

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 20/03/2022.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

PRODUÇÃO DE ETANOL DE CANA ENERGIA POR
***Pichia Kudriavzevii* COMPARADO COM MÉTODOS**
CONVENCIONAIS

Calisto Nonato Silva Junior

Engenheiro Químico

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

PRODUÇÃO DE ETANOL DE CANA ENERGIA POR
***Pichia Kudriavzevii* COMPARADO COM MÉTODOS**
CONVENCIONAIS

Calisto Nonato Silva Junior

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton

Dissertação apresentada à
Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias – UNESP, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título
de Mestre em Microbiologia
Agropecuária.

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva Junior, Calisto Nonato
S586p Produção de etanol de cana energia por *Pichia kudriavzevii*
comparada com métodos convencionais / Calisto Nonato Silva Junior.
-- Jaboticabal, 2020
63 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Márcia Justino Rossini Mutton

1. Bioenergia. 2. Cana-de-açúcar. 3. Fermentação etanólica. 4.
Suplementação de nutrientes. 5. Biocombustíveis. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

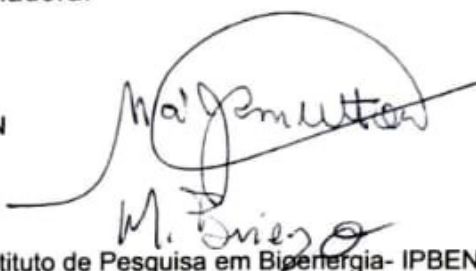
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: PRODUÇÃO DE ETANOL DE CANA ENERGIA POR *Pichia kudriavzevii*
COMPARADO COM MÉTODOS CONVENCIONAIS

AUTOR: CALISTO NONATO SILVA JUNIOR

ORIENTADORA: MÁRCIA JUSTINO ROSSINI MUTTON

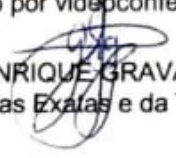
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MICROBIOLOGIA
AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Prof.ª Dr.ª MÁRCIA JUSTINO ROSSINI MUTTON
Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. MICHEL BRIENZO
Laboratório de Caracterização de Biomassa / Instituto de Pesquisa em Bioenergia- IPBEN/ UNESP-Câmpus de
Rio Claro - (participação por videoconferência)

Prof. Dr. GUSTAVO HENRIQUE GRAVATIM COSTA
Departamento de Ciências Exatas e da Terra-UEMG / Frutal/MG



Jaboticabal, 20 de março de 2020

Epígrafe

“To alcohol: the cause of... and
solution to... all of life’s problems.”

- Homer J. Simpson

**A minha mãe e ao meu pai
pelo incentivo, conselhos,
compreensão e amor
incondicionais.**

**A minha irmã pela amizade,
carinho e companheirismo ao
longo desta caminhada,
sempre acreditando no meu
potencial.**

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me concedeu o privilégio de nascer e viver entre pessoas incríveis que são a base de toda minha caminhada e desta conquista.

Aos meus pais e irmã pelo carinho, incentivo, credibilidade, compreensão e companheirismo nas horas difíceis;

À prof. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton, orientadora desta dissertação, pela oportunidade de aprendizado e crescimento pessoal e profissional, confiança no meu trabalho, pela acolhida, por todo o conhecimento transferido, pela sabedoria e amizade.

Ao Programa de Microbiologia Agropecuária e à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV/UNESP) pela oportunidade de realização do curso, todo o conhecimento e aprimoramento profissional adquiridos;

Aos membros da banca examinadora pela participação e considerações para enriquecimento deste trabalho;

Ao Dr. Diandro Ricardo Barilli, pelo companheirismo incondicional em todos os momentos de conclusão deste ciclo, pelo tempo, empenho, paciência, estímulo e dedicação dispensados a mim e ao meu trabalho;

A todos do Laboratório de Tecnologia do Açúcar e do Alcool, pelos bons momentos de aprendizado, de alegria e pela colaboração: Prof. Miguel Mutton, Aline, Vitor, Natália, Cristhyane, Franciele, Letícia, Lidyane e Sérgio;

A todos os estagiários do Laboratório de Tecnologia do Açúcar e do Alcool especialmente Matheus, Pedro e Lucas, companheiros fiéis de bancada.

Aos bons amigos que fiz em Jaboticabal: Nicole, Thaís, Maynumi, Mariane e Tatiane, que sempre estiveram comigo nos momentos bons e mesmo nos não tão felizes, pessoas que foram fundamentais para a conclusão deste estudo;

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação da FCAV/UNESP, pela acolhida e por toda a ajuda;

Ao pessoal da República Tua Ksa, pela acolhida, amizade e ensinamentos;

Ao meu melhor amigo Yan Laranjo Cardoso Pimenta, pelo incondicional apoio durante todos esses anos;

A todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a concretização desse estudo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Biocombustíveis.....	3
2.2 Cana-de-açúcar	6
2.3 Melhoramento genético da cana-de-açúcar.....	9
2.4 Cana energia	11
2.5 Etanol.....	13
2.6 Tecnologias de produção de etanol	14
2.6.1 Etanol de primeira geração (1G)	14
2.6.2 Etanol de segunda geração (2G)	16
2.7 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
2.8 <i>Pichia kudriavzevii</i>	18
2.9 Fatores que afetam a fermentação alcoólica	20
2.9.1 Suplementação de nutrientes na fermentação alcoólica	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Instalação e condução dos ensaios	25
3.2 Matérias-primas	25
3.3 Microrganismos	26
3.4 Caracterização tecnológica dos caldos.....	26
3.5 Determinação da concentração de nutrientes	26
3.6 Clarificação do caldo de cana.....	26
3.7 Preparo dos mostos.....	27

3.8 Preparo do inóculo.....	28
3.9 Delineamento experimental	28
3.10 Processo fermentativo	29
3.11 Monitoramento microbiológico de leveduras.....	29
3.12 Monitoramento de massa celular	30
3.13 Caracterização dos vinhos, determinação da produtividade e cálculo da eficiência fermentativa	30
3.14 Análise estatística	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 Qualidade da matéria-prima	32
4.2 Produtividade agrícola e potencial produtivo	33
4.3 Parâmetros fermentativos.....	35
4.4 Nutrientes	37
4.5 Monitoramento microbiológico de leveduras.....	39
4.6 Caracterização do vinho	47
4.7 Eficiência fermentativa.....	52
5 CONCLUSÃO	54
6 REFERÊNCIAS.....	55

PRODUÇÃO DE ETANOL DE CANA ENERGIA POR *Pichia kudriavzevii* COMPARADO COM MÉTODOS CONVENCIONAIS

RESUMO - O bioetanol é uma das principais alternativas aos combustíveis fósseis, destacando-se pelas excepcionais características de ser um combustível renovável que apresenta sustentabilidade energética, econômica e ambiental. Para atender à demanda crescente por este biocombustível sem aumento da área cultivada, deve-se maximizar a produtividade agroindustrial, além de se incorporar novas matérias-primas e/ou tecnologias de produção. Neste contexto, a cana energia apresenta potencial de utilização devido a características de maior teor de fibras e elevada produtividade agrícola, podendo ser utilizada na produção de etanol 1G e 2G, além da cogeração de energia elétrica. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de etanol utilizando-se mostos provenientes de cana-de-açúcar (CTC2) e cana energia (Vertex9), empregando-se duas cepas de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia kudriavzevii*), isoladas ou em consórcio. Foram avaliadas as características físico-químicas e tecnológicas dos mostos, além dos parâmetros microbiológicos (viabilidade de células e de brotos e brotamentos (%), durante o desenvolvimento do processo fermentativo. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em parcelas sub subdivididas, com 3 repetições. Os tratamentos principais foram dois genótipos de cana (cana-de-açúcar e cana energia), os secundários foram constituídos por 4 condições fermentativas de pH (3,5 e 4,5) e temperatura (32°C e 37°C), sendo as leveduras inoculadas isoladamente ou em consórcio (50% *P. kudriavzevii* + 50% *S. cerevisiae*). Os tratamentos terciários foram constituídos pelos 6 tempos de avaliação (0, 3, 6, 9, 12 e 15 horas). Concluído o processo fermentativo, os vinhos produzidos foram caracterizados quanto aos teores de ARRT, teor alcoólico, teor de glicerol e eficiência fermentativa. Os resultados obtidos indicam que o caldo da cana energia (Vertex9) apresentou baixas concentrações de Fósforo, Zinco, Manganês e Cobre, sendo que a suplementação nutricional realizada contribuiu para o melhor desempenho das leveduras. Fermentações realizadas com a combinação das leveduras tiveram maior formação de biomassa e menor desempenho fermentativo. A fermentação por *P. kudriavzevii* (LJ03) resultou em vinhos com menores teores de glicerol, além de maior eficiência fermentativa em mostos de cana-de-açúcar (90,48%). A fermentação com *S. cerevisiae* apresentou maior eficiência fermentativa em mosto de cana energia (90,21%). O teor alcoólico dos vinhos não apresentou diferença estatística significativa, porém mostos de cana-de-açúcar produziram maior volume de etanol.

Palavras-Chave: Bioenergia, Cana-de-açúcar, Fermentação etanólica, Nutrientes, Biocombustível.

ENERGY CANE ETHANOL PRODUCTION BY *Pichia kudriavzevii* COMPARED WITH CONVENTIONAL METHODS

ABSTRACT - Bioethanol is one of the main alternatives to fossil fuels, standing out for the exceptional characteristics of being a renewable fuel which presents financial security, energy, and environmental sustainability. In order to meet the thriving demand for this biofuel without increasing the area under cultivation, it is necessary to enhance agroindustrial productivity, in addition to incorporating new raw materials and/or production technologies. From this angle, energy cane has potential usage due to its characteristics of higher fiber content and high agricultural productivity, which can be used for the production of 1G and 2G ethanol, additionally to electric power cogeneration. The aim of this work was to evaluate ethanol production using musts from sugar cane (CTC2) and energy cane (Vertix9), applying two yeast strains (*Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kudriavzevii*), isolated or in a consortium. The musts physical-chemical and technological characteristics were evaluated, further to the microbiological parameters (cells and bud's viability and bud rate (%), during the fermentation process development. The experimental design used was completely randomized in a subdivided plot scheme, with 3 replications. The main treatments were two sugarcane genotypes (sugar cane and energy cane), the secondary treatments consisting of 4 fermentative conditions of pH (3.5 and 4.5) and temperature (32°C and 37°C), with yeasts being inoculated pure and intercropped (50% *P. kudriavzevii* + 50% *S. cerevisiae*). The tertiary treatments consisted of the 6 evaluation times (0, 3, 6, 9, 12, and 15 hours). At the end of the fermentative process, wines produced were characterized for ARRT, alcohol and glycerol content, and fermentative efficiency. The results achieved indicate that the energy cane juice (Vertix9) demonstrates low concentrations of phosphorus, zinc, manganese, and copper, and the nutritional complement contributed to a better yeast performance. Fermentations accomplished with yeast combinations had greater biomass production and lower fermentative efficiency. *P. kudriavzevii* (LJ03) fermentation resulted in wines with lower glycerol levels, added to greater fermentative efficiency in sugarcane musts (90.48%). Fermentation with *S. cerevisiae* exhibited higher fermentative efficiency in energy cane must (90.21%). The alcohol content of wines did not show significant statistical variation, however, sugarcane musts produced greater ethanol volume.

Keywords: Bioenergy, Sugar cane, Ethanolic fermentation, Nutrients, Biofuel.

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda por energia no mundo, aliada à incerteza de oferta tem provocado preocupações e esforços em áreas estratégicas como a segurança energética, econômica e ambiental. Estes têm gerado motivações para investigações, objetivando especialmente a produção de combustíveis renováveis, tais como o bioetanol, importante aditivo e um dos principais substitutos aos combustíveis de origem fóssil como a gasolina.

O bioetanol tem papel fundamental na economia do nosso país, que é o segundo produtor mundial desta biomolécula (IPEA, 2019). No Brasil, este biocombustível é comercializado em mistura com gasolina, sendo que os teores variam de acordo com políticas governamentais. Como resultado deste planejamento, o consumo de bioetanol no país foi de 20,1 bilhões de litros em 2018, com estimativa de acréscimo da produção em 5,5% até 2025 (EPE, 2018; 2019).

A produção nacional deste biocombustível tem como matéria-prima principal a cana-de-açúcar, apresentando uma produção de 630.710,9 mil toneladas desta matéria-prima na safra 2020/2021 (Conab, 2020). Considerando-se o aumento da frota de veículos flex, além dos compromissos assumidos de exportação, as metas de produção para 2030 é da ordem de 49 bilhões de litros.

Neste cenário, somente o emprego de cana-de-açúcar, sem a ampliação da área cultivada, não será suficiente para sustentar esta produção projetada. Torna-se necessário o emprego de novas matérias-primas, compatíveis ao processo de produção e tecnologias já utilizadas. A cana energia apresenta potencial de utilização como matéria-prima, graças aos elevados teores de fibra e produtividade agrícola, teores de açúcar adequados contribuindo para o rendimento industrial, além do aumento da produção de bioenergia e a possibilidade da produção de bioetanol celulósico.

A *Saccharomyces cerevisiae* é a principal levedura utilizada no processo fermentativo, apresentando alta eficiência no desdobramento de açúcares. Este microrganismo está bem adaptado ao processo industrial e aos mostos preparados a partir de matérias-primas açucaradas. Entretanto, têm sido relatado altas taxas de produção de etanol utilizando-se microrganismos alternativos com características

desejáveis para a produção em larga escala, como as leveduras do gênero *Pichia* (Isono et al., 2012; Ribeiro et al., 2019).

Essas leveduras apresentam alta capacidade fermentativa e resistência a condições adversas como meios ácidos e altas temperaturas, características importantes durante o processo de fermentação. A *Pichia kudriavzevii* tem apresentado resultados promissores para a produção de etanol em pH 3,5 e temperaturas de 37°C (Yuan et al., 2017; Tralli, 2019).

Durante a fermentação, leveduras necessitam de teores adequados de nutrientes no mosto, que são essências para manutenção do seu metabolismo e crescimento celular, além da atividade fermentativa. Teores ideais de nitrogênio e fósforo são essenciais para a formação de novas proteínas e produção de novas células, estimulando a multiplicação celular. De modo semelhante, para a transformação dos açúcares em etanol, o fósforo, o magnésio, o manganês e o zinco atuam como componentes e co-fatores essenciais nas reações de metabolização, estimulando a produção de etanol devido à atividade enzimática da levedura. Assim, para se obter eficiência da fermentação deve-se cuidar de diversos fatores, tais como a disponibilidade de nutrientes, a levedura e a matéria-prima utilizada.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de etanol utilizando-se mostos provenientes de cana-de-açúcar (CTC2) sem adição de nutrientes e cana energia (Vertix9) suplementada com os nutrientes, empregando-se duas cepas de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia kudriavzevii*), isoladas ou em consórcio. Foram avaliadas as características físico-químicas e tecnológicas dos mostos, além dos parâmetros microbiológicos (viabilidade de células e de brotos e brotamentos (%)), durante o desenvolvimento do processo fermentativo. Comparou-se os desempenhos fermentativos e os rendimentos para produção de etanol 1G.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos, em função da metodologia utilizada, permitem concluir:

- A cana energia apresentou caldos com teores muito baixos de Fósforo, Zinco, Manganês e Cobre;
- A cana energia (Vertix9, com suplementação de nutrientes) apresentou potencial para produção de etanol 1G similar ao da cana-de-açúcar;
- Os caldos extraídos e os mostos de cana-de-açúcar e cana energia apresentaram qualidade físico-química e tecnológica adequadas ao processo fermentativo;
- A levedura *Pichia kudriavzevii* (LJ03) utilizada isoladamente ou em consórcio, apresentou maior índice de brotamentos e maior viabilidade dos brotos (%) do que a cepa de *S. cerevisiae* (PE02);
- A levedura *Pichia kudriavzevii* (LJ03) possui desempenho superior em relação à *Saccharomyces cerevisiae* (PE02) quanto à eficiência fermentativa para produção de etanol em mostos de cana-de-açúcar;
- A melhor eficiência fermentativa para *S. cerevisiae* foi em mostos preparados a partir de cana energia.
- Ambas leveduras se apresentaram adequadas para a produção de etanol, com destaque para a *P. kudriavzevii* (LJ03), que produziu menores teores de glicerol, além de ter maior resistência a temperaturas de 37°C e pH 3,5, com eficiência fermentativa de 89,51%.

6 REFERÊNCIAS

- Alcarde AR (2014) Cachaça; Ciência, tecnologia e arte. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 96 pp.
- Alexander AG (1985) The energy cane alternative. Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV, 509p.
- Amorim HV (1977) Introdução à bioquímica da fermentação alcoólica. Araras: Planalsucar.
- Amorim HV (1985) Nutrição mineral da levedura; aspectos teóricos e práticos. In: SEMANA DA FERMENTAÇÃO ALCOOLICA “JAIME ROCHA DE ALMEIDA”. **Anais...** Piracicaba: ESALQ/USP, p. 44-8.
- Amorim HV (2005) Fermentação alcoólica, ciência & tecnologia. Piracicaba: Fermentec, 448p.
- ANFAVEA, Associação Nacional de Fabricantes de Veículos Automotores (2020) **Licenciamento total de automóveis e comerciais leves por combustível.**
- ANP, Agência Nacional do Petróleo (2019) **Boletim trimestral de preços e volumes de combustíveis.**
- Appiah-Nkansah NB, Zhang K, Rooney W, Wang D (2017) Ethanol production from mixtures of sweet sorghum juice and sorghum starch using very high gravity fermentation with urea supplementation. **Industrial Crops & Products**.111:247-253.
- Barbosa JC, Maldonado Junior W (2015) Experimentação Agrônômica & AgroEstat – Sistema para Análises Estatísticas de Ensaios Agrônômicos. 2015
- BP, British Petroleum Company (2019) **BP Statistical Review of World Energy, June 2017.** London: BP plc.
- Camili EA, Cabello C (2007) Produção de etanol de manipueira tratada por processo de flotação. **Revista Raízes e Amidos Tropicais** v:1-4.
- Campos PF Alves Júnior J, Casaroli D, Fontoura PR, Evangelista AWP (2014) Variedades de cana-de-açúcar submetidas à irrigação suplementar no cerrado. **Engenharia Agrícola** 34:1139-1149.
- Carvalho-Netto OV, Bressiani JA, Soriano HL, Fiori CS, Santos JM, Barbosa GVS, Xavier MA, Landell MGA, Pereira GAG (2014) The potential of the energy cane as the main biomass crop for the cellulosic industry. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture** 1:20.
- Casagrande AA (1991) Tópicos de morfologia e fisiologia da cana-de-açúcar. Jaboticabal: FUNEP, 157p.

Castro PRC (2003) Fotossíntese na cana-de-açúcar. Piracicaba: **STAB: açúcar, álcool e subprodutos** 20: 26-27.

Ceccato-Antonini, SR, Bassi APG, Paraluppi AL, Santos EGD, Matsuoka S (2017) **Deterioration and fermentability of energy cane juice**. *Ciência Rural*, 47(9).

Chamnipa N, Thanonkeo S, Klanrit P, Thanonkeo P (2018) The potential of the newly isolated thermotolerant yeast *Pichia kudriavzevii* RZ8-1 for high-temperature ethanol production. **Brazilian Journal of Microbiology** 49:378-391.

Chan GF, Gan HM, Ling HL, Rashid NAA (2012) Genome sequence of *Pichia kudriavzevii* M12, a potential producer of bioethanol and phytase. **Eukaryot Cell** 11:1300-1301.

Chavan SM, Kumar A, Jadhav SJ (1991) Rapid quantitative analysis of starch in sugarcane juice. **Internacional Sugar Journal** 93:56-59.

Chiba MK, Mattiazzo ME, Oliveira FC (2009) Rendimento de cana-de-açúcar cultivada em Argissolo, utilizando lodo de esgoto como fonte de fósforo. **Acta Scientiarum. Agronomy** 31:495-501.

CONAB (2019) **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, Safra 2019/20, terceiro levantamento**.

CONAB (2020) **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, Safra 2021/21, primeiro levantamento**.

CONSECANA, Conselho dos Produtores de Cana-de-açúcar, Açúcar, Álcool do Estado de São Paulo (2006) **Manual de instruções**. Piracicaba: CONSECANA, 112p.

Costa GHG, Freita CM, Freita LA, Mutton MJR (2015) Effects of Different Coagulants on Sweet Sorghum Juice Clarification. **Sugar Tech** 17:210-213.

CTC, Centro de Tecnologia Canavieira (2005). **Manual de métodos de análises para açúcar**. Piracicaba, Centro de Tecnologia Canavieira, Laboratório de análises. Disponível em CD ROM.

CTC, Centro de Tecnologia Canavieira (2011) **Manual de métodos de análises para açúcar**. Disponível em CD Rom.

CTC, Centro de Tecnologia Canavieira (2018) **Bula técnica de variedades**. Disponível em: <<https://variedadesctc.com.br/wp-content/uploads/2018/09/Bula-CTC2.pdf>>. Acesso em: 11 set. 2019.

Demirbas AYHAN (2005) Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass. **Energy sources** 27:327-337.

Deparis Q, Claes A, Foulquié-Moreno MR, Thevelein JM (2017) Engineering tolerance to industrially relevant stress factors in yeast cell factories. **FEMS Yeast Research** 17.

Dhaliwal SS, Oberoi HS, Sandhu SK, Nanda D, Kumar D, Uppal SK (2011) Enhanced ethanol production from sugarcane juice by galactose adaptation of a newly isolated thermotolerant strain of *Pichia kudriavzevii*. **Bioresource technology** 102:5968-5975.

Dias AB, Sicsu A, Katz F (2019) Mandioca e cana-de-açúcar: explorações sobre uma talvez feliz complementaridade. **Revista de Economia e Sociologia Rural** 19:35-49.

Do Carmo CAFS, Araújo WS, Bernardi AC, Saldanha MFC (2000) **Métodos de análise de tecidos vegetais utilizados na embrapa solos**. Rio de Janeiro: Embrapa solos. (Embrapa solos. Circular Técnica, 06)

EPE, Empresa de Pesquisa Energética (2018) **Cenário de oferta de etanol e demanda de ciclo Otto 2018-2030**.

EPE, Empresa de Pesquisa Energética (2019) **Análise da conjuntura dos biocombustíveis ano 2018**.

Fernandes AC (2011) Cálculos na agroindústria da cana-de-açúcar. Piracicaba: STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos, 416p.

Ferreira OE (2015) **Produção de etanol a partir de sorgo sacarino com tratamento enzimático**. 79 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária). – Unesp, Jaboticabal.

Figueira JA, Carvalho PH, Sato HH (2011) Sugarcane starch: quantitative determination and characterization. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 31:806-815.

Figueiredo P (2008) Breve história da cana-de-açúcar e do papel do Instituto Agrônomo no seu estabelecimento no Brasil In: Dinardo-Miranda LL, Vasconcelos ACM, Landell GA (Eds.) **Cana-de-Açúcar**. Campinas: Instituto Agrônomo, p.31-44.

Folin O, Ciocalteu V (1927) On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, 73:627-.

Freita CM (2017) **Substituição de floculante comercial por biofloculante de Moringa oleífera Lamarck no setor sucroenergético**. 99 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária). – Unesp, Jaboticabal.

Freita LA (2013) **Avaliação tecnológica e microbiológica da fermentação etanólica de caldo de sorgo sacarino**. 70f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Unesp, Jaboticabal.

Giamalva MJ, Clarke SJ, Stein JM (1984) Sugarcane hybrids of biomass. **Biomass** 6:61-68.

Govindaswamy S, Leland MV (2007) Kinetics of growth and ethanol production on different carbon substrates using genetically engineered xylose-fermenting yeast. **Bioresource Technology** 98:677-685.

GRANBIO (2017) **O que é Cana-Energia?** Disponível em: <<http://www.granbio.com.br/conteudos/cana-energia/>>. Acesso em: 22 mar 2020

GRANBIO (2018) **Integração da pesquisa pública com cana-de-açúcar no Brasil.** Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/1355063/32772467/Jose%CC%81+Bressiani.pdf/69cb6c5f-d27e-a7ef-6285-8a40ac1c3040>>. Acesso em 22 mar 2020.

Gravois KA, Milligan SB (1992) Genetic relationship between fiber and sugarcane yield components. **Crop science** 32:62-67.

Groves JD, Falson P, le Maire M, Tanner MJ (1996) Functional cell surface expression of the anion transport domain of human red cell band 3 (AE1) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 93:12245-12250.

Hisamatsu M, Furubayashi T, Karita S, Mishima T, Isono N (2006) Isolation and identification of a novel yeast fermenting ethanol under acidic conditions. **Journal of Applied Glycoscience** 53:111-113.

Howell G (2011) Yeast nutrition and successful fermentations. **Australian and New Zealand grapegrower and winemaker** 573:101-102.

IEA, International Energy Agency's (2019) **World Energy Outlook 2004.** Disponível em: <<https://www.iea.org/reports/world-energy-outlook-2019/renewables#abstract>>

IPEA, Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (2019) **Cadernos ODS 7.**

Irene MC, Prado WJ, Teixeira V, Mendes FQM, Freita CM, Mutton MJR (2013) Influência dos nutrientes (N, P, Mg, Mn e Zn) sobre a multiplicação de levedura. **Ciência & Tecnologia: Fatec-JB (Online)** 5:x.

Isono N, Hayakawa H, Usami A, Mishima T, Hisamatsu M (2012) A comparative study of ethanol production by *Issatchenkia orientalis* strains under stress conditions. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 113:76-78.

Jackson PA (2005) Breeding for improved sugar content in sugarcane. **Field Crops Research** 92:277-290.

Johnson JM-F, Coleman MD, Gesch R, Jaradat A, Mitchell R, Reicosky D, Wilhelm WW (2007) Biomass-bioenergy crops in the United States: A changing paradigm. **The Americas Journal of Plant Science and Biotechnology** 1:1-28.

Kim M, Aita G, Day DF (2010) Compositional changes in sugarcane bagasse on low temperature, long-term diluted ammonia treatment. **Applied biochemistry and biotechnology** 161:1-8.

Kim M, Day DF (2011) Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills. **Journal of industrial microbiology & biotechnology** 38:803-807.

Klein BC (2013) Cultivo de microalgas para produção de bioetanol de terceira geração. 116 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Unicamp, Campinas.

Kohlhepp G (2010) Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos avançados** 24:223-253.

Kurtzman C, Fell JW, Boekhout T (Ed.) (2011) The yeasts: a taxonomic study. Elsevier Science, 1076p.

Lacerda ARS, Souza AR, Santos TM, Clemente JM, Duarte AR, Machado MG (2019) Produtividade da cana-de-açúcar em resposta a adubação NPK em diferentes épocas. **Humanidades e Tecnologia (FINOM)** 1:45-51.

Lane JH, Eynon L (1934) Determination of reducing sugars by Fehling solution with methylene blue indicator. London: Norman Rodger, 8p.

Lee SS, Robinson FM, Wong HY (1981) Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology Bioengineering Symposium**, 11:641-649.

Li J, Li S, Han B, Yu M, Li G, Jiang Y (2013) A novel cost-effective technology to convert sucrose and homocelluloses in sweet sorghum stalks into ethanol. **Biotechnol Biofuels** 6:174.

Lima UA, Basso LC, Amorim HV (2001) Produção de etanol. In: **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Ed. Edgard Blücher Ltda.

Lin Y, Zhang W, Li C, Sakakibara K, Tanaka S, Kong H (2012) Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. **Biomass and bioenergy** 47:395-401.

Macedo N, Macedo D (2004) As pragas de maior incidência nos canaviais e seus controles. **Revista Visão Agrícola** 1:38-46.

Malacrino P, Tosi E, Caramia G, Prisco R, Zapparoli G (2005) The vinification of partially dried grapes: a comparative fermentation study of *Saccharomyces cerevisiae* strains under high sugar stress. **Letters in Applied Microbiology** 40:466-472.

Marenco RA, Lopes NF (2009) Fisiologia vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral. Viçosa: Editora UFV, 486p.

Mariano J et al. (2016) **Cana-energia, a revolução sucroenergética está começando. Nova Cana.** Disponível em: <<https://www.novacana.com/n/cana/variedades/especial-cana-energia-revolucao-sucroenergetica-201015>>

Masson IS, Costa GHG, Roviero JP, Freita LA, Mutton MA, Mutton MJR (2015) Bioethanol production from sweet sorghum broth and sugar cane fermentation. **Ciência Rural**, 45:1695-1700.

Matsuoka S, Bressiani J, Maccheroni W, Fouto I (2012) Bioenergia da cana. In: Santos F, Borém A, Caldas C (Eds.) **Cana-de-açúcar: bioenergia, açúcar e etanol: tecnologias e perspectivas**. Viçosa: Embrapa Cerrados (CPAC), p.548-576.

Matsuoka S, Kennedy AJ, Santos EGD, Tomazela AL, Rubio LCS (2014) Energy cane: its concept, development, characteristics, and prospects. **Advances in Botany** 2014:1-13.

Matsushika A, Inoue H, Kodaki T, Sawayama S (2009). Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology** 84:37-53.

Melo W, Lopes AS, Botelho VA, Chagas Junior G (2014) Cinética de crescimento de microrganismos fermentativos durante a fermentação de tucupi. **Blucher Food Science Proceedings** 1:569-570.

Merico A, Sulo P, Piskur J, Compagno C (2007) Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. **The FEBS journal** 274:976-989.

Montijo NA, Silva AF, Costa GHG, Ferreira OE, Mutton MJR (2014). **Yeast CA-11 fermentation in musts treated with brown and green propolis**. Afr. J. Microbiol. Res. 39: 3515–3522.

Santos TN (2012) **Avaliação da biomassa de sorgo sacarino e palma forrageira para produção de etanol em Pernambuco**. 95 f. Dissertação. Universidade Federal de Pernambuco.

Mussatto SI, Dragone G, Guimarães PMR, Silva JPA, Carneiro LM, Roberto IC, Vicente A, Domingues L, Teixeira JÁ (2010) Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology advances** 28:817-830.

Nelson DL, Cox MM (2018) **Princípios de Bioquímica de Lehninger-7**. Porto Alegre:Artmed 1272p.

Nofemele Z, Shukla P, Trussler A, Permaul K, Singh S (2012) Improvement of ethanol production from sugarcane molasses through enhanced nutrient supplementation using *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Brewing and Distilling** 3:29-35.

Nogueira FS, Ferreira KS, Carneiro Júnior JB, Passoni LC (2009) Minerais em melados e em caldos de cana. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 29:727-731.

Oladi S, Aita GM (2017) Optimization of liquid ammonia pretreatment variables for maximum enzymatic hydrolysis yield of energy cane bagasse. **Industrial Crops and Products** 103:122-132.

Oliveira ECA, Freire FJ, Oliveira RI, Oliveira AC, Freire MBGS (2011) Acúmulo e alocação de nutrientes em cana-de-açúcar. **Revista Ciência Agronômica** 42:579-588.

Oliveira RB (2010) **Modelagem da produtividade da cana-de-açúcar para as principais regiões produtoras de Minas Gerais**. 110 f. Dissertação (Mestrado em Meteorologia Agrícola) - UFV, Viçosa.

Pavani CD, Roviero JP, Freita LA, Costa GHG, Mutton MJR (2016) Effect of N, P, Mg, Mn and Zn concentration on fermentation physiology of yeast. **Ciência e Tecnologia: Fatec-JB (Online)** 8:x.

Puligundla P, Obalum VSR, Poludasu RM, SANGHOON K (2012) Process optimization for ethanol production from very high gravity (VHG) finger millet medium using response surface methodology. **Iranian Journal of Biotechnology** 10:168-174.

Rao PS, Davis H, Simpson C (2007) New sugarcane varieties and year-round sugar and ethanol production with bagasse-based cogeneration in Barbados and Guyana. **Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists** 26:1169-1176.

Ribeiro NN, Freita LA, Tralli LF, Silva AF, Freita CM, Mendes FQ, Teixeira V, Silva Junior CN, Mutton MJR (2019) Optimization of fermentative conditions of *Pichia membranifaciens* for second generation ethanol production. **Química Nova** 42:1-9.

Ripoli TCC, Ripoli MLC (2009) Biomassa de cana-de-açúcar: colheita, energia e ambiente. Piracicaba: Edição dos Autores, 333 p.

Roach BT, Daniels JA (1987) Review of the origin and improvement of sugarcane. In: COPERSUCAR INTERNATIONAL SUGARCANE BREEDING WORKSHOP, **Anais...** Piracicaba: Copersucar, p.1-37.

Rodionova MV, Poudyal RS, Tiwari I, Voloshin RA, Zharmukhamedov SK, Nam HG, Zayadan BK, Bruce BD, Hou HJM, Allakhverdiev S (2017) Biofuel production: challenges and opportunities. **International Journal of Hydrogen Energy** 42:8450-8461.

Rodrigues JAR (2011) Do engenho à biorrefinaria: a usina de açúcar como empreendimento industrial para a geração de produtos bioquímicos e biocombustíveis. **Química Nova** 34:1242-1254.

Rodrigues JD (1995) Fisiologia da cana-de-açúcar. Botucatu: UNESP, 75p.

Sanchez OJ, Cardona CA (2008) Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource technology** 99:5270-5295.

Santos R (2013) **Estudo cinético de fermentação etanólica do hidrolisado de farinha de mandioca utilizando complementação nutricional do mosto**. 102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - UFAL, Maceió.

Scarpari MS, Beauclair EGF (2008) Anatomia e botânica. In: Dinardo-Miranda LL, Vasconcelos ACM, Landell GA (Eds.) **Cana-de-Açúcar**. Campinas: Instituto Agrônomo, p.45-56.

Schaffert RE, Parrella RAC (2012) Planejamento industrial. In: May A, Durães FOM, Pereira Filho IA, Schaffert RE, Parrella RAC (Eds.) **Sistema Embrapa de Produção Agroindustrial de Sorgo sacarino para Bioetanol Sistema BRS1G – Tecnologia Qualidade Embrapa**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, p. 85-92. (Embrapa Milho e Sorgo. Documentos, 139)

Schneider F (Ed.) (1979) Sugar Analysis ICUMSA methods. Peterborough. P. 215.

Silva AF, Ferreira OE, Costa GHG, Montijo NA, Mutton MA, Mutton MJR (2016) Technological quality of sweet sorghum processed without panicles for ethanol production. **Australian Journal of Crop Science** 11:1578-1582.

Silva DCMN, Barbon FF, Bronzatto RB (2017) Comparação da eficiência fermentativa na produção de etanol por linhagem nativa e comercial de *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Científica de Ciências Aplicadas da FAIP** 4:12-30.

Sousa JLU, Monteiro RAB (2011) Fatores interferentes na fermentação alcoólica para a produção de etanol. **FAZU em Revista** 2:1-8.

Tanimoto T (1964) The press method of cana analysis. **Hawaiians Planter's Record** 57:133-150.

Teixeira V, Silva AF, de Freitas CM, de Freitas LA, Mendes FQ, Tralli LF, Mutton MJR (2019) **Using Moringa oleifera Lamarck seed extract for controlling microbial contamination when producing organic cachaça**. International journal of food microbiology, 308:108287.

Thammasittirong SNR, Chatwachirawong P, Chamduang T, Thammasittirong A (2017) Evaluation of ethanol production from sugar and lignocellulosic part of energy cane. **Industrial Crops and Products** 108:598-603.

Tralli LF (2019) **Fermentação de mosto obtido da hidrólise de sorgo sacarino para produção de etanol por *Pichia kudriavzevii***. 89 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Unesp, Jaboticabal.

Udeh HO, Kigatla TE (2013) Role of magnesium ions on yeast performance during very high gravity fermentation. **Journal of Brewing and Distilling** 4:19-45.

Vasconcelos ACM, Casagrande AA (2008) Fisiologia do sistema radicular. In: Dinardo-Miranda LL, Vasconcelos ACM, Landell GA (Eds.) **Cana-de-Açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, p.57-78.

Vaughan-Martini A, Martini A (2011) *Saccharomyces* Meyen ex Reess (1970) In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (Eds.) **The yeasts**. Elsevier, p.733-746.

Vieira GHS, Mantovani EC, Sediya GC, Costa EL, Delazari FT (2012) Produtividade de colmos e rendimento de açúcares da cana-de-açúcar em função de lâminas de água. **Irriga** 17:234-244.

Vitti GC, Luz PHC, Altran WS (2016) Nutrição e adubação. In: Santos F, Borém A (Eds.) **Cana-de-açúcar: do plantio à colheita**. Viçosa: Editora UFV, p.290.

Walker GM (1998) Yeast Physiology and Biotechnology. England: John Wiley and Sons Ltd. 350p.

Yokoya F (1995) **Fabricação da aguardente da cana**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia Andre Tosello, 87p. (Série Fermentações Industriais, 2).

Yuan SF, Guo GL, Hwang WS (2017) Ethanol production from dilute-acid steam exploded lignocellulosic feedstocks using an isolated multistress-tolerant *Pichia kudriavzevii* strain **Microbial Biotechnology** 10:1581-1590.

Yuangsaard N, Yongmanitchai W, Yamada M, Limtong S (2013) Selection and characterization of a newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* strain for ethanol production at high temperature from cassava starch hydrolysate. **Antonie Van Leeuwenhoek** 103:577-588.

Zera FS (2010) **Tolerância de *Saccharum* spp., *Ricinus communis* e *Luffa aegyptiaca* a herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar**. 54 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agronômico, Campinas.