STAB, Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.18, p.12, 2000.

WALKER, G. M.; BASSO, T. O. Mitigating stress in industrial yeasts. **Fungal biology**, v. 124, n. 5, p. 387-397, 2020.

APÊNDICE A. METODOLOGIA DE ANÁLISES LABORATORIAIS

DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE AÇÚCARES

Para a determinação dos açúcares (sacarose, frutose e glicose) foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para isso a amostra foi previamente diluída e filtrada em membrana de 0,45 µm. Para a análise foi utilizado um cromatógrafo de íon (marca Thermo, modelo ICS-5000+DC), munido com uma coluna (Dionex Carbo Pac TM PA1 4 x 250 mm), vazão de 1,25 mL.min⁻¹ e temperatura de forno de 25 °C. Para a detecção foi utilizado um detector do tipo eletroquímico (ICS-500+DC), a 25 °C.

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE IMPUREZAS

Para determinação do teor de impurezas a amostra foi homogeneizada em frasco de coleta de 500 mL. Em seguida a amostra foi transferida para um tubo de vidro (100 mL) e acertado até o menisco. Então, a amostra foi centrifugada a 3000 rpm durante 15 min. Ao término da centrifugação foi realizada a leitura no tubo de vidro, medindo o material precipitado (*pellet*) da parte inferior até a superior na régua em sua lateral. O valor de impurezas foi calculado conforme a Equação 1.

$$I = V/S * 100 \% \text{ (Equação 1)}$$

Onde:

I = Impurezas (%).

V= Volume de impurezas decantadas (*pellet*) (mL).

S = Somatória dos volumes (*pellet* + solução límpida) (mL).

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ETANOL

Para a determinação do teor de etanol foi utilizado o densímetro eletrônico digital (Anton Paar). Para isso a amostra foi previamente destilada no funil do densímetro por 3 vezes e então foi realizada a leitura do grau (°G) diretamente no “display” do equipamento.

DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE CONTAMINAÇÃO BACTERIANA

Para procedimento de determinação do nível de contaminação foram preparadas duas soluções, como se segue: solução A: sulfato azul de Nilo 2 % (massa/volume); solução B: azul de metileno a 0,2 % (massa/volume). Em seguida as soluções A e B foram misturadas em partes iguais, obtendo-se a solução C, que permaneceu em repouso por 24 h a 25°C. Após o repouso a solução C foi filtrada em papel de filtro e estocada até o seu uso. 5 mL da amostra foi homogeneizada e transferida para um tubo de ensaio. Algumas gotas de papaína foram adicionadas ao tubo o qual foi homogeneizado em agitador vortex. Então, a amostra previamente diluída foi misturada com a solução C (em parte iguais) e homogeneizada em agitador vortex gerando a solução D. Foi preparada a câmara de Neubauer, cobrindo a superfície espelhada com uma lamínula. Então, foi transferida a solução D em um volume suficiente para preencher a câmara de Neubauer e analisado ao microscópio óptico pela imersão (objetiva de 100 x). Então, foi realizada a contagem de bastonetes não corados (viáveis) presentes nos 4 retículos centrais de 25 quadrículos da câmara de Neubauer. Os bastonetes corados de azul não foram contados.

O cálculo do nível de contaminação bacteriana foi realizado conforme a Equação 2.

$$B = C/N * V * FD * FM \text{ (Equação 2)}$$

Onde:

B = Contaminação bacteriana. (Bastonetes.mL⁻¹).

C = N^o de bastonetes contados.

N = N^o de campos do microscópio.

V = Volume da amostra (mL).

FD = Fator de diluição (mL).

FM = Fator de imersão do microscópio (x).

DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Para a determinação da viabilidade celular foi pesado 0,1 g de eritrosina que foi dissolvida em 10 mL de água destilada autoclavada. Também foi pesado 17,9 g de fosfato dissódico (Na₂HPO₄) e dissolvido em 250 mL de água destilada autoclavada. Então, misturaram-se as duas soluções, obtendo-se a solução A. Em seguida foi pesado 6,89 g de fosfato monossódico anidro (Na₂HPO₄) que foi dissolvido em 250 mL de água destilada autoclavada obtendo-se a solução B. Na sequência foram misturadas as soluções A e B, obtendo-se a solução C. A solução C foi adicionada em geladeira conservando sob refrigeração. 5 mL da solução C foram transferidos para um tubo de ensaio o qual foi também adicionado papaína (para desfloculação da amostra). Na sequência o tubo foi agitado e permaneceu em repouso por 5 min. 1 mL da amostra resultante previamente diluída foi transferida para outro tubo de ensaio, o qual continha 1 mL de solução de eritrosina (P.A.), a qual foi homogeneizada em agitador vortex, obtendo-se a solução D. Foi preparada a câmara de Neubauer, cobrindo a superfície espelhada com uma lamínula. Então, foi transferida a solução D em um volume suficiente para preencher a câmara de Neubauer e analisado ao microscópio óptico pela imersão (objetiva de 100 x). Foram quantificadas células vivas, mortas e brotos presentes nos 4 retículos centrais dos 25 quadrículos da câmara de Neubauer. Três tipos de células foram quantificadas: células incolores (viáveis), células coradas em rosa (não viáveis) e brotos não corados (viáveis). Os brotos corados em rosa (inviáveis) não foram quantificados.

Então, foi realizado o cálculo conforme a Equação 3.

$$VB = T * CT * 100 \% \text{ (Equação 3)}$$

Onde:

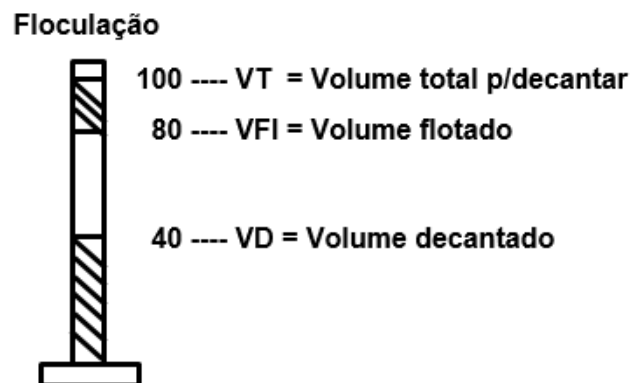
VB = Viabilidade celular (% células viáveis).

T = N^o total de células vivas.

CT = 1/(N^o total de células vivas + N^o total de células mortas).

DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE FLOCULAÇÃO

A amostra foi adicionada em uma proveta graduada de vidro de 100 mL que permaneceu em repouso por 15 min. Após o repouso foi realizada a leitura, conforme apresentado no esquema abaixo.



Esquema de determinação do nível de floculação. **Fonte:** manual de métodos analíticos (USC, 2020).

Então, foi realizado o cálculo conforme a Equação 4.

$$F = (VFI - VD)/VT * 100 \% \text{ (Equação 4)}$$

Onde:

F = Floculação (%).

VFI = Volume flotado (mL).

VD = Volume decantado (mL).

VT = Volume total (mL).

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE LEVEDO

Para determinação do teor de levedo a amostra foi homogeneizada e transferida para dois tubos Falcons até a marca de 10 mL. Os tubos foram centrifugados a 3000 rpm durante 5 min. Ao término da centrifugação foi realizada a leitura do volume total e de sólidos decantados no fundo dos tubos Falcons.

Então, foi realizado o cálculo conforme a Equação 5.

$$L = VL/VT * 100 \% \text{ (Equação 5)}$$

Onde:

L = Teor de levedo (%).

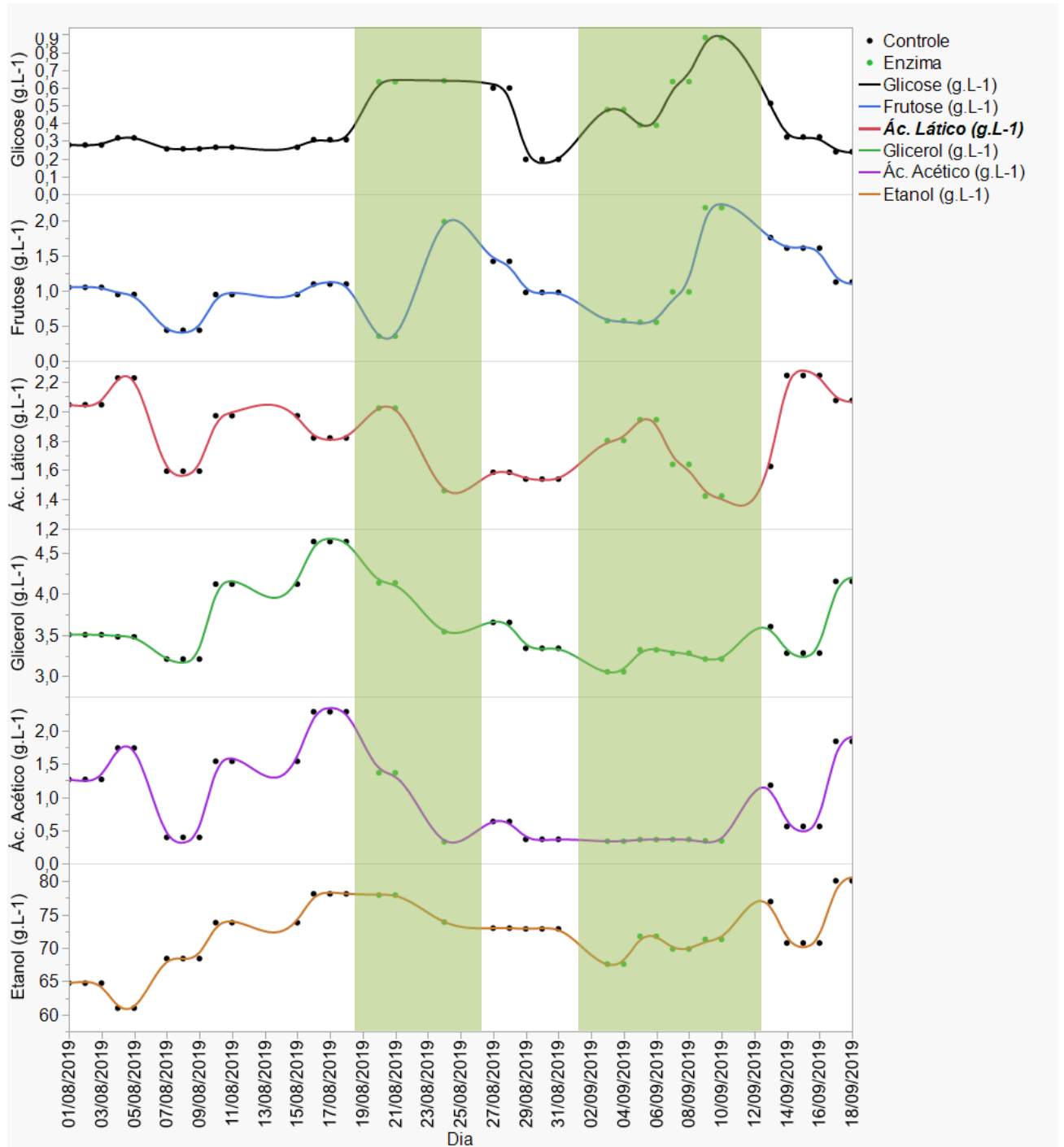
VL = Volume inferior de levedo (mL).

VT = Volume total da amostra (mL).

DETERMINAÇÃO DO PH

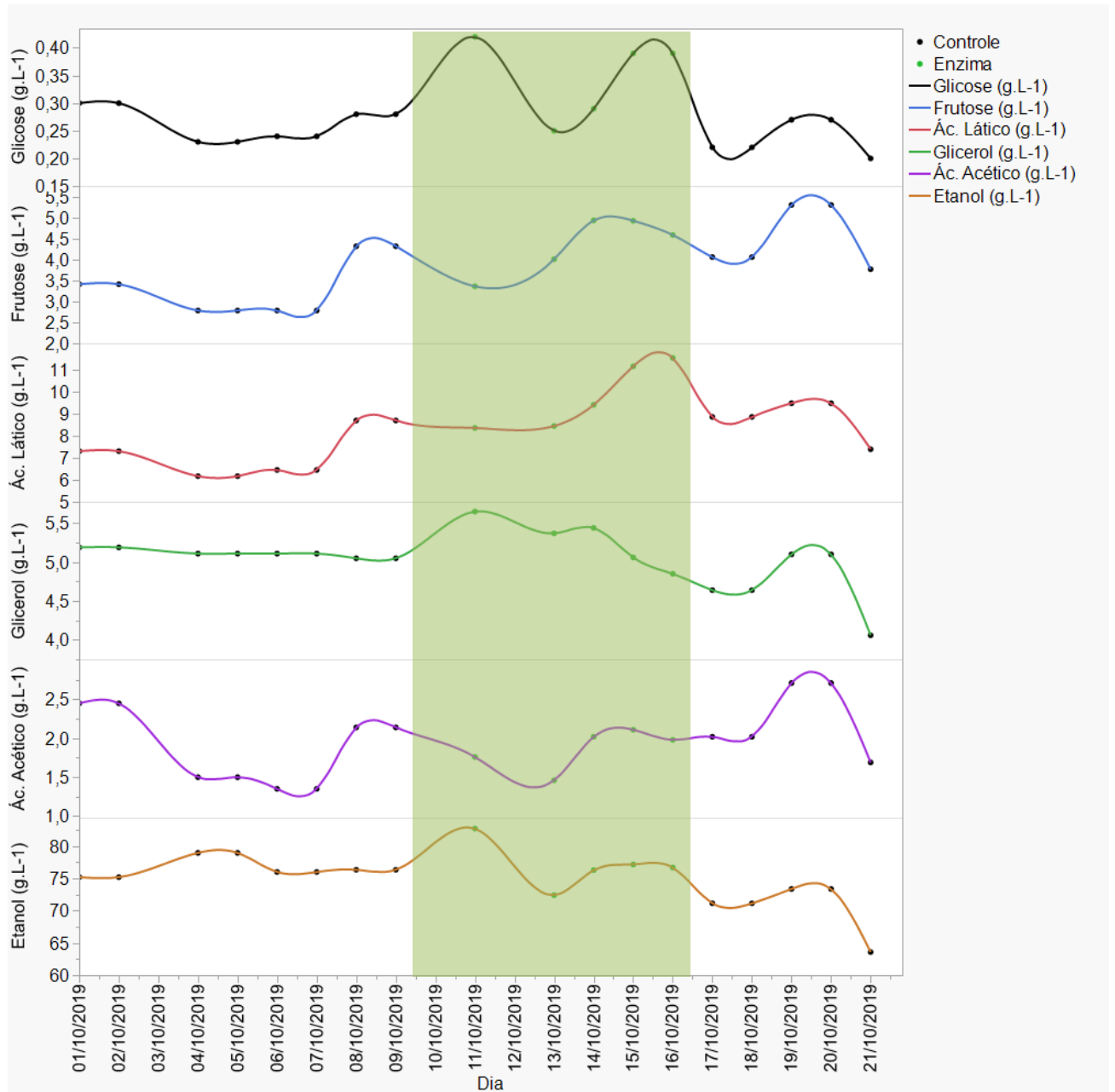
Para determinação do pH a amostra foi resfriada até 25 °C e em seguida foi transferida para um béquer e introduziu-se o eletrodo na amostra até cobrir o bulbo de vidro tomando o cuidado de manter o nível de amostra abaixo do nível do eletrólito e então foi realizada a leitura de pH no “display” do pHmetro.

APÊNDICE B. TABELA 6. TEORES DE SUBSTRATO, BIOPRODUTOS E SUBPRODUTOS DE VINHO BRUTO DO PROCESSO INDUSTRIAL OPERADO EM MODO BATELADA



Fonte: próprio autor.

APÊNDICE C. TABELA 7. TEORES DE SUBSTRATO, BIOPRODUTOS E SUBPRODUTOS DE VINHO BRUTO DO PROCESSO INDUSTRIAL OPERADO EM MODO CONTÍNUO



Fonte: próprio autor.