

**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

S586p Silva Junior, Calisto Nonato
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

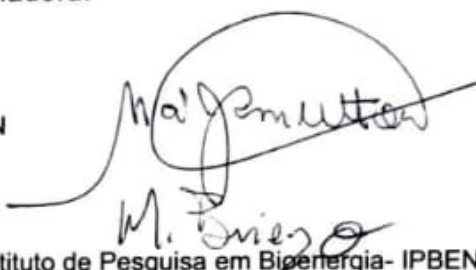
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: PRODUÇÃO DE ETANOL DE CANA ENERGIA POR *Pichia kudriavzevii* COMPARADO COM MÉTODOS CONVENCIONAIS

AUTOR: CALISTO NONATO SILVA JUNIOR

ORIENTADORA: MÁRCIA JUSTINO ROSSINI MUTTON

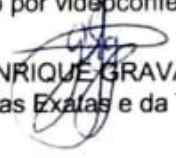
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

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 (Vertix9), 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 (Vertix9) 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.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biocombustíveis

O uso de energia e sua crescente demanda tem sido tópicos bastante abordados desde a crise energética de 1970. Com a crise do petróleo a humanidade conscientizou-se da dependência do uso de combustíveis fósseis, que são derivados de recursos não renováveis, como derivados do petróleo e o carvão mineral. Desde então estabelece-se a preocupação com a oferta de energia ao passo que as reservas fósseis se esgotam e a demanda aumenta proporcionalmente à explosão demográfica e o aumento de veículos leves, que utilizam tanto gasolina como biocombustível como carburante (Mussatto et al., 2010).

Alternativamente ao uso de combustíveis de origem fóssil, os biocombustíveis vêm sendo implantados na matriz energética do mundo tudo aos poucos, impulsionado pela pressão das nações sob questões ambientais como emissão de gases poluentes e finitude das reservas petrolíferas. Assim, o Bioetanol começou a ser adicionado à gasolina em diferentes teores de acordo com políticas públicas de incentivo de uso e produção deste biocombustível. Atualmente no Brasil, gasolina é comercializada em uma mistura que contem 27% de etanol (ANP, 2019).

De forma geral, biocombustíveis incluem qualquer substância rica em energia e geralmente são químicos gerados através de processos biológicos ou derivados da conversão de biomassa originada de organismos como bactérias fotossintéticas, microalgas ou plantas terrestres (Rodionova et al., 2017).

A Figura 01 mostra um levantamento feito pelo IEA em 2019 sobre o consumo de biocombustível em 2018 e estima a demanda para os próximos 10 anos em um cenário de desenvolvimento sustentável, onde o consumo de combustíveis renováveis deve dobrar até 2030 e destaca que a produção atual têm um crescimento lento, e sem perspectiva de alcançar a demanda futura (IEA, 2019).

Segundo Rodionova et al. (2017), biocombustíveis podem ser classificados em primários e secundários; sendo os primários caracterizados pela da geração de energia através da queima direta de biomassa como material lignocelulósico e rejeitos animais desidratados, e os biocombustíveis secundários englobando os químicos que

armazenam energia para combustão, produzidos de material animal e vegetal, sendo subdivididos em três gerações. A primeira geração de biocombustíveis (1G) caracteriza-se pelo etanol proveniente de açúcares de origem agrícola como o amido e a sacarose e de biodiesel produzido a partir de gorduras de rejeitos animais, óleo de cozinha e de plantas como a soja e girassol (Rodrigues, 2011).

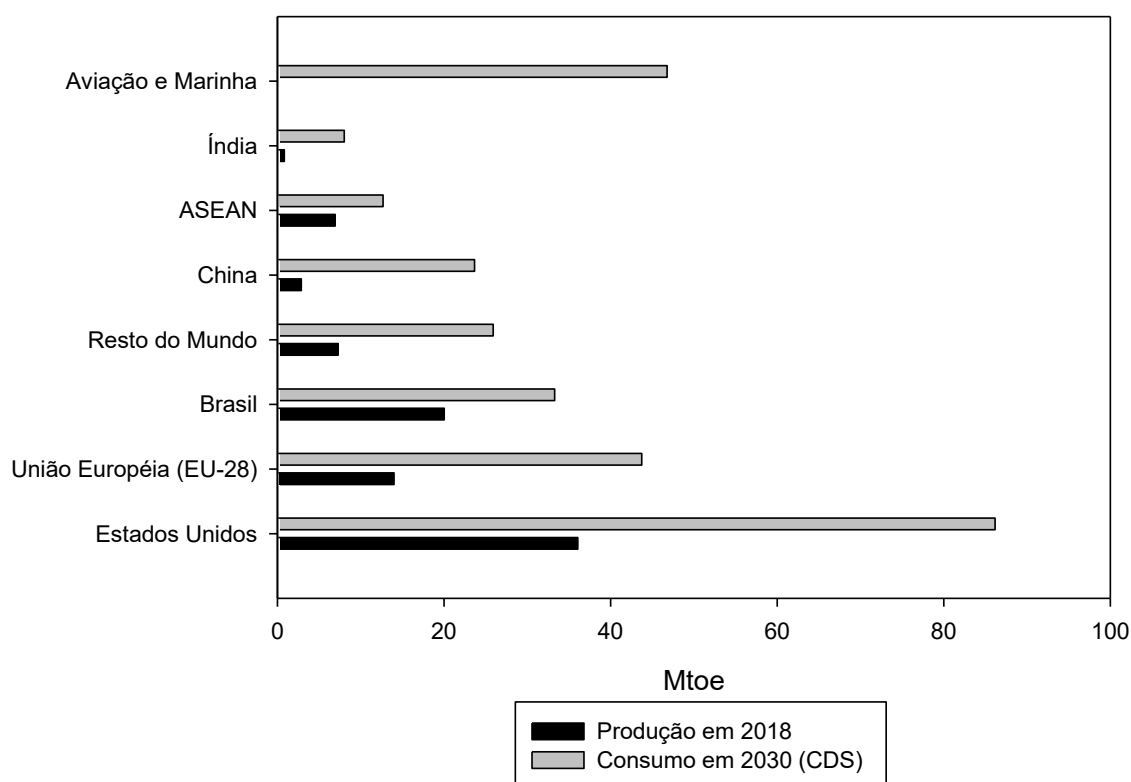


Figura 01. Produção de biocombustível em 2018 comparada com o consumo em 2030 em um cenário de desenvolvimento sustentável. (Adaptado). CDS = Cenário de Desenvolvimento Sustentável. ASEAN = Associação das Nações do Sudeste Asiático. Mtoe = Megatonelada equivalente de petróleo. 1Mtoe = $1,162\ 791 \times 10^6$ m³ Gasolina. (IEA, 2019).

A segunda geração de biocombustíveis (2G) é composta de produtos obtidos a partir do processamento de biomassa lignocelulósica de insumos agrícolas que não são destinados à alimentação, tais como bagaço de cana e palhas de outras culturas que ficam no campo depois do processo de colheita, como etanol e biodiesel derivados de vegetais como mandioca, pinhão manso, grama, palha e madeira (Rodionova, et al., 2017). A terceira geração de biocombustíveis (3G) é aquela

produzida a partir de microalgas, cianobactérias e outros microrganismos, que podem produzir e acumular sob condições específicas de estresse, gorduras e amido que depois de purificados são direcionados para produção de biocombustível líquido.

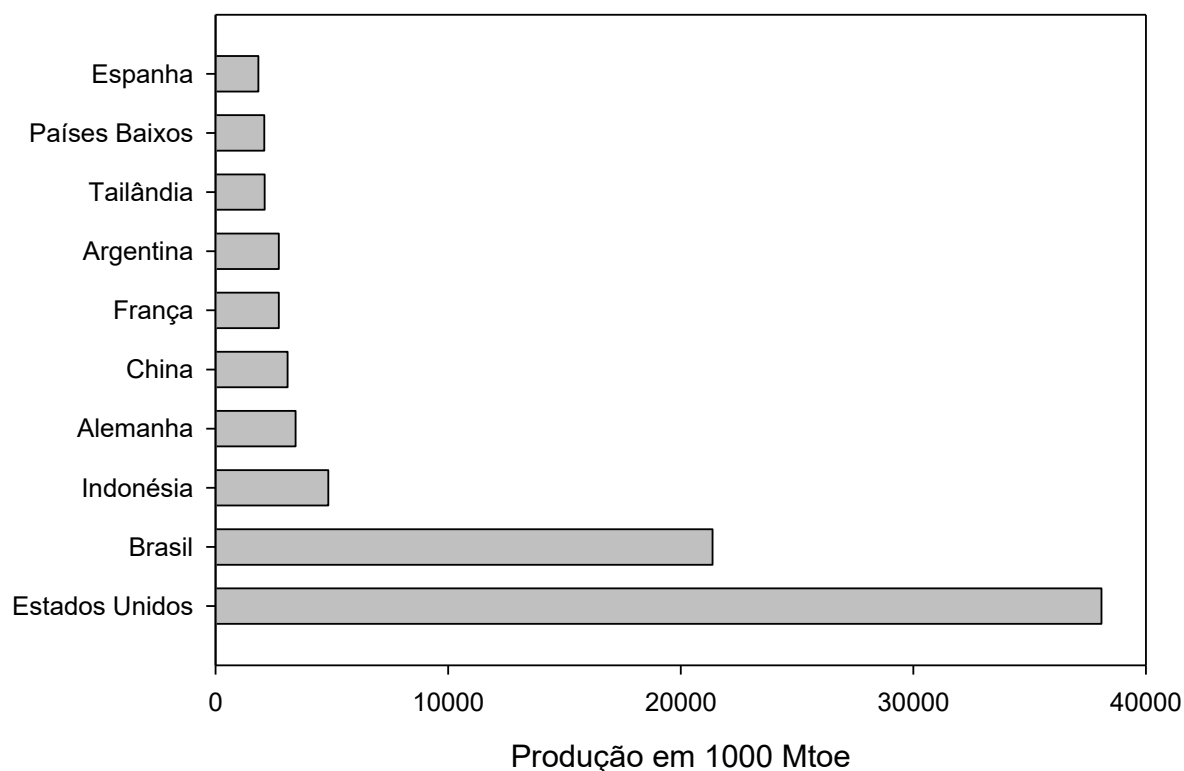
Embora a terceira geração de biocombustíveis seja a alternativa mais promissora para geração de biocombustíveis à atender a futura demanda mundial por combustíveis, ainda não possui tecnologia competitiva de produção. Assim, a maior parte dos estudos estão centrados na viabilização da produção de etanol celulósico (2G), que ainda necessita de ajustes tecnológicos para ser competitivo à produção de etanol de primeira geração (KLEIN, 2013).

No Brasil, devido ao domínio do cultivo da cana-de açúcar, condições edafoclimáticas favoráveis, tradição na produção de açúcar e consequente expansão nas lavouras de cana, somados a consolidada industrialização do setor e domínio de tecnologia, a cana-de-açúcar aparece como protagonista da produção de etanol no país, sendo a produção de biocombustível datada de 1922, quando as sobras de matéria prima para a indústria açucareira somadas à crises sucessivas do petróleo, conduziram a produção desse biocombustível no país por séculos (Kohlhepp, 2010).

A produção foi realçada posteriormente por sucessivos incentivos governamentais no setor de produção sucroenergético, garantindo ao Brasil a segunda maior produção mundial de etanol em 2018 e nas últimas décadas, como mostra a Figura 02 (21.375 mil toneladas), atrás apenas dos Estados Unidos, que produziu quase o dobro de etanol que o Brasil, utilizando majoritariamente milho como matéria-prima (Dias et al., 2019; IEA, 2019).

Neste sentido, as principais matérias-primas utilizadas são obtidas de plantas que possuem reservas açucaradas, amiláceas, feculentas ou celulósicas. A principal fonte de açúcares para produção de etanol no Brasil é a cana-de-açúcar, cultura favorita devido à sua alta produtividade e por se encaixar em todos os pré-requisitos indispensáveis para o seu uso industrial, além da tradição de cultivo em terras brasileiras. Alternativamente, plantas feculentas como a mandioca também são utilizadas devido às suas ricas reservas de amido. Outras plantas como o milho e o sorgo também são utilizadas como fontes de amido e sacarose, respectivamente (Sánchez e Cardona, 2008).

Países líderes na produção de biocombustível em 2018



Mtoe = Megatonelada equivalente de petróleo. $1\text{Mtoe} = 1,162\ 791 \times 10^6 \text{ m}^3$ Gasolina.

Figura 02. Maiores produtores mundiais de biocombustíveis em 2018 (BP, 2019).

Um dos fatores decisivos na produção de biocombustível como o etanol é a escolha da matéria-prima. É necessário que a fonte energética tenha um teor de carboidrato alto, tenha um preço de produção e de transformação baixos, grande quantidade existente, facilidade na aquisição e transporte, além de um balanço energético positivo (Mussatto et al., 2010). Atualmente, pesquisas procuram solucionar os gargalos tecnológicos necessários para o tratamento eficiente de materiais lignocelulósicos como o bagaço de cana-de-açúcar e outros resíduos agroindustriais como fonte de carbono direcionado à produção de etanol.

2.2 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum App*) é uma planta tropical perene cultivada para a produção de açúcar e etanol devido ao alto teor de sacarose armazenada em seus

colmos. É colhida e processada entre abril e novembro na região centro-sul do Brasil (maior região produtora do país) e de outubro a dezembro nos Estados Unidos, maiores produtores mundiais de biocombustível (Oliveira, 2010). Nos Estados Unidos, cana-de-açúcar é cultivada com processamento direcionado à produção de açúcar, enquanto no Brasil a produção está bem dividida entre açúcar e etanol (Kim e Day, 2011).

Os indícios históricos de cultivo de cana-de-açúcar surgiram no sudeste da Ásia, embora segundo Figueiredo (2008), é incerta a sua origem específica, tendo regiões como Índia e Nova Guiné como locais mais citados (Roach e Daniels, 1987). Espécies como *Saccharum officinarum* e *Saccharum robustum* têm origem na Nova Guiné, *Saccharum barberi* na porção norte da Índia e na China se desenvolveu a espécie *Saccharum sinense*, sendo as espécies mais cultivadas atualmente mundo afora cultivares derivados dessas espécies (Scarpari e Beauclair, 2008).

Pertencendo à família das poáceas e ao gênero *saccharum*, a cana-de-açúcar é uma planta perene com intenso perfilhamento desde a fase inicial de seu desenvolvimento (Castro, 2003). Classificada de acordo com seu metabolismo fotossintético como uma planta C4, é considerada altamente eficiente na conversão de energia radiante em energia química (Marengo e Lopes, 2009). Tais características fotossintéticas garantem a plantas como a cana-de-açúcar boa adaptabilidade à elevadas intensidades luminosas, temperatura e condições de baixa disponibilidade de água (Lacerda et al., 2019).

Estruturalmente a planta pode ser dividida em uma parte radicular, composta por raízes e rizomas e uma parte aérea, composta por colmos, folhas e inflorescência. O sistema radicular é do tipo fasciculado, com função de sustentação da planta, fixação no solo e absorção de nutrientes e água (Vasconcelos e Casagrande, 2008).

Os colmos apresentam formato cilíndrico, compostos por nós e entrenós e compreendem a parte da planta sob o solo, que proporciona sustentação para folhas e inflorescência (panícula com flor hermafrodita, com característica plumosa) (Casagrande, 1991). A cultura possui um fotoperíodo ideal de 10-14 horas suportando temperaturas altas de até 35°C, com um regime pluviométrico entre 1000 e 1600 mm anuais, com uma preferência por chuvas abundantes no seu período de

desenvolvimento e a preferência por um período seco durante sua maturação, favorecendo o acúmulo de sacarose nos colmos (Zera, 2010).

A cana-de-açúcar apresenta dois ciclos distintos, de acordo com a época de plantio. Cana de doze meses, conhecida como cana de ano, é plantada em meados de setembro-outubro, atinge seu ápice de desenvolvimento em abril com colheita os meses de setembro-outubro do ano seguinte. Na cana de dezoito meses, conhecida como cana de ano e meio, o plantio é realizado de janeiro a abril, com seu ápice de crescimento durante o verão e a colheita a partir de junho do ano seguinte ao do plantio (Rodrigues, 1995). As condições climáticas da região sudeste do Brasil conferem-lhe a maior produção da cultura no país, responsável por produzir, 64,21% da produção estimada de 642,7 milhões de toneladas para a safra brasileira de 2019/20 (CONAB, 2019).

Considerando-se valor bruto e área plantada produzidos, atualmente a cultura está em terceiro lugar no mercado agrônomico do país, ficando atrás apenas da produção de grãos como milho e soja (Vitti et al., 2016; Lacerda et. al., 2019). Destaca-se que o Brasil é atualmente o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com uma produção em expansão, estimando aumento de 3,6% em relação à safra anterior (CONAB, 2019).

Com o advento dos biocombustíveis e a preocupação com o fim das reservas petrolíferas, a instabilidade do preço do petróleo e a incerteza de oferta de energia fóssil, além de preocupações ambientais de caráter climático ligadas à preocupação com emissões de gases poluentes na atmosfera, somadas ao incentivo governamental voltado para o setor sucroenergético, o mercado da de cana-de-açúcar têm papel importante na economia do país tanto para produção de açúcar quanto de etanol, biocombustível que hoje no Brasil é comercializado em misturas com a gasolina e como etanol hidratado para automóveis com capacidade flex (ANP, 2019).

Das mais de 630 milhões de toneladas de cana-de-açúcar que devem ser produzidas na safra 2020/21, 42,4% do ATR (Açúcar Total Recuperável) gerado será destinado a produção de açúcar nesta safra, devido ao cenário econômico mundial do etanol e do açúcar, retornando à distribuição de ATR para os dois produtos a um patamar mais equilibrado, com um direcionamento maior de ATR para a fabricação de açúcar que nas últimas safras, com expectativa de gerar 31,9 bilhões de litros de

biocombustível, com produção de 9,9 bilhões de litros de etanol anidro e 22 bilhões do etanol hidratado (CONAB, 2020).

Durante o processamento da cana-de-açúcar, quantidade significativa de bagaço de cana é gerado do processo de produção de açúcar e etanol de primeira geração, podendo produzir uma quantidade de bagaço de até 300 kg deste bioproduto a partir de uma tonelada de cana-de-açúcar (com 50% de umidade). Atualmente esse bagaço é queimado para produzir vapor e eletricidade como parte de um sistema de cogeração de energia elétrica para as usinas de açúcar. O bagaço residual é armazenado como um produto de baixo valor econômico, realidade que está sendo comutada devido ao inclino do setor para a produção de etanol celulósico e bioeletricidade (Kim et. al., 2010).

2.3 Melhoramento genético da cana-de-açúcar

Plantas cultivadas pelo homem por longos períodos em extensas áreas agrícolas acabam afetadas negativamente por fatores ambientais como pragas e insetos, causando principalmente problemas de sanidade à cultura e como consequência, depreciando o rendimento da lavoura. Diante disto, antigos pesquisadores holandeses perceberam que era possível criar artificialmente genótipos de cana-de-açúcar mais resistentes aos problemas que arruinavam as lavouras de cana daquela época (Matsuoka et al., 2012).

Durante o processo de desenvolvimento da planta, a cana produz a sua própria estrutura composta basicamente de celulose, hemicelulose e lignina por vias específicas, tendo a glicose como ponto de partida e também gera sua reserva energética, um açúcar chamado sacarose, que fica armazenado nos colmos da planta.

Um híbrido atual de cana-de-açúcar possui proporcionalmente em seus colmos cerca de 10 a 14% de fibra e de 12 a 17% de sacarose em média, sendo água o restante do seu conteúdo, enquanto híbridos de cana energia apresentam maior teor de fibras do que sacarose. Dependendo da variedade, pode apresentar teores de açúcar de 13% e até 25% de fibras (Kim e Day, 2011). Assim, com a experiência de cruzar plantas suculentas e relativamente delicadas com genótipos mais rústicos

como a *Saccharum spontaneum* (planta que apresenta altos teores de fibra e menor conteúdo açucarado), conseguiu-se criar genótipos de cana mais resistentes.

Tais experimentos iniciaram-se na última década do século 19, porém apenas no início da segunda década do século 20 surgiram os primeiros resultados com valor comercial do melhoramento genético dessas plantas que se têm registro (Matsuoka et al., 2012). Dessa forma, seguindo a primeira experiência bem-sucedida, vários outros centros produtores de cana, incluindo no Brasil, criaram seus próprios programas de melhoramento genético da cultura, com estudos no melhoramento da cana-de-açúcar nos anos seguintes.

Segundo Jackson (2005), o melhoramento da produtividade de açúcar na cana conformou aos híbridos atuais uma atuação contrária ao alto conteúdo de sacarose e à alta produtividade de colmos de cana, pois a produtividade final de sacarose acontece mais pelo ganho de biomassa do que pelo teor de sacarose. Assim, o rendimento de sacarose pode ser melhorado proporcionalmente com uma maior geração de biomassa. Desses experimentos surgiu a ideia de uma cana com maior teor de fibra e menos açúcar.

Apesar de inúmeros esforços direcionados à melhoria do teor de sacarose na cana-de-açúcar, as pesquisas estão voltadas para um novo caminho, indicando que quando a via contrária é tomada, por exemplo, aumentando-se dos teores de fibra ao invés de sacarose, os benefícios alcançados são maiores, devido ao aumento em produtividade de biomassa das lavouras de cana empregando-se menos em recursos na sua produção e manejo agrícola (Matsuoka et al., 2012).

Gravois e Milligan (1992), demonstraram alta herdabilidade para fibra e consequentemente, alto potencial da seleção genética para esta característica. Relataram 79% da variação genética para fibra como aditiva, considerando que a avaliação em um único local em qualquer ciclo da cultura seria efetivo para a seleção deste caráter, o que permitiu velocidade e economia de recursos nos estudos e na produção de híbridos de cana energia.

Neste cenário, o melhoramento genético da cana-de-açúcar passa por um momento de transição desde o início século, o qual por cem anos buscou-se maior produtividade de açúcar, e agora, novos modelos de cana sugerem um direcionamento diferente, desta vez para a alta produtividade de fibra (Carvalho-Neto

et al., 2014). A vantagem de se produzir mais fibra em detrimento do açúcar é que as plantas serão mais rústicas, o que traz várias vantagens econômicas e ambientais como menor exigência de solos de qualidade, clima, água e nutrientes, produzindo plantas mais resistentes a pragas e doenças, resultando em maior eficiência energética durante o cultivo, produzindo maior unidade de energia por energia empregada, considerando-se toda a cadeia energética (Matsuoka et al., 2012).

Neste sentido, cultivares de cana energia poderão ser plantadas em áreas com condições de solo e clima piores do que aqueles reservados para a produção de alimentos e necessitará menor aplicação de fertilizantes e de defensivos agrícolas; químicos que são grandes agressores tanto do meio ambiente quanto da saúde humana. A cultura é mais resistente à seca e ao pisoteio, além de apresentar uma maior razão de multiplicação que a cana-de-açúcar (Kim e Day, 2011; Carvalho-Neto et al., 2014).

2.4 Cana energia

Esse genótipo de cana foi desenvolvido a partir do cruzamento de canas ancestrais e híbridos atualmente produzidos de cana-de-açúcar resultando em uma planta mais resistente a condições de estresse hídrico, com maior teor de fibra e potencial produtivo, criada especificamente para a produção de etanol e para geração e/ou cogeração de energia elétrica. A variedade é versátil, pode ser empregada desde a queima elementar para geração de vapor e eletricidade, até para produção de diferentes gerações de biocombustíveis líquidos (1G ou 2G), gás, carvão e ainda outros produtos químicos de valor agregado (Granbio, 2017).

Os genótipos foram desenvolvidos com base nas propostas de biorrefinarias do futuro, existindo atualmente poucos estudos avaliando o potencial fermentativo do caldo de diferentes tipos de cana energia produzidos pelos centros de melhoramento genético existentes em países em que o processamento de cana-de-açúcar tem papel fundamental na economia local, como o Brasil (Matsuoka et al., 2014).

Publicações da GranBio, mostram que a longevidade da lavoura é bem maior, sendo necessária uma renovação a cada dez anos (vantagem quando comparada à renovação necessária a cada 5 anos para a cana-de-açúcar atualmente utilizada) e

podendo chegar a 15 cortes em alguns casos, em contraste com um máximo de 12 cortes da cana-de-açúcar (Granbio, 2018; Kim et. al., 2010). Por produzir maior número de colmos com uma alta taxa de perfilhamento, a cana energia permite uma razão de multiplicação maior (1:30 ou até mais, contra 1:10 dos cultivares comuns de cana-de-açúcar), o que se torna outra grande vantagem econômica quando se avalia os parâmetros essenciais na determinação de uma opção energética, considerando fatores como sustentabilidade e responsabilidade ambiental (Johnson et al., 2007; Carvalho-Neto et al., 2014).

Não menos importante, essas plantas são essenciais para a contenção da erosão dos solos, bem como auxiliam na recuperação de áreas degradadas, em consequência da conhecida capacidade de gramíneas na contenção da degradação ambiental do solo, em razão do seu vigoroso sistema radicular fasciculado e devido ao vigor das socas, permitindo maior número de cortes (Johnson et al., 2007)

Alexander (1985) constatou que a cana energia colhida em ciclos anuais aumenta a sua produtividade ou se mantém estável nas socas subsequentes, e Matsuoka et al. (2014) relataram um mínimo de 10 cortes para canaviais de cana energia, graças ao vigoroso rizoma herdado da *Saccharum spontaneum*, a principal característica que os primeiros melhoristas de cana-de-açúcar objetivaram neste genótipo, como fator complementar à vulnerabilidade da espécie *Saccharum officinarum* para esta característica (Matsuoka et al., 2014).

Assim, o trabalho começado pelos cientistas que cruzaram plantas suculentas com plantas fibrosas para aproveitarem destas os genes que conferem rusticidade, agora é continuado, onde plantas fibrosas são empregadas em um novo processo de ingressão, desta vez direcionando a seleção para plantas mais rústicas, menos suculentas ou até mesmo sem nenhum caldo, com uma alta produtividade de fibra (Matsuoka et al., 2012). Em Barbados por exemplo, um programa de melhoramento para cana energia também é conduzido desde os anos 80, obtendo híbridos que em termos de produtividade de massa seca (MS) apresentaram ganhos de 72% comparados com uma variedade convencional comercializada (Rao et al., 2007).

As seleções de cana energia combinaram os níveis de açúcar e fibra exigidos pela indústria para obter um bom rendimento industrial de sacarose sem comprometer o desempenho das plantas no campo e dependendo da variedade, possui teor de

açúcar de 13% e 18% de fibras (Vertex 3 - GranBio) ou apresentando teor de açúcar de 9% e de até 25% de fibra (Vertex 9) (Matsuoka et al., 2010; Carvalho-Netto et al., 2014).

A variedade tem um ciclo de colheita um pouco mais longo do que a cana-de-açúcar e possui aproximadamente o dobro de teor de fibras. Entretanto, as variedades de cana energia não são matéria-prima de qualidade para a indústria do açúcar, pois seu caldo apresenta baixa pureza (cerca de 70% contra 89% da cana-de-açúcar). A cultura deve ser empregada para a produção de etanol, porém ainda há discussões para melhoria na tecnologia industrial direcionada para a extração do caldo de colmos de cana energia, em razão do alto teor de fibra que essas plantas apresentam (Carvalho-Netto et al., 2014).

A média de produtividade de cana energia pode aumentar com as socas devido ao seu rizoma bem desenvolvido e alto perfilhamento. Estudos da GranBio mostram que a opção energética pode render 180 t/ha, produtividade similar ao esperado pela empresa em sua estação experimental no Alagoas e valor que excede à produção média de cana de açúcar no Brasil de 80 t/ha; bem como a produção brasileira na safra de 2018/19, que foi de 72,234 t/ha e a produção de 76,13 t/ha na safra nacional de 2019/20 (Mariano et. al., 2016; Granbio, 2018; Conab, 2019).

2.5 Etanol

O etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) ou álcool etílico, comumente conhecido como álcool, é uma substância obtida por via química a partir hidratação do etileno ou redução de acetaldeído, ou por via bioquímica através da fermentação de açúcares presentes em culturas como de cana de açúcar, milho, beterraba entre outros. Na indústria sucroalcooleira brasileira, a cana-de-açúcar é a matéria-prima mais utilizada tanto para a produção de etanol quanto para a fabricação de açúcar (ANP, 2019).

O uso de etanol pela humanidade é marcado na história, seja para a fabricação de bebidas ou como combustível, a substância é utilizada pela humanidade por centenas de anos. Os primeiros carros fabricados já poderiam usar etanol como combustível, porém naquela época era mais rentável a produção de combustíveis derivados do petróleo, devido a tecnologia eficiente disponível. O Brasil tinha um

programa pioneiro para produzir álcool para automóveis desde 1927, porém apenas na década de 70 o mercado de etanol combustível foi revigorado no país, devido a questões econômicas motivadas pela crise global do petróleo, com a criação do Programa Nacional de Álcool (ProAlcool), que discorre sobre o uso de cana-de-açúcar como matéria-prima, e a direcionava o uso em larga escala do etanol como substituto para a gasolina, com intervenção do governo para aumentar a oferta e a demanda pela substância (Mussatto et. al., 2010). Assim, nove anos depois, a maioria dos carros novos vendidos no Brasil já utilizava etanol hidratado (96% de pureza) como combustível.

A existência de grande número de veículos flex, combinada com o aumento dos preços do petróleo levou a uma ascensão rápida na produção de etanol e cana-de-açúcar desde 2000. Em 2010, mais de 80% da produção automobilística do Brasil tinha capacidade flex (Mussatto et. al., 2010). Em 2019, segundo a Associação Nacional de Fabricantes de Veículos Automotores (ANFAVEA, 2020) 87,4% dos licenciamentos de automóveis e comerciais leves tinham capacidade flex-fuel.

2.6 Tecnologias de produção de etanol

O etanol pode ser obtido a partir de diversas fontes de biomassa e através de diferentes tecnologias de conversão. De modo geral, a produção de etanol ocorre em três etapas: formação de uma solução de açúcares fermentescíveis, fermentação dos açúcares em etanol e separação e purificação do etanol produzido (Demirbaş, 2005). Pode-se classificar o combustível segundo a matéria-prima utilizada na sua produção em etanol de primeira, segunda e terceira gerações.

2.6.1 Etanol de primeira geração (1G)

Tradicionalmente, a produção de etanol no mundo consiste-se no cultivo e no processamento de espécies vegetais abundantes em amido ou açúcar, como a cana-de-açúcar no Brasil, e o milho nos EUA. Os conhecimentos industriais de produção de etanol a partir da fermentação da glicose contida no melaço das matérias primas açucaradas são tecnologicamente estabelecidos e amplamente difundidos, embora

ainda seja possível a otimização dos sistemas de fermentação e separação empregados.

A fermentação alcoólica é o meio mais utilizado atualmente para produção de etanol, processo no qual leveduras metabolizam carboidratos em etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ / $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), gás carbônico (CO_2), e outros compostos secundários, como o glicerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$) através de uma série de reações enzimáticas onde a glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) é oxidada no citoplasma celular, gerando energia, biomassa e produtos extracelulares de interesse econômico como o etanol (Yokoya, 1995). Este biocombustível oriundo de substratos preparados a partir de matérias-primas açucaradas e/ou reservas de amido é conhecido como etanol de primeira geração (1G), produzido a partir de culturas que fornecem diretamente os açúcares que serão substrato para a fermentação alcoólica (Mussatto et al., 2010).

A obtenção de glicose a partir da cana-de-açúcar, por exemplo, ocorre de forma direta, necessitando apenas de uma etapa de moagem dos colmos da planta para obtenção do caldo, já o milho e outros cereais têm suas reservas de glicose sob a forma de amido. Assim, para produzir etanol a partir de reservas de amido, antes precisa-se quebrar as moléculas de amido em açúcares fermentescíveis, pois as leveduras atualmente empregadas na cadeia produtiva de etanol não são capazes de metabolizar diretamente o amido. Neste sentido, utilizando de uma etapa de sacarificação, acontece a quebra do amido em glicose através de uma hidrólise, realizada por ácidos ou por combinações de enzimas como a α -amilase e a amiloglicosidase (Nelson e Cox, 2018).

Embora a tecnologia de produção de etanol de primeira geração esteja consolidada e bem desenvolvida, o problema causado pela redução da disponibilidade de áreas agricultáveis e a conseqüente competição de terras com a produção de alimentos se torna um fator crítico quando se projeta a demanda por combustíveis dos próximos anos levando em consideração o aumento da população mundial e o planejamento das lavouras de cana. Devido à quantidade de terra demandada para cultivo, outras fontes de biomassa devem ser consideradas para o aumento da produção de etanol.

2.6.2 Etanol de segunda geração (2G)

Nos últimos anos têm-se estudado extensivamente o etanol oriundo de materiais lignocelulósicos, conhecido como “etanol de segunda geração” (2G). Essa geração de biocombustível utiliza como matéria-prima diferentes tipos de biomassa lignocelulósica como sobras de colheitas, gramíneas, serragem e cavacos de madeira, que são matérias-primas alternativas, subprodutos de atividades agrícolas e/ou resíduos industriais (Mussatto et al., 2010). Dessa forma, no processo de produção 2G, bagaço de cana pode ser transformado em energia, podendo elevar a produção atual a números muito maiores sem mudança da área cultivada.

Essa biomassa é composta, basicamente, por três materiais distintos, sendo eles a lignina, a celulose e a hemicelulose. Devido à natureza e composição química da lignina, ela não é pode ser utilizada como substrato para conversão em etanol, mas pode ser empregada em outras etapas do processo produtivo como na combustão em caldeiras para geração de calor e energia elétrica. A lignina também pode ser gaseificada para produção de outros biocombustíveis (Sánchez e Cardona, 2008).

Em contrapartida, a celulose e a hemicelulose são constituídas por açúcares fermentescíveis que podem ser empregados em escala industrial para processos de conversão à etanol após etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática. A produção de etanol 2G, utiliza matérias-primas mais complexas e conseqüentemente, demanda do processo produtivo etapas adicionais comparada com o etanol de primeira geração.

A grande vantagem do etanol 2G está no aproveitamento integral da planta para geração de energia, o que aumenta em grande parte a quantidade de biomassa disponível para conversão em combustível. Porém, a técnica ainda possui baixo rendimento e altos custos envolvidos com o pré-tratamento e hidrólise da biomassa (Klein, 2013).

2.7 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae é o microrganismo chave de processos biotecnológicos desde 4000 anos de cristo, tradicional nas técnicas de fermentação,

panificação, produção de bebidas e citada com importância em áreas de saúde clínica, agricultura e produção de alimentos, indústria de bebidas, biotecnologia e combustíveis (Vaughan-Martini e Martini, 2011).

Na bioconversão de açúcares em etanol por via bioquímica, o principal microrganismo fermentador são cepas industriais de *Saccharomyces cerevisiae* como a *Pedra-02*, uma estirpe que apresenta altos rendimentos de conversão de substrato em etanol e que apresenta capacidade para metabolizar hexoses, sob condições de elevadas concentrações osmóticas, baixos valores de pH, tolerando altas concentrações de etanol, realizando fermentações rápidas e vigorosas (Amorim, 2005).

Leveduras são organismos anaeróbios facultativos que podem realizar tanto fermentação quanto respiração celular, dependendo das condições do meio, podendo inclusive realizar fermentação em condições aeróbias na presença de altas concentrações de açúcares, o que torna estes microrganismos ideais para a fermentação industrial, principal etapa da fabricação de etanol (Nelson e Cox, 2018).

Cepas industriais de *Saccharomyces cerevisiae* sob condições ótimas de operação, destacam-se pela rápida conversão do substrato em produtos, respiração mínima e baixa eficiência energética na via metabólica fermentativa sob o efeito Crabtree, além de características desejáveis aos processos de fermentação industrial, como resistência à longas paradas entre as fermentações, ao processo de reciclo, ao tratamento do fermento e a mudanças bruscas de pH, apresentando fermentações com baixa produção de espuma, com alta capacidade de multiplicação e estabelecimento, se encaixando perfeitamente à rotina industrial e gerando altos rendimentos fermentativos (Amorim, 2005).

Filogeneticamente está na ordem Saccharomycetales, pertencendo à família Saccharomycetaceae e ao gênero *Saccharomyces*. Segundo caracterização feita por Vaughan-Martini e Martini (2011) são leveduras unicelulares, anaeróbias facultativas, com crescimento vegetativo através de brotamentos, células com formato arredondado e/ou alongado com tamanho médio de 3-8 x 5-10 μm , ocorrendo individualmente ou em grupos pequenos, possuindo habilidade de sedimentação.

Esse microrganismo foi o primeiro genoma eucariótico totalmente sequenciado e, apesar de não ser comumente isolado do meio-ambiente, no âmbito fermentativo

essa é a principal levedura conhecida, muito estudada, amplamente utilizada e portanto, foi selecionada através do tempo nos ambientes artificiais de fermentação como vinícolas, padarias e na produção cervejeira, colonizando, desenvolvendo-se e persistindo nestes ambientes mesmo os não estéreis, vencendo a competição bacteriana e sendo capaz de realizar fermentações robustas, mantendo sua viabilidade celular em taxas altas por longos períodos (Merico et al., 2007).

Tradicionalmente fermentadora de mostos preparados a partir de cana-de-açúcar, pouco se sabe ainda da performance das cepas industriais de *Saccharomyces cerevisiae* e da qualidade de mostos produzidos de cana energia.

Embora existam cepas geneticamente modificadas de *Saccharomyces spp* em estudo (OGMs), tradicionalmente esta levedura é incapaz de fermentar pentoses como a xilose, segunda fonte mais abundante de açúcar em matéria vegetal existente e o segundo carboidrato mais abundante na natureza, substrato decisivo para alcançar a futura produção de etanol 2G (Matsushika et al., 2009). Nesta perspectiva, outras leveduras como as do gênero *Pichia* destacam-se na eficiência fermentativa, com características particularmente interessantes quando comparada com a *Saccharomyces cerevisiae*, como termotolerância, e habilidade de desdobrar hexoses e pentoses como a xilose, apresentando altas taxas de viabilidade celular em temperaturas altas e mostos ácidos, o que representaria economia com refrigeração e aditivos do processo, encaixando-se e em alguns casos até superando os parâmetros operacionais recomendadas por Amorim (2005).

2.8 *Pichia kudriavzevii*

O processo de fermentação industrial é operado sob condições controladas como concentração de açúcares, determinados níveis de pH e temperatura pois, processos ocorrendo em condições mais críticas, acarretam redução significativa da atividade celular e conseqüente queda de rendimento. Nesse sentido, o uso de leveduras termotolerantes e com capacidade metabólica mais abrangente é interessante pois, características termotolerantes e osmotolerantes podem elevar o rendimento dos processos fermentativos e torná-los menos onerosos, reduzindo custos operacionais decorrentes de refrigeração. O emprego de leveduras mais

resistentes possibilita fermentações com elevadas temperaturas e altos teores sólidos solúveis (Brix) obtendo vinhos mais concentrados, favorecendo reações enzimáticas e processos de separação, resultando em menor volume de vinhaça (resíduo com elevado potencial de poluição ambiental), gerando menos efluentes e uma produção de industrial mais eficiente (Howell, 2011).

Microrganismos com tais características possuem produção comercial limitada como consequência da sua sensibilidade à inibidores e baixa tolerância ao etanol. Por outro lado, a levedura *Pichia kudriavzevii*, anteriormente conhecida como *Issatchenkia orientalis* e *Candida krusei*, sistematicamente classificada na ordem Saccharomycetales, família Pichiaceae e gênero *Pichia*, tem se mostrado promissora para a fermentação de pentoses e hexoses (Isono et al., 2012; Yuangsaard, 2013; Yuan et al., 2017).

A *P. kudriavzevii* é um excelente microrganismo para produção de produtos tradicionais como o etanol e foi descrita como um organismo robusto sendo boa fermentadora de xilose e tolerando altas concentrações de etanol na fase final do processamento, interessante para produção de etanol. Além disso, a levedura apresenta tolerância a pH baixo, altas concentrações de sais e temperaturas de até 42°C (Isono et al., 2012).

Foi caracterizada por Kurtzman (2011) como leveduras unicelulares, ascomicéticas, apresentando crescimento vegetativo por brotamento, células ovoides e alongadas de 1,3-6 x 3,3-14 µm, ocorrendo individualmente ou em pares, presença de pseudo-hifas ramificadas, odor levemente ácido e coloração creme. Amplamente distribuído na natureza, frequentemente ocorrendo no solo, em frutas e em ambientes de fermentações naturais, sendo também um isolado comum de cascas de frutas, além de encontrado em fontes como champanhe e resíduos suínos (Chan et al., 2012).

É uma espécie rustica, tolerante a múltiplas situações de estresse, capaz de metabolizar hexoses e pentoses, tendo máxima eficiência em pHs baixos e tolerância a altas concentrações de ácidos, sais e etanol, com máxima eficiência em temperaturas de 37°C (mais elevadas do que as utilizadas atualmente), apresentando boa produção de etanol e viabilidade celular à 41°C, temperaturas inadmissíveis para a maioria das leveduras (Hisamatsu et al., 2006; Isono et al., 2012). Neste sentido o

uso de leveduras como a *Pichia kudriavzevii* proporcionaria redução de custos industriais de resfriamento do mosto, que atualmente é ajustado para 30 a 35°C devido a tolerância da *S. cerevisiae*.

Várias cepas de *P. kudriavzevii* cultivadas apresentaram resultados satisfatórios operando em altas temperaturas (MF-121, DMKU3- ET15). A cepa de *P. kudriavzevii* RZ8-1 apresentou capacidade de multiplicação e produção de etanol em até 45 °C, tolerando concentrações de ácido acético, etanol e com alta viabilidade celular em fermentações ocorrendo a 40 °C (Chamnipa, 2018; Tralli, 2019). Freita (2013), estudou a eficiência da levedura na produção de etanol de 2ª geração, porém seu emprego em etanol de 1ª geração é ainda algo recente tanto em mostos clássicos como os de cana-de-açúcar, quanto em mostos a partir do caldo de cana energia para produção de etanol 1G (Dhaliwal et al., 2011).

Leveduras de modo geral sofrem influências pejorativas quando crescem submetidas a condições ambientais não favoráveis, uma vez que estes microrganismos possuem uma faixa ótima de crescimento e função celular para ambientes fermentativos. Por outro lado, como leveduras são um grupo de organismos muito amplo e variado, existe diferença de condições ótimas quando se compara estirpes distintas, como a temperatura e pH ideais (Lin et al., 2012).

2.9 Fatores que afetam a fermentação alcoólica

Fatores como pH, acidez, temperatura, concentrações de açúcares, de substâncias inibidoras e de nutrientes, são parâmetros essenciais de controle de processos fermentativos pois estão ligados diretamente no desenvolvimento das leveduras e à máxima atividade enzimática (Howell, 2011). Conseqüentemente, é imprescindível conhecer e controlar os fatores que afetam o crescimento e a atividade celular do microrganismo utilizado para alcançar altos desempenhos fermentativos.

O crescimento microbiano ocorre através do aumento de número de células através do tempo em um meio de cultivo específico, ou seja, através do crescimento populacional de células microscópicas. No crescimento de leveduras, a quantificação é baseada no mesmo princípio de crescimento em número de células. Embora durante a nutrição, metabolismo e multiplicação celular ocorra um crescimento individual da

célula para auxiliar na divisão celular, o crescimento significativo é dado pela multiplicação de indivíduos no meio. Existem diversos métodos desenvolvidos para quantificar o crescimento celular, variando de acordo com a técnica, necessidade, custo e aplicabilidade. Dentre os métodos mais utilizados pode-se destacar o método de contagem em câmara, a contagem de células viáveis e a contagem por densidade ótica (Groves et al., 1996).

Tanto o crescimento quanto a atividade celular estão diretamente ligados às condições ambientais em que as células são submetidas durante o processamento dos mostos. Dessa forma, condições ambientais como pH, disponibilidade de água, substrato, nutrientes, vitaminas, temperatura, radiação, pressão osmótica, oxigênio e pressão são fatores decisivos no crescimento de microrganismos como as leveduras (Deparis et al., 2017). Cada um desses fatores interfere diretamente no metabolismo e produção de energia e compostos extracelulares, para a realização do seu metabolismo, reprodução e sobrevivência da cultura. Assim, monitorar esses parâmetros, têm como consequência uma melhoria a produção de metabolitos de interesse, elevando assim a produtividade.

Dentre os fatores com efeito direto na fermentação alcoólica, Santos (2013) destaca temperatura, pH, concentração de substrato, de produto e de elementos minerais. A temperatura está diretamente ligada com a atividade enzimática da célula, existindo para cada estirpe uma temperatura ótima de atividade celular, a qual as reações enzimáticas aconteceram mais eficientemente. Leveduras são organismos mesófilos, assim, grande parte dos seus representantes tem ótima atividade desenvolvendo-se em temperaturas de 20-45°C (Sousa e Monteiro, 2011; Melo et al., 2014). Enquanto estipes de *Saccharomyces cerevisiae* tem seu pico de atividade em temperaturas médias de 32°C, *Pichia kudriavzevii*, mostrou melhores resultados práticos operando à 37 °C (Tralli, 2019).

O pH do meio é um outro fator variável durante a fermentação, em que faixas ideais são descritas entre de 4 a 4,5 para microrganismos tradicionais como do gênero *Saccharomyces* spp. Baixos valores de pH inibem a proliferação de bactérias contaminantes prejudiciais ao processo sem afetar a atividade celular da levedura, tornando-se um importante aliado no controle de contaminações industriais (Santos, 2013).

De acordo com Malacrino et al. (2005), concentrações de açúcares acima de 27% (p/v) inibem a metabolização, gerando uma conversão lenta e com substrato residual no fim do processamento. Quantidades ideais de substrato variam de acordo com o processo produtivo, recomendando-se entre 18 e 20% para a produção de etanol e 22 a 25% para a produção de vinhos, por exemplo. O etanol pode ser tóxico para as leveduras e dependendo da concentração no meio, causa inibição da atividade celular e impede que haja a metabolização dos açúcares finais (Santos, 2013). O teor de etanol está diretamente ligado à concentração de açúcar inicial do mosto, a qual varia de acordo com o tipo de fermentação e estirpe utilizada.

A concentração de elementos minerais no mosto é função da matéria-prima utilizada e em alguns casos há a necessidade de complementação de sais para complementar a necessidade nutricional das leveduras. Segundo Pavani et al. (2016), para uma boa fermentação são necessárias concentrações mínimas de nutrientes como Nitrogênio, Fósforo, Potássio, Magnésio, Manganês e Zinco, essenciais para o desenvolvimento celular e como cofatores enzimáticos na metabolização do substrato em etanol. Algumas matérias-primas frequentemente necessitam de complementação de nutrientes como o Fósforo e Potássio, geralmente adicionados no mosto em forma de sais como o K_2HPO_4 (Lima et al., 2001; Santos, 2013).

2.9.1 Suplementação de nutrientes na fermentação alcoólica

Estudos como os de Li et al. (2013) e Appiah-Nkansah et al. (2017) evidenciam que o uso suplementação nutricional do mosto com substâncias ricas em nitrogênio, favorece o crescimento celular, assim, suplementar mostos com substâncias nitrogenadas como a ureia, extrato de levedura e sais amoniacais, pode estimular a produção de etanol devido a promoção do crescimento celular (Puligundla et al., 2012). Ao adicionar-se estes nutrientes, espera-se um aumento na produtividade.

No Brasil, a produção de etanol tem base na cana-de-açúcar como matéria-prima, gerando mostos ricos em todos estes fatores minerais essenciais, sendo incomum a suplementação nutricional de mostos de cana-de-açúcar. Em contrapartida, devido a rusticidade das cultivares de cana energia, esta pode apresentar deficiência nutricional no seu caldo, tornando-se particularmente

interessante avaliar a influência da suplementação nutricional na fermentação de mostos de cana energia, na concentração de etanol produzida e no comportamento de cepas industriais e leveduras alternativas como a *Pichia kudriavzevii* na presença de concentrações ideais de macro e micronutrientes, avaliando o quão significativo pode ser o aumento da produtividade (Pavani et al., 2016; Ribeiro et al., 2019).

O completo consumo dos açúcares pelas leveduras e conseqüentemente altas taxas fermentativas não ocorrem sem uma nutrição adequada, levando as leveduras a produzir compostos indesejados, e/ou restringir a produção de etanol. Em alguns casos a carência nutricional pode determinar a cinética do processo, tornando-os mais lentos e onerosos (Nofemele et al., 2012).

A suplementação natural de nitrogênio do mosto permite a levedura a sobreviver condições de estresse, melhora a multiplicação e facilita o final do processo fermentativo. A concentração de fonte de nitrogênio no meio influencia na quantidade de açúcar a ser direcionado às vias metabólicas da levedura sendo a presença de aminoácidos o promotor da queda de eficiência na via de metabolismo de pentoses como a xilose e no direcionamento de maior parcela de açúcares para a via glicolítica por exemplo (Walker, 1998).

Células de leveduras possuem em geral 10% do seu peso seco composto por nitrogênio e apenas uma parte do nitrogênio total no mosto está disponível para ser usado na fermentação é proveniente de fontes como íons amônio e alfa-aminoácidos (Howell, 2011). Segundo Tralli (2019), Pavani et al. (2016) e Amorim (2005), são recomendados $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ de N no mosto para fermentação alcoólica.

Além do Nitrogênio, macronutrientes como Fósforo e Potássio são muito importantes no desenvolvimento celular e na transformação dos substratos em etanol. Zinco, Magnésio, Manganês e Cálcio são exemplos de minerais que são necessários em quantidades bem menores que esses macronutrientes, e são conhecidos por sua importância vitalícia para o crescimento das células de levedura (Udeh e Kgatla, 2013). O Fósforo por exemplo, está presente nos ácidos nucleicos e fosfolipídios e conseqüentemente é essencial para todas as leveduras, representando cerca de 3-5% do seu peso seco (Walker, 1998). São recomendadas cerca de $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ de K e 60 g.L^{-1} de P no mosto (Tralli, 2019; Pavani et al., 2016; Amorim, 2005).

De forma análoga ao papel no crescimento das células, micronutrientes como Mg, Mn e Zn são importantes para o metabolismo celular, pois tomam parte na sintetização de enzimas essenciais para o metabolismo de glicose (álcool desidrogenase 1, álcool desidrogenase 2 e aldeído desidrogenase) e xilose (xilose redutase, xilitol desidrogenase e xilulose cinase), açúcares presentes em maior concentração nas células vegetais usadas como substrato para a produção de etanol. São recomendadas $0,05 \text{ g.L}^{-1}$ de Mg, $0,01 \text{ g.L}^{-1}$ de Mn e $0,01 \text{ g.L}^{-1}$ de Zn para fermentação (Tralli, 2019; Pavani et al., 2016; Amorim, 2005). Nesse sentido, a concentração desses nutrientes no mosto deve ser quantificada e suplementada quando necessário, garantindo o acesso da levedura aos nutrientes essenciais para o estabelecimento das respectivas atividades celulares e assegurando altos rendimentos fermentativos (Walker, 1998; Nelson e Cox, 2018).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Instalação e condução dos ensaios

O experimento foi instalado e conduzido no Laboratório de Açúcar e do Alcool e Microbiologia das Fermentações do Departamento de Tecnologia, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP, Campus de Jaboticabal-SP.

3.2 Matérias-primas

As matérias-primas utilizadas constaram de colmos limpos e recém cortados de cana-de-açúcar (CTC2) de segundo corte, com 11 meses de idade, caracterizada por elevado porte e produção de TCH (Toneladas de Colmos por hectare) (CTC, 2018), e colmos de cana energia (Vertix9) de primeiro corte, com 13 meses de idade (Vertix9). As matérias-primas foram colhidas em agosto de 2019 com despalha e desponte manual, sem queima, apresentando índice de infestação de broca inferiores a 2,5%, índice inferior ao nível de controle recomendado por Macedo e Macedo (2004).

Os colmos de cana-de-açúcar foram cedidos pela Usina São Martinho, da área de cultivo no município de Barrinha - SP. A cana energia foi cultivada na área experimental do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP, Campus de Jaboticabal-SP.

Os colmos de ambas matérias-primas foram colhidos em agosto de 2019, sendo os caldos extraídos em moenda de laboratório e em seguida foram realizadas as caracterizações físico-químicas e tecnológicas dos caldos.

Para caracterização da matéria-prima, colmos de cana-de-açúcar e cana energia foram processados em desfibrador de cana e o caldo extraído em prensa hidráulica segundo metodologia proposta por Tanimoto (1964). As determinações e cálculos (Peso do Bolo Úmido (PBU), Fibra % cana, ATR e ART) foram realizados de acordo com a metodologia do PCTS (Pagamento pelo Teor de Sacarose), regulamentada pelo Conselho de Produtores de Cana-de-açúcar, Açúcar e Etanol do Estado de São Paulo (Consecana, 2006).

3.3 Microrganismos

A leveduras utilizadas nos ensaios foram a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* Pedra 2 (PE-02) cedida pela indústria São Martinho; e a cepa de *Pichia Kudriavzevii* (LJ-03), pertencente ao banco de microrganismos do Laboratório de Microbiologia das Fermentações, do Departamento de Tecnologia, da FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal - SP.

3.4 Caracterização tecnológica dos caldos

A extração do caldo dos colmos foi realizada no Laboratório de Tecnologia do Açúcar e do Álcool da FCAV/UNESP – Campus Jaboticabal. A seguir, realizou-se a determinação das características tecnológicas segundo as metodologias: Teor de Sólidos Solúveis (Brix) (Schneider, 1979); Açúcares Redutores e Açúcares Redutores Totais (Lane e Eynon, 1934); pH (determinação direta em pHmetro digital); Acidez Total (CTC, 2005); Amido (Chavan et al., 1991) e Compostos Fenólicos Totais (Folin e Ciocalteau, 1927).

3.5 Determinação da concentração de nutrientes

A determinação do teor de nutrientes nos caldos de cana energia foi realizada segundo metodologia proposta pela Embrapa, analisando nitrogênio em Digestão Sulfúrica e Tíbulometria; e fósforo, magnésio, potássio, Manganês e Zinco em digestão Nítrico-Perclórica seguida de Espectrofotometria de Absorção atômica (Do Carmo et al., 2000).

3.6 Clarificação do caldo de cana

Os caldos de cana extraídos foram clarificados segundo protocolo estabelecido para a produção de etanol, adicionando-se Hidróxido de Cálcio 6°Bé para correção do pH para $6 \pm 0,1$, aquecendo-se o caldo até a ebulição, seguido de agitação. A seguir

os caldos foram colocados em provetas com aquecimento por lâmpadas, adicionando-se 1,5 mg/L de polímero Kemtalo Sep A3XL (Kemira A3XL) para otimizar o processo de decantação (Freita, 2017). Após 20 minutos em decantação, os caldos de cana-de-açúcar e cana energia foram sifonados e armazenados para preparo dos mostos (CTC, 2005).

3.7 Preparo dos mostos

O caldo clarificado de cana-de-açúcar foi padronizado para Brix $15 \pm 0,1$ e o pH foi corrigido com adição de Ácido Sulfúrico para 3,5 ($\pm 0,1$) e 4,5 ($\pm 0,1$) de acordo com o delineamento experimental (Figura 03), resultando em 2 mostos de cana-de-açúcar (um com pH 3,5, adequado às condições fermentativas da levedura *P. kudriavzevii* e outro com pH 4,5 adequado às exigências fermentativas da *S. cerevisiae*), sendo a seguir aquecidos a 32°C.

O caldo clarificado de cana energia foi padronizado para Brix $15 \pm 0,1$ e o pH também foi corrigido com adição de Ácido Sulfúrico para 3,5 ($\pm 0,1$) e 4,5 ($\pm 0,1$) de acordo com o delineamento experimental (Figura 03), gerando 2 mostos de cana energia (um com pH 3,5 para fermentações com *P. kudriavzevii* e outro com pH 4,5 para fermentações com *S. cerevisiae*) e aquecidos a 32°C. Os mostos de cana energia foram suplementados com sais de Fosfato de Sódio, Sulfato de Manganês e Sulfato de Zinco, fonte dos nutrientes (P, Mn e Zn): essenciais para leveduras segundo Amorim, (1977 e Irene *et al.* (2016), dosados segundo Pavani *et al.* (2016): 0,3 g.L⁻¹ de Fósforo, 0,01 g.L⁻¹ de Manganês e 0,01 g.L⁻¹ de Zinco. Em seguida, alíquotas de 50 mL de mosto foram distribuídas em Erlenmeyer de 250 mL.

Análises tecnológicas foram realizadas nos mostos para determinação de Brix (Schneider, 1979); Açúcares Redutores Totais (Lane e Eynon, 1934); Açúcares Redutores (Lane e Eynon, 1934); pH (determinação direta em pHmetro digital); Acidez Total (CTC, 2005); Amido (Chavan *et al.*, 1991) e Compostos Fenólicos Totais (Folin e Ciocalteau, 1927).

3.8 Preparo do inóculo

Células de *Saccharomyces cerevisiae* (PE-02) liofilizadas foram hidratadas e reativadas em mistura de água destilada e glicose por 45 min, sendo centrifugadas a seguir para a recuperação da massa celular produzida. Para obtenção da massa de *Pichia kudriavzevii* (LJ-03), inoculou-se células coletadas com uma alça de platina em Erlenmeyer com 200 mL de meio YPD (Yeast extract-Peptone-Dextrose) contendo 10g.L⁻¹ de extrato de levedura, 20g.L⁻¹ de peptona, e 20g.L⁻¹ de glicose (Govindaswamy e Leland, 2007).

Os frascos foram incubados por 72h a temperatura de 32°C sob agitação orbital (0,36 g-force). Ao final desse período o meio de cultura foi centrifugado, descartando-se a fração líquida. A massa celular obtida foi multiplicada em mosto preparado a partir de cana energia com 4° Brix e suplementado com nutrientes segundo Pavani et al. (2016). Os procedimentos foram repetidos até que se obtivesse quantidade suficiente de biomassa para realizar os processos fermentativos com concentração celular de 10⁷ UFC.mL⁻¹.

3.9 Delineamento experimental

Foram utilizados dois esquemas estatísticos: O delineamento experimental utilizado para monitorar o crescimento celular foi o inteiramente casualizado em um esquema de parcelas sub-subdivididas, com 3 repetições. Os tratamentos principais caracterizados por duas matérias-primas (mosto de cana-de-açúcar e mosto cana energia), os secundários constituídos por 4 esquemas de leveduras em condições fermentativas ideais de pH (3,5 e 4,5) e temperatura (32°C e 37°C) segundo Tralli (2019). Leveduras foram inoculadas isoladamente e em consórcio (50% *P. kudriavzevii* + 50% *S. cerevisiae*) para fermentação em condições ideais de pH e temperatura de acordo com a Figura 03.

Os tratamentos terciários foram constituídos de 6 tempos para concentração celular, e de 2 tempos (início e final das fermentações) para viabilidade celular, índice de brotamentos e viabilidade dos brotos. Para a quantificação dos vinhos, foi utilizado

um delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema de parcelas subdivididas com 3 repetições.

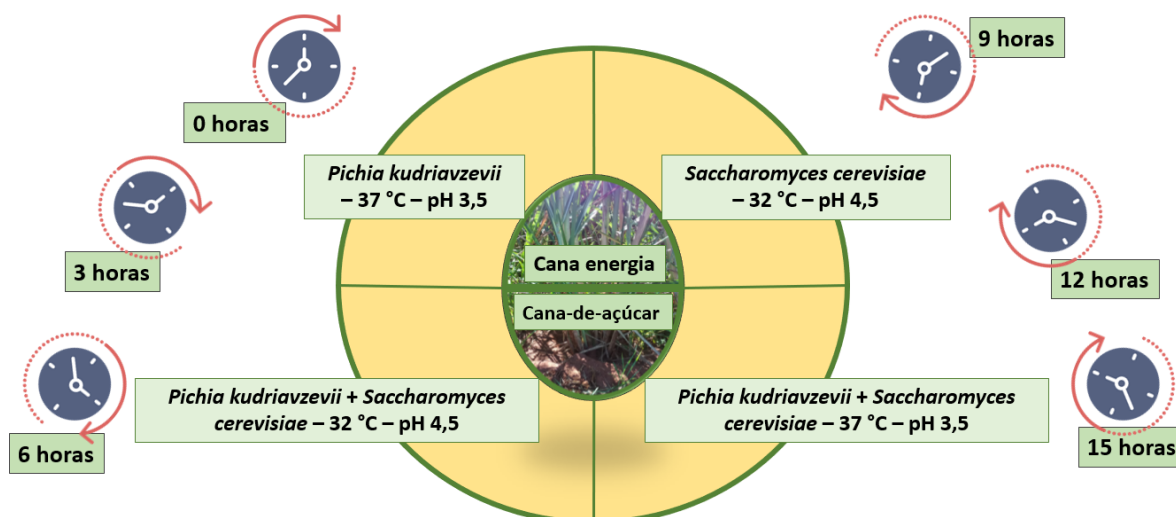


Figura 03. Esquema do delineamento experimental utilizado para o monitoramento do crescimento de massa celular (g.L^{-1}) empregado nos ensaios.

3.10 Processo fermentativo

Para iniciar o processo fermentativo foram pesados 3 g de massa úmida das leveduras *P. kudriavzevii* (LJ03) e *S. cerevisiae* (PE-02) isoladas ou em consórcio de acordo com os tratamentos (Figura 03), para obtenção de uma concentração de 10^7 células mL^{-1} após a adição do volume total do mosto (Freita, 2017). Iniciou-se o processo com 50 mL, devido à aclimação das leveduras, e uma alimentação de 50 mL de mosto aos 40 minutos, obtendo-se um volume final de 100 mL. Considerou-se o tempo zero após a alimentação de 50 mL. Erlenmeyers de 250 mL foram incubados por 15 horas sob controle de temperatura e agitação. Ao final das fermentações, o inóculo foi recuperado através de centrifugação do vinho a $2500\text{g}/30^\circ\text{C}$.

3.11 Monitoramento microbiológico de leveduras

Foram determinadas a viabilidade celular, a viabilidade dos brotos e o índice de brotamentos do inóculo, no início das fermentações e no final dos ensaios

utilizando câmara de Neubauer (Lee et al., 1981). Os cálculos foram realizados através das seguintes fórmulas:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Células vivas}}{\text{Células vivas} + \text{Células mortas}} \times 100$$

$$\text{Índice de brotamento (\%)} = \frac{\text{Brotos vivos}}{\text{Células vivas} + \text{Células mortas}} \times 100$$

$$\text{Viabilidade dos brotos (\%)} = \frac{\text{Brotos vivos}}{\text{Brotos vivos} + \text{Células mortas}} \times 100$$

3.12 Monitoramento de massa celular

Foram construídas curvas padrão de concentração celular para leitura espectrofotométrica a 640nm da concentração de células durante a fermentação para soluções de *P. kudriavzevii* puras ($R^2= 0,99$), *S. cerevisiae* puras ($R^2= 0,99$) e mix de leveduras (50% *P. kudriavzevii* + 50% *S. cerevisiae*) ($R^2= 0,99$).

Durante a fermentação, alíquotas de 0,1mL foram amostradas em 0, 3, 6, 9,12 e 15 horas de processo, para determinação do crescimento das células através de determinação óptica em espectrofotômetro com leituras realizadas em comprimento de onda de 640 nm (Santos, 2013).

3.13 Caracterização dos vinhos, determinação da produtividade e cálculo da eficiência fermentativa

Os vinhos de levedurados foram quantificados quanto aos teores de Açúcares Redutores Residuais Totais (ARRT) (Lane e Eynon, 1934), Teor de glicerol (CTC, 2011) e Teor alcoólico (densímetro digital). O rendimento prático foi calculado considerando-se o teor alcoólico do vinho, a eficiência fermentativa segundo Fernandes (2011).

3.14 Análise estatística

Foram realizadas transformações dos dados de ARRT utilizando $\sqrt{x + 0.5}$ para ajustá-los, sendo apresentadas as médias originais. Os dados obtidos no experimento foram submetidos à análise de variância pelo Teste F e de comparação de médias pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) utilizando-se o Software AgroEstat (Barbosa e Maldonado Junior, 2015).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Qualidade da matéria-prima

A Tabela 01 mostra os valores médios obtidos para as características químico-tecnológicas dos caldos extraídos de cana-de-açúcar (CTC2) e cana energia (Vertex9), seguidos dos valores dos desvios padrão calculados.

Tabela 01. Características químico-tecnológicas dos caldos extraídos de cana-de-açúcar (CTC2) e cana energia (Vertex9). Jaboticabal-SP, safra 2019/2020.

Matéria-Prima	Cana-de-açúcar	Cana energia
Brix (%)	20,43 ± 0,59	15,33± 0,29
pH	5,25 ± 0,04	5,14 ± 0,05
Acidez Total (g de H ₂ SO ₄ .100 mL ⁻¹)	0,51 ± 0,06	1,30 ± 0,08
POL(%)	17,41 ± 0,10	8,09 ± 0,27
ART (%)	18,39 ± 0,58	10,88 ± 0,64
AR (%)	0,43 ± 0,24	1,64 ± 0,10
Amido (mg.L ⁻¹)	306,18 ±5,20	217,14 ± 4,24
Fenol (mg.L ⁻¹)	307,76 ± 5,91	413,46 ± 4,33
Peso do bolo úmido (PBU) (g)	156,67 ± 0,58	173,17 ± 0,29
Umidade (%)	67,84 ± 1,40	69,62 ± 0,75
Fibra (%)	13,41 ± 0,05	14,73± 0,02
Pureza (%)	85,28 ± 2,44	51,03 ± 2,95
ATR (kg.t ⁻¹)	145,32 ± 9,71	75,72 ± 0,69

Brix: Teor de sólidos solúveis. AR: Açúcares redutores. ART: Açúcares redutores totais. ATR: açúcar total recuperável.

Para caracterização da qualidade da matéria-prima, avaliou-se inicialmente a condição dos colmos utilizados. Estes apresentavam boa sanidade e estavam aptos a serem processados não promovendo prejuízos ao processamento industrial. As determinações tecnológicas do caldo extraído indicaram que os valores estavam dentro das faixas recomendadas.

Os genótipos de cana energia e cana-de-açúcar avaliados, apresentaram teores similares de fibra de 14,73±0,02% e 13,41±0,05% respectivamente. Tradicionalmente a cana energia possui maior teor de fibras, podendo variar de acordo com a variedade, sendo que híbridos de cana energia normalmente apresentam maior

teor de fibras do que sacarose dependendo, como por exemplo a Vertix9, utilizada neste estudo contém cerca de 9% de açúcares e até 25% de fibras (Granbio, 2017).

O teor médio de fibra determinado para a variedade CTC2 foi similar ao obtido por Campos et al. (2014). Comportamento semelhante foi encontrado para Verix9, estando os teores obtidos em conformidade aos parâmetros descritos pela GranBio de $\leq 25\%$ de fibra (Granbio, 2017). Esperava-se uma maior variação no teor de fibras em relação à cana-de-açúcar. Entretanto a Vertix9 apresentou um teor 9,8% superior de fibra, o que pode ser relacionado à idade dos colmos colhidos, ao corte e ao seu processo de desenvolvimento.

A Pureza do caldo é um indicativo que relaciona Pol e Brix do caldo. Considerando-se que ambos os parâmetros apresentaram menores valores para cana energia, conseqüentemente, os valores obtidos para Pureza do Caldo extraído são menores ($51,03 \pm 2,95$) do que os obtidos para cana-de-açúcar ($85,28 \pm 2,44$). Estes resultados eram esperados, segundo Matsuoka et al. (2014), Kim e Day (2011) e publicações da Granbio e Vignis, que relatam baixos valores de pureza para o caldo de cana energia, podendo ser direcionado à fermentação industrial (Granbio, 2018).

De modo semelhante, para os valores calculados para Açúcar Total Recuperável (ATR em kg.t^{-1}) para a cana-de-açúcar foram superiores ao da cana energia, da ordem de $145,32 \text{ kg.t}^{-1}$, enquanto para cana energia obteve-se $75,72 \text{ kg.t}^{-1}$. O menor rendimento em açúcar para a cana energia é resultante do menor teor de açúcares, pureza do caldo e do maior conteúdo de fibra da planta. Não obstante, a redução nos teores de ATR são compensadas pelo maior ganho de produtividade no campo (Consecana, 2006; Matsuoka et. al., 2012; Carvalho-Neto et al., 2014).

4.2 Produtividade agrícola e potencial produtivo

A área plantada de cana-de-açúcar (CTC2) apresentou uma produtividade média de 93 t/ha, valor inferior à produtividade encontrada no estudo de Campos et al. (2014), que determinaram, em condições irrigadas, produtividade de $151,93 \text{ t.ha}^{-1}$.

A produtividade calculada foi maior que o rendimento médio da cultura no país (80 t/ha), maior que a produtividade da safra de 2018/19 ($72,234 \text{ t.ha}^{-1}$) e ainda maior que a previsão para 2019/20, de 75.783 t.ha^{-1} respectivamente. Entretanto

apresentou um índice 50,54% menor que o alcançado pela área experimental de cana energia deste experimento, que chegou a 140 t/ha no primeiro corte conforme mostra a Tabela 02.

Tabela 02. Cálculos teóricos de potencial produtivo de ATR, fibra e etanol 1G para cana-de-açúcar (CTC2) e cana energia (Vertix9). Jaboticabal-SP, safra 2019/2020.

	P.A. (t.ha⁻¹)	ATR (kg.t⁻¹)	ATR/ha (kg.ha⁻¹)	U.B.C. (%)	Fibra (t.ha⁻¹)	Etanol (L.ha⁻¹)
Cana-de-açúcar (CTC2)	93,0	145,32	13514,76	37,58	29,202	7990,75
Cana energia (Vertix 9)	140,0	75,72	10600,8	39,98	48,440	6267,84

P.A.: Produtividade Agrícola (t.ha⁻¹); ATR: Açúcar Total Recuperável (Kg.t⁻¹); U.B.C.: Umidade do bolo de cana extraído em prensa hidráulica segundo Tanimoto (1964) (%).

Considerando o Açúcar Total Recuperável (ATR) gerado em kg/ha, têm-se uma produção teórica de 11160,1 kg/ha de ATR para a cana-de-açúcar CTC2, multiplicando-se o ART médio da variedade (120 kg/t) pela produtividade agrícola (CTC, 2018). Entretanto, a produtividade alcançada foi de 13414,76 kg/ha de ATR, segundo a análise da matéria-prima, valores similares aos reportados por Vieira et al. (2012) e Campos et al (2014).

Segundo a GranBio (2018), a variedade pode render até 180 t/ha de produtividade nos cortes subsequentes, podendo neste caso elevar em 35,35% a produção de ATR atual, produzindo 13629,6 ATR/ha, alcançando uma produção de 0.85% maior de ATR/ha que a cana-de-açúcar CTC2. Segundo Matsuoka et al (2014), alguns genótipos de cana energia testados no estado da Luisiana (EUA), renderam até 211 t.ha⁻¹, superando a produção de ATR da cana-de-açúcar em função da alta produtividade agrícola alcançada.

A cana-de-açúcar é uma biomassa de grande importância devido à sua contribuição para a diversificação e aumento da capacidade da grade energética. Entretanto, essa contribuição pode ser melhorada com a prática do cultivo de cana energia, elevando a produção de ATR já desde o primeiro corte, com perspectiva de

e elevar a produtividade nas safras seguintes devido ao alto perfilhamento da variedade e grande capacidade de geração de colmos nas socas subsequentes (Granbio, 2017).

O emprego da cana energia na produção de etanol gera canaviais mais produtivos, resistentes e baratos, devido a rusticidade da planta. O cultivo desta variedade gera maior volume de fibra (65,88% mais fibra que a produção de bagaço para a cana-de-açúcar CTC2, com produção de 29,202 toneladas de bagaço por hectare) como mostra a tabela 02.

Para a produção de etanol por hectare, considerando-se conversões da Consecana-SP onde 1 litro de etanol hidratado é produzido a partir de aproximadamente 1,6913 kg de ART, projeta-se uma produção de 7990,75 litros de etanol por hectare de cana-de-açúcar, números superiores à produção de etanol 1G por hectare de cana energia prospectados (6267,84 l.ha⁻¹).

Considerando-se uma produtividade de cana energia de 180 t.ha⁻¹, produziria-se a partir deste genótipo 8061,85 l.ha⁻¹ de etanol e 62,280 t.ha⁻¹ de bagaço, superando assim os números produzidos por cana-de-açúcar para etanol. A alta produtividade de fibra pode elevar os números de produção de cogeração de energia elétrica e de etanol 2G, realçando a capacidade de produção de etanol por hectare, superando as perspectivas de crescimento da produção e suprimindo a futura demanda por biocombustível.

4.3 Parâmetros fermentativos

A Tabela 03 mostra os valores médios para as quantificações tecnológicas dos mostos preparados após a clarificação dos caldos de cana-de-açúcar (CTC2) e cana energia (Vertex9). O teor de sólidos solúveis foi padronizado a 15° Brix e o pH das soluções corrigido para os valores ideais para fermentação por *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* segundo Amorim (1985) e Tralli (2019).

De acordo com Masson et al., (2015), caldos com valores de Brix superiores a 15% são ideais para fermentação alcoólica. Para uma fermentação com altos rendimentos é fundamental que ocorra adequada preparação do mosto, neste caso o Brix e o pH do caldo clarificado devem ser ajustados para 16±1 e 4,5±0,3, respectivamente. Neste experimento, o caldo extraído de cana energia apresentou um

Brix de 15,5%, então os caldos clarificados foram padronizados para 15°Brix para comparação das fermentações como mostra a Tabela 03.

Tabela 03. Quantificação das características tecnológicas dos mostos. Brix (°Brix), pH, Acidez Total ($\text{g H}_2\text{SO}_4 \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$), ART (%), Amido ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) e Compostos Fenólicos ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$). Jaboticabal-SP, safra 2019/2020.

Parâmetro / Mosto	Cana-de-açúcar (pH3,5)	Cana-de-açúcar (pH4,5)	Cana Energia (pH3,5)	Cana Energia (pH4,5)
Brix	15,0 ± 0,02	15,0 ± 0,02	15,0 ± 0,04	15,0 ± 0,03
pH	3,5 ± 0,03	4,5 ± 0,01	3,5 ± 0,01	4,5 ± 0,02
Acidez Total	0,89 ± 0,06	0,50 ± 0,01	2,55 ± 0,02	1,97 ± 0,04
ART	12,22 ± 0,35	13,32 ± 0,38	10,85 ± 0,37	10,66 ± 0,18
Amido	150,87 ± 2,10	121,98 ± 5,15	112,09 ± 3,97	95,59 ± 4,81
Compostos fenólicos	320,55 ± 0,86	328,68 ± 2,22	329,74 ± 1,60	347,12 ± 4,56

Brix: Teor de sólidos solúveis. ART: Açúcares redutores totais.

Os valores de pH recomendados para fermentação estão na faixa de 4,5 – 6,5 para *S. cerevisiae*, segundo Amorim (1985). De acordo com esse mesmo autor, são requeridas altas concentrações de açúcares redutores totais (ART) para altos rendimentos e produtividade. Valores superiores a 15% são recomendados para um processamento sustentável, com valores mínimos de 12,5% de ART no caldo (Schaffert e Parrella, 2012). Os valores médios de ART determinados nos caldos de cana energia foram de $10,65 \pm 0,2\%$, teores menores que os encontrados nos mostos preparados a partir de cana-de-açúcar ($12,78 \pm 0,9\%$). Os caldos de cana energia possuem naturalmente menores teores de sólidos solúveis (Brix) e baixa pureza.

Para os Compostos Fenólicos, os resultados mostraram teores médios de $331,50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ nos mostos utilizados. Estas biomoléculas afetam negativamente a etapa fermentativa devido sua natureza química, causando inibição à atividade celular da levedura, podendo levar a perdas de rendimento e alterações na constituição do destilado (Silva et al., 2016). Os resultados mostram uma redução na concentração de compostos fenólicos, quanto menor o teor desses compostos no mosto, menor será a inibição da atividade celular.

A determinação de Acidez Total dos mostos mostrou valores ligeiramente superiores para os mostos de cana energia ($2,26 \pm 0,29$ g de H_2SO_4). Para cana-de-açúcar, esse parâmetro está relacionado com a cultivar, o período de colheita da cana e a qualidade da matéria-prima: alta acidez pode indicar deterioração da cana-de-açúcar, recomendando-se concentrações inferiores à $0,8 \text{ mg.L}^{-1} H_2SO_4$ (Ripoli e Ripoli, 2009), porém pouco se sabe sobre genótipos de cana energia. A Acidez Total é inversamente proporcional ao pH, assim, os mostos com pH 3,5 apresentaram uma acidez total mais elevada. Altos valores de acidez total provocam inibição da levedura durante a fermentação, elevando os custos com o tratamento do caldo.

Os teores máximos de Amido determinados nos mostos ($150,51 \text{ mg.L}^{-1}$) foram menores que os encontrados na literatura, que apresentam concentrações maiores e variáveis desse composto em função da variedade de cana-de-açúcar utilizada (Figueira et al., 2011). A redução na concentração de amido segundo Costa et al., (2015) é vantajosa para o processamento industrial pois este polissacarídeo não pode ser metabolizado por leveduras, além de aumentar a viscosidade do caldo.

4.4 Nutrientes

Segundo Amorim (1985), Chiba et al. (2009), Nogueira et al. (2009), Oliveira et al. (2011) a presença de nutrientes em quantidades suficientes no caldo de cana-de-açúcar, é a característica que o torna um substrato ideal para produção de etanol pois possui os nutrientes necessários para bom desenvolvimento das leveduras. Neste sentido, os mostos preparados a partir de cana-de-açúcar não foram suplementados com nutrientes.

No caldo de cana-de-açúcar estes fatores nutricionais estão dispostos em elementos minerais e cofatores orgânicos necessários para a manutenção, multiplicação das células e para o desdobramento dos carboidratos em etanol, existindo para cada elemento uma concentração adequada a qual a levedura tem a sua fermentação otimizada (Amorim, 1985).

Para o caldo de cana energia (Vertix9), a determinação de nutrientes. mostrou que a partir de 12 meses de idade, esta matéria-prima apresenta deficiência de nutricional de fósforo, manganês e zinco, essenciais para a célula de levedura.

Destaca-se a importância da presença de fósforo no caldo de cana pois esse elemento é importante na manutenção celular da levedura e no processo bioquímico de produção de etanol, além de ser fundamental no processo de clarificação do caldo, sendo assim, sua ausência pode dificultar a reação química necessária para a decantação de partículas na clarificação do caldo (Tabela 04).

Tabela 04. Teor de nutrientes médio em mosto de cana-de-açúcar, teores determinados para caldos de cana energia Vertix9 com 3 e 12 meses de idade e teores recomendados no mosto para se aumentar a eficiência da fermentação. Jaboticabal-SP, safra 2019/2020.

Mineral	Variação no Mosto de cana-de-açúcar (mg.L⁻¹)*	Cana energia (03 meses) (mg.L⁻¹)	Cana energia (12 meses) (mg.L⁻¹)	Recomendação (mg.L⁻¹)*
N-assimilável (NH₄+R-NH₂)	7 – 350	1100	400	100-300
Fósforo (P)	20-200	100	<LQ**	50-250
Potássio (K)	300-12000	11200	2200	700-1300
Magnésio (Mg)	80-3900	300	400	100-200
Enxofre (S)	80-3900	1100	200	O Menor possível
Cálcio (Ca)	150-2000	550	400	O menor possível
Zinco (Zn)	0,45-9	10	<LQ**	1 – 5
Cobre (Cu)	0,20-8	<LQ**	<LQ**	1 – 5
Manganês (Mn)	2 -- 8	20	<LQ**	1 – 5

*Recomendação do teor de nutrientes para fermentação alcoólica e variação em mostos de cana-de-açúcar (Amorim, 2005) **<LQ: Abaixo do limite de detecção de 0,002 Kg/m³

Sabe-se que a concentração adequada de nutrientes como N, P, K, Mg, Mn, Zn são necessários para o bom desenvolvimento do processo fermentativo, afetando diretamente na multiplicação celular (Camili e Cabello, 2007). Conforme evidencia a Tabela 04, as concentrações de nutrientes presentes nos mostos de cana e de cana energia são bastante diferentes. Os resultados indicam que o caldo da cana energia (Vertix9) apresentou baixas concentrações de Fósforo, Zinco, Manganês e Cobre,

sendo que a suplementação nutricional realizada pode ter contribuído para o desempenho das leveduras. Concentrações elevadas destes nutrientes no mosto tem efeito negativo no processo uma vez que uma alta concentração de nutrientes pode ser tóxica às atividades da membrana plasmática das células e baixas concentrações podem reduzir a eficiência fermentativa (Silva et al., 2016).

4.5 Monitoramento microbiológico de leveduras

Os resultados obtidos para viabilidade celular, índice de brotamentos e viabilidade dos brotos, estão apresentados na Tabela 05. Da sua análise observa-se que não houve estatisticamente diferenças significativas para viabilidade celular quando se comparou as matérias-primas utilizadas no preparo dos mostos, assim como tempos de fermentação e interações estudadas. Verifica-se ainda que a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* (PE-02) quando foi inoculada isoladamente apresentou menor média de viabilidade celular. A manutenção da concentração de células viáveis no ambiente fermentativo é fundamental quando se objetiva altas eficiências e rendimentos. Neste sentido, é necessário o acompanhamento do número de células, de brotos vivos e as suas viabilidades ao longo da fermentação (Ribeiro et al., 2019).

A análise dos índices de brotamento (Tabela 05), indicam que em mostos preparados a partir de cana energia houve maior brotamento das células, sendo estas diferenças significativas a 1% de probabilidade. Quando se avalia este parâmetro para as combinações de microrganismos, tem-se que os tratamentos com mix de leveduras não apresentaram diferenças estatísticas entre si. Entretanto, verifica-se maiores valores do que os obtidos para *S. cerevisiae* isoladamente e menores valores que os observados para os tratamentos em que se inoculou *P. kudriavzevii*.

Sob condições fermentativas favoráveis, pH de 3,5 a *P. kudriavzevii* apresentou brotamentos em índices elevados, confirmando que a adequação do mosto é imprescindível para o desenvolvimento do microrganismo fermentador, (Figura 04). Cabe destacar que os maiores valores significativos para brotamento de células foram obtidos exatamente quando as leveduras metabolizaram mosto preparados de caldo de cana energia suplementado com nutrientes.

Tabela 05. Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para viabilidade celular, índice de brotamentos e viabilidade dos brotos. Jaboticabal-SP, safra 2019/2020.

Causas de variação	Viabilidade celular (%)	Brotamentos (%)	Viabilidade dos brotos (%)
Matéria-prima (TP)			
Cana energia	89,513a	22,838a	91,128a
Cana-de-açúcar	87,993a	14,550b	84,158a
Teste F	1,40 ^{ns}	33,51 ^{**}	2,65 ^{ns}
DMS	3,564	3,975	11,883
C.V	5,010	26,530	16,916
Microrganismo (TS)			
<i>Pichia kudriavzevii</i> (P)	90,681a	29,200a	91,788a
<i>S. cerevisiae</i> (S)	83,406b	8,822c	71,609b
P+S 32 C / pH 4.5	90,867a	18,018b	92,235a
P+S 37 C / pH 3.5	90,060a	18,736b	94,938a
Teste F	9,59 ^{**}	54,01 ^{**}	6,39 ^{**}
DMS	4,856	4,76	17,907
C.V	4,514	21,009	16,857
Tempo (TT)			
0 hrs	88,432a	20,772a	85,906a
15 hrs	89,075a	16,616b	89,379a
Teste F	0,39 ^{ns}	11,62 ^{**}	0,55 ^{ns}
DMS	2,175	2,585	9,892
C.V	4,004	22,600	18,444
Interação			
Inter. TP x TS	1,05 ^{ns}	2,88 ^{ns}	0,12 ^{ns}
Inter. TP x TT	0,71 ^{ns}	30,25 ^{**}	0,77 ^{ns}
Inter. TS x TT	1,44 ^{ns}	23,09 ^{**}	6,26 ^{**}
Inter. TP x TS x TT	0,36 ^{ns}	1,21 ^{ns}	0,14 ^{ns}

^{**}significativo ao nível de 1% de probabilidade (p<0,01). As médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey. D.M.S = desvio mínimo significativo. C.V = coeficiente de variação. Inter. TPxTS – Interação entre matéria-prima e combinações de microrganismos. Inter. TPxTT – Interação entre matérias-primas e tempos. Inter. TSxTT – Interação entre combinações de microrganismos e tempos. Inter. TPxTSxTT – interação entre matérias-primas, combinações de microrganismos e tempos. P+S 32°C / pH 4.5: *Pichia kudriavzevii* + *Saccharomyces cerevisiae* a 32°C e pH 4,5; P+S 37°C / pH 3.5: *Pichia kudriavzevii* + *Saccharomyces cerevisiae* a 37°C e pH 3,5; PK pH 3.5: *Pichia kudriavzevii* a 37°C e pH 3,5; SC pH 4.5: *Saccharomyces cerevisiae* a 32°C e pH 4,5.

Para fermentações com altas taxas de rendimento exige-se uma viabilidade inicial mínima de 85% das células (Alcarde, 2014; Amorim, 2005). As leveduras utilizadas neste estudo estavam dentro do padrão fixado pelo setor sucroenergético, com médias de viabilidade celular acima de 90%, exceto para *S. cerevisiae*, que apresentou uma média de 83, 41% de viabilidade celular. Freita et al. (2017) determinou 95,57% de viabilidade celular para *S. cerevisiae* no início de fermentações de mostos tratados com floculante natural e comercial, finalizando com 92,81% de viabilidade celular.

Utilizando *S. cerevisiae* para fermentações de mosto de cana-de-açúcar, Teixeira et al. (2019) determinaram 86% de viabilidade inicial das células, com índices de viabilidade celular acima de 85% em 24 horas de fermentação, resultados melhores que os observados por Montijo et al. (2014).

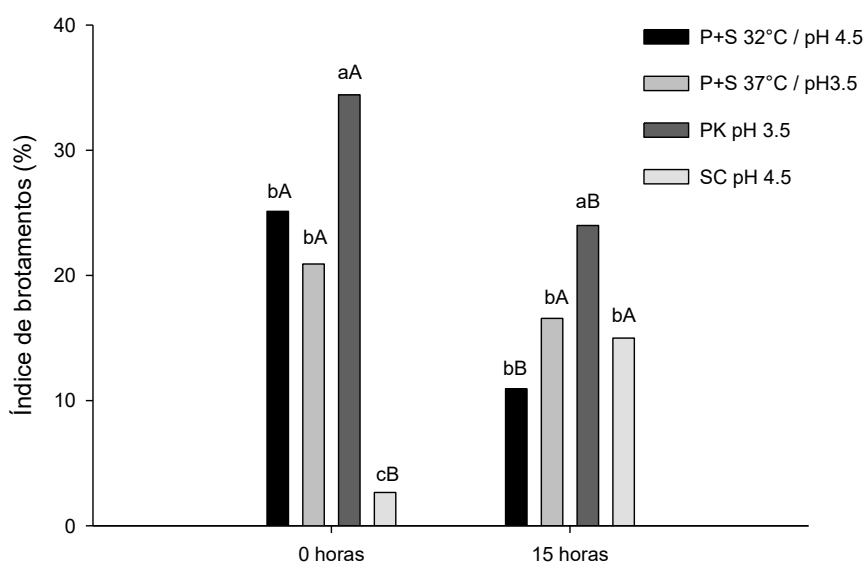


Figura 04. Desdobramento de interações para o parâmetro índice de brotamento. Interação entre microrganismo e tempo; letras minúsculas comparam microrganismo dentro de cada tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada microrganismo. P+S 32°C/pH 4.5: *Pichia kudriavzevii* + *Saccharomyces cerevisiae* à 32°C e pH 4,5; P+S 37°C/pH 3.5: *Pichia kudriavzevii* + *Saccharomyces cerevisiae* à 37°C e pH 3,5; PK pH 3.5: *Pichia kudriavzevii* à 37°C e pH 3,5; SC pH 4.5: *Saccharomyces cerevisiae* à 32°C e pH 4,5.

Ceccato-Antonini et al. (2017) determinaram viabilidade celular inicial de 98,91% para *S. cerevisiae* em fermentações de mostos de cana energia, e uma

viabilidade média de 99,7% em mostos preparados a partir de caldo de cana-de-açúcar (RB867515), apresentando após 24 horas de fermentação, viabilidades celulares de 99,7% e 98,07% para a levedura em mostos de cana energia e cana-de-açúcar respectivamente. Freita (2017) determinou 89% de viabilidade celular para *P. kudriavzevii*, enquanto Santos (2012) relatou viabilidade de 60% em seu estudo. Tralli (2019) determinou viabilidades de 95,04% e 96,41%, para esta levedura em mosto sintético de glicose e xilose e em licor hemicelulósico respectivamente, resultados que corroboram com os deste trabalho.

Quando se analisa a viabilidade dos brotos (Tabela 05), verifica-se que não houve diferença estatística significativa para as matérias-primas utilizadas, mix de microrganismos e tempos de fermentação avaliados. Embora, a cepa de *S. cerevisiae* tenha as menores médias, diferindo significativamente dos demais tratamentos estudados, conforme mostra a Figura 05, que apresenta o desdobramento destas interações.

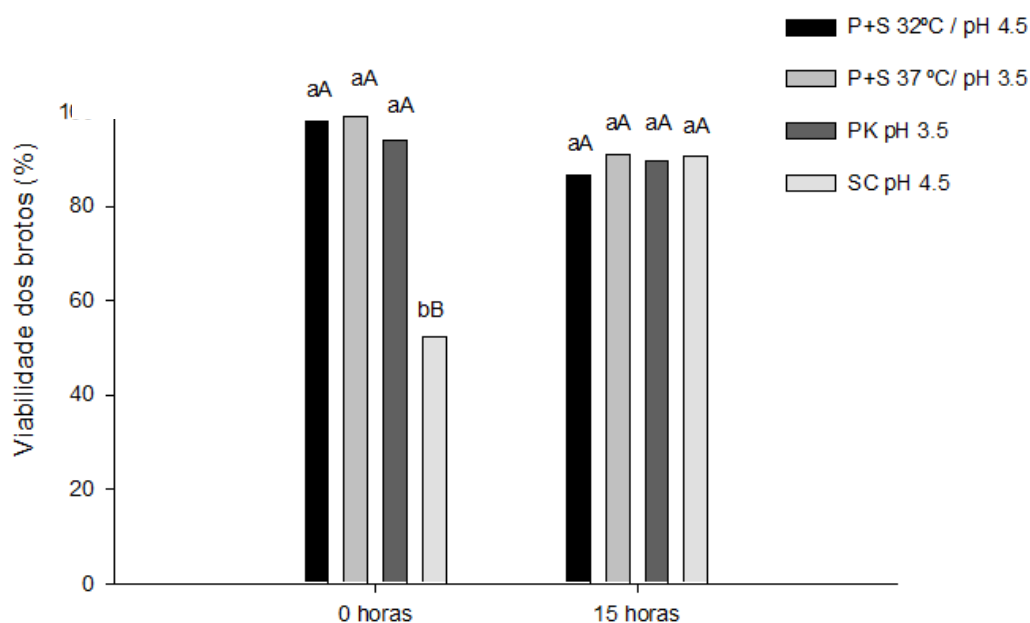


Figura 05. Desdobramento de interações para o parâmetro viabilidade dos brotos. Interação entre microrganismo e tempo; letras minúsculas comparam microrganismo dentro de cada tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada microrganismo. P+S 32°C/pH 4,5: *Pichia kudriavzevii* + *Saccharomyces cerevisiae* à 32°C e pH 4,5; P+S 37°C/pH 3,5: *Pichia kudriavzevii* + *Saccharomyces cerevisiae* à 37°C e pH 3,5; PK pH 3,5: *Pichia kudriavzevii* à 37°C e pH 3,5; SC pH 4,5: *Saccharomyces cerevisiae* à 32°C e pH 4,5.

Os resultados obtidos para o desdobramento da interação entre matéria-prima e tempo estão na Tabela 06. Da sua análise verifica-se que para as matérias-primas utilizadas, apenas *S. cerevisiae* apresentou menor média significativa no tempo de 15 horas de fermentação, com um índice de brotamento de 9,118%.

Tabela 06. Desdobramento de interações entre matéria-prima e tempo para o parâmetro índice de brotamentos. Jaboticabal-SP, safra 2019/2020.

Índice de Brotamentos	0 horas	15 horas
Cana Energia	21,562 aA	24,113 aA
Cana-de-açúcar	19,982 aA	9,118 bB

Letras minúsculas comparam os tempos dentro de cada matéria-prima e letras maiúsculas comparam as matérias-primas dentro de cada tempo. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença na coluna e letras minúsculas diferentes indicam diferença na linha

Os resultados para análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para concentração celular estão na Tabela 07. A análise dos dados evidencia que houve diferenças significativas entre os tratamentos estudados, com interações também significativas.

Os desdobramentos para as interações referentes à concentração celular estão apresentados através das Figuras 06 e 07 e na Tabela 08. De modo semelhante verifica-se que a matéria-prima teve efeito significativo sobre a concentração de células, com resultados significativos ao nível de 1% de probabilidade. mostrando que o mosto de cana energia suplementado com nutrientes, favoreceu a multiplicação celular, resultando em incrementos de 19,51% em relação aos mostos de cana-de-açúcar sem suplementação (Figura 06).

Considerando-se o efeito do tempo dentro das diferentes combinações de microrganismos estudados (Figura 07), observou-se uma diferença significativa entre as médias de todas as combinações. Os tratamentos com mix de leveduras sob pH 4,5 apresentaram os maiores valores médios para crescimento celular.

A combinação constituída de *P. kudriavzevii* + *S. cerevisiae* a 32°C e pH 4,5, cresceu 3,9% mais nas condições avaliadas do que a 37°C e pH 3,5, evidenciando que sob condições ótimas a *S. cerevisiae*, intensifica o crescimento celular. Analisando o crescimento das cepas inoculadas isoladamente, sob condições ideais

de pH e temperatura, os resultados mostram um crescimento celular 4% maior para *S. cerevisiae* em relação à *P. kudriavzevii*.

Tabela 07. Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para o parâmetro concentração celular (g.L⁻¹). Jaboticabal-SP, safra 2019/2020.

Causas de variação	Concentração Celular (g.L ⁻¹)
Matéria-prima (TP)	
Cana energia	49,346a
Cana-de-açúcar	41,541b
Teste F	179,94**
DMS	1,233
C.V	13,306
Microrganismo (TS)	
<i>P. kudriavzevii</i>	44,685c
<i>S. cerevisiae</i>	42,896d
P+S 32 C / pH 4.5	48,038a
P+S 37 C / pH 3.5	46,154b
Teste F	69,61**
DMS	0,985
C.V	5,985
Tempo (TT)	
0 horas	24,027e
3 horas	41,313d
6 horas	47,318c
9 horas	51,098b
12 horas	54,067a
15 horas	54,836a
Teste F	1149,72**
DMS	1,3881
C.V	6,3926
Interação	
Inter. TP x TS	8,56**
Inter. TP x TT	47,96**
Inter. TS x TT	9,28**
Inter. TP x TS x TT	4,92**

**significativo ao nível de 1% de probabilidade (p<0,01). As médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey. D.M.S = desvio mínimo significativo. C.V = coeficiente de variação. Inter. TPxTS – Interação entre matéria-prima e combinações de microrganismos. Inter. TPxTT – Interação entre matérias-primas e tempos. Inter. TSxTT – Interação entre combinações de microrganismos e tempos. Inter. TPxTSxTT – interação entre matérias-primas, combinações de microrganismos e tempos. P+S 32°C / pH 4.5: *Pichia kudriavzevii* + *Saccharomyces cerevisiae* a 32°C e pH 4,5; P+S 37°C / pH 3.5: *Pichia kudriavzevii* + *Saccharomyces cerevisiae* a 37°C e pH 3,5; PK pH 3.5: *Pichia kudriavzevii* a 37°C e pH 3,5; SC pH 4.5: *Saccharomyces cerevisiae* a 32°C e pH 4,5.

Através da Tabela 08 observa-se os desdobramentos para as interações entre os tratamentos estudados. Todos apresentaram diferença significativa ao nível de 1% de sensibilidade. Observou-se um maior crescimento na combinação constituída de *P. kudriavzevii.* + *S. cerevisiae* a 32°C e pH 4,5, utilizando-se mosto de cana energia suplementado com nutrientes e menor multiplicação celular, para as duas cepas de leveduras isoladas e em suas melhores condições, mostrando que o uso de culturas puras desfavorece a produção de biomassa celular e em compensação provavelmente intensifica a conversão de açúcares em metabólitos extracelulares.

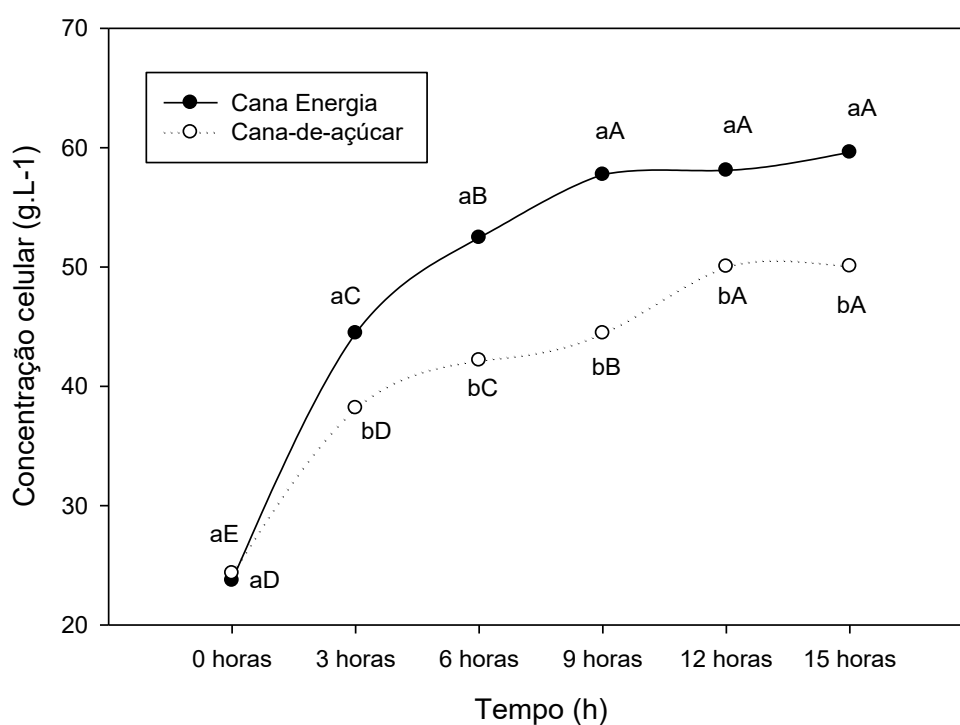


Figura 06. Desdobramento de interação para o parâmetro Concentração celular. Interação entre matéria-prima e tempo; letras minúsculas comparam microrganismo dentro de cada tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada microrganismo.

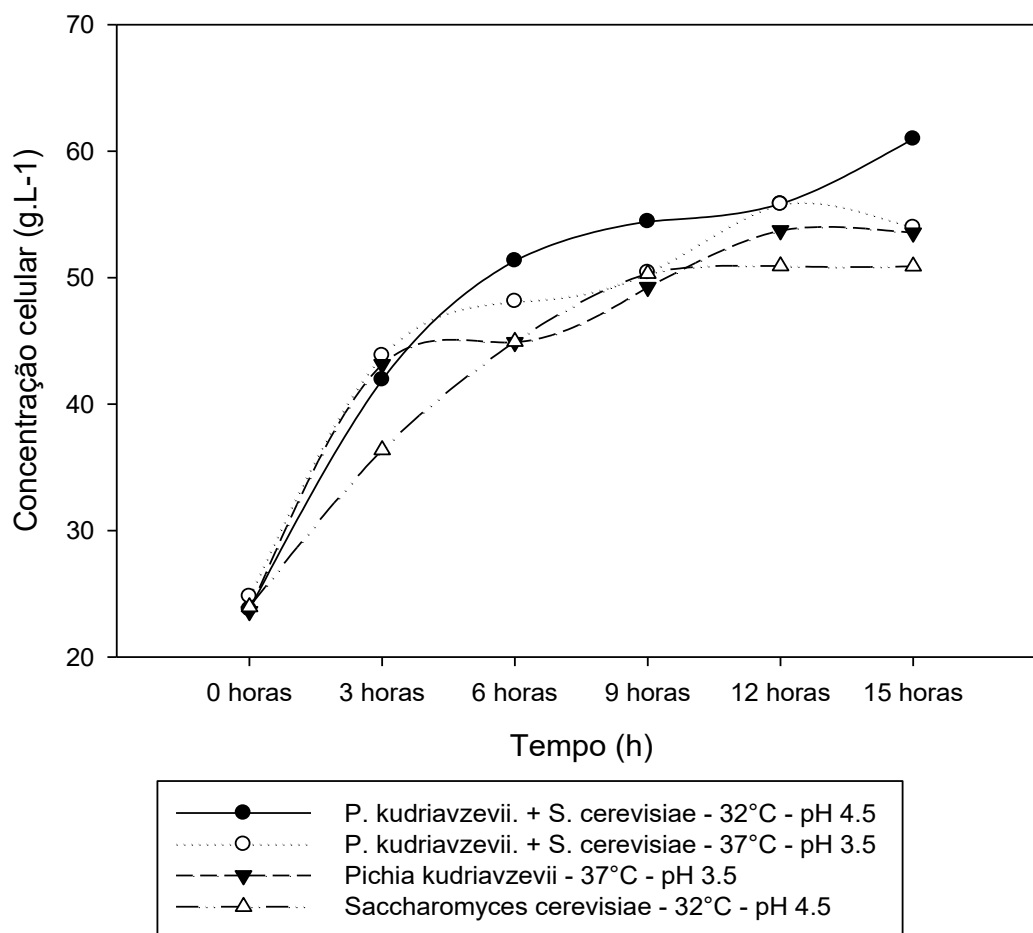


Figura 07. Desdobramento de interação para o parâmetro Concentração celular. Interação entre combinação de microrganismos e tempo. Jaboticabal-SP, safra 2019/2020.

Tabela 08. Desdobramento da interação entre matéria-prima e esquema fermentativo de microrganismos para a concentração celular (g.L^{-1}).

Concentração celular	<i>P. kudriavzevii</i> + <i>S. cerevisiae</i> 32°C – pH 4.5	<i>P. kudriavzevii</i> + <i>S. cerevisiae</i> 37°C – pH 3.5	<i>P. kudriavzevii</i> - 37°C – pH 3.5	<i>S. cerevisiae</i> - 32°C – pH 4.5
Cana Energia	51,781aA	49,329aB	49,668aB	46,604aC
Cana-de-açúcar	44,296bA	42,978bA	39,702bB	39,187bB

Letras minúsculas comparam as matérias-primas dentro de cada combinação de microrganismo e letras maiúsculas comparam as combinações de microrganismos dentro de cada matéria-prima. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença na coluna e letras minúsculas diferentes indicam diferença na linha.

4.6 Caracterização do vinho

As análises de variância para os resultados observados para concentração de Açúcares Redutores Residuais Totais (ARRT), glicerol e etanol, estão na Tabela 09 e os desdobramentos para as interações nas Figuras 08, 09 e 10.

Analisando-se a caracterização dos vinhos verifica-se interação significativa para os tratamentos avaliados, com maior teor de açúcar residual nos vinhos originados de fermentação do mosto produzido de cana-de-açúcar. Provavelmente como consequência do maior teor de açúcares presente, os quais não foram metabolizados no período de fermentação avaliado (15 horas). Thammasittirong et al. (2017), observaram uma redução mais significativa dos açúcares do mosto com fermentações de 72 horas a 37°C e pH 5, utilizando a cepa ND48 de *S. cerevisiae* em caldos de 4 genótipos de cana energia desenvolvidos na Tailândia e uma variedade comercial local de cana-de-açúcar (LK92-11).

Considerando-se os microrganismos, tem-se que apenas *S. cerevisiae* (PE-02) apresentaram valores significativos superiores de açúcares residuais, com um teor de ARRT dez vezes maior que as demais combinações de microrganismos. De forma similar, a combinação de microrganismo P+S 32°C/pH 4,5 mostrou um teor seis vezes maior que os tratamentos com cana energia, não diferindo significativamente da cepa de *S. cerevisiae*, indicando um menor consumo de açúcares nas 15 horas de fermentação por esse microrganismo em suas condições ideais de pH e temperatura.

Tabela 09. Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para teores de ARRT, Glicerol, e Etanol nos vinhos e Eficiência Fermentativa.

Causas de variação	ARRT (%)	Glicerol (%) m/v	Etanol (%)	Eficiência fermentativa (%)
Matéria-prima (TP)				
Cana Energia	0,034b	15,473a	6,869b	85.241a
Cana-de-açúcar	0,277a	14,896b	8,103a	84.879a
Teste F	13,03*	8,95*	166,80**	0.28 ^{ns}
DMS	0,187	0,536	0,265	3.142
C.V	10,56	3,113	3,124	1.965
Microrganismo (TS)				
<i>P. kudriavzevii</i>	0,035b	10,970d	7,7408a	89.517a
<i>S. cerevisiae</i>	0,360a	20,262a	7,565a	84.807b
P+S 32 C / pH 4.5	0,197ab	15,381b	7,198b	79.835c
P+S 37 C / pH 3.5	0,030b	14,125c	7,441ab	86.082b
Teste F	5,66*	1044,11**	9,61**	60.21**
DMS	0,277	0,502	0,309	2.844
CV	10,354	1,927	2,407	1.489
Interação				
Inter. TP x TS	5,58*	181,21**	14,98**	47.17**

**significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,05$). As médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey. D.M.S = desvio mínimo significativo. C.V = coeficiente de variação. Inter. TPxTS – Interação entre matéria-prima e combinações de microrganismos. Inter. TPxTT – Interação entre matérias-primas e tempos. Inter. TSxTT – Interação entre combinações de microrganismos e tempos. Inter. TPxTSxTT – interação entre matérias-primas, combinações de microrganismos e tempos.

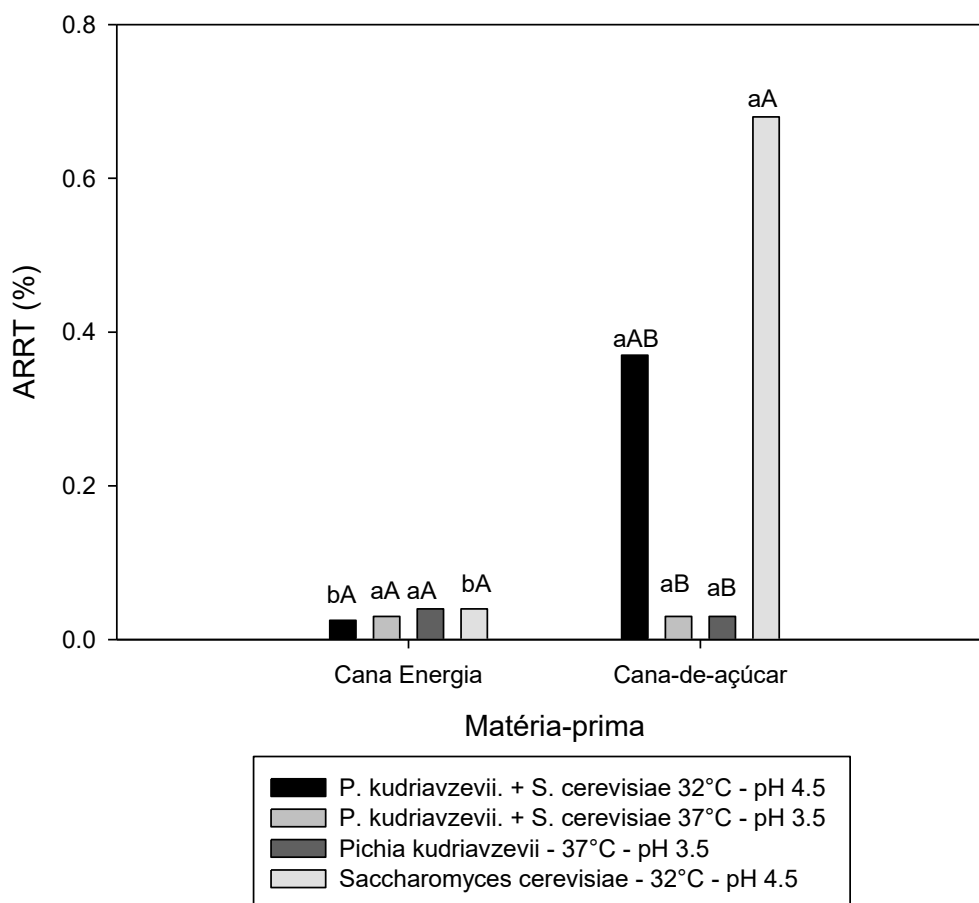


Figura 08. Desdobramento de interações para o parâmetro ARRT. Letras minúsculas comparam as matérias-primas dentro de cada combinação de microrganismo e letras maiúsculas comparam as combinações de microrganismos dentro de cada matéria-prima.

Para os teores de álcool produzidos (Figura 09), verifica-se que os tratamentos com mostos a partir de cana-de-açúcar produziram maiores teores de etanol, evidenciando que esta matéria-prima sem qualquer suplementação nutricional possibilita ótimo desempenho para que as leveduras possam converter os açúcares, em álcool. Avaliando-se a performance dos microrganismos, verifica-se que a produção de etanol não apresentou diferença significativa quando se compara as cepas de *S. cerevisiae* (PE-2) e *P. kudriavzevii* (LJ-03) isoladamente, sob condições ideais. Estas resultaram em produção de 7% de etanol a mais nos vinhos gerados, sendo que, quando nas fermentações com o mix das leveduras, o teor alcoólico foi 4,58% menor. Resultados similares foram obtidos por Thammasittirong et al. (2017),

estudando fermentações com mostos produzidos de cana-de-açúcar e cana energia, sendo que os vinhos originados de fermentações de mosto de cana energia apresentaram redução no teor alcoólico da ordem de 15,22%, comparados à cana-de-açúcar.

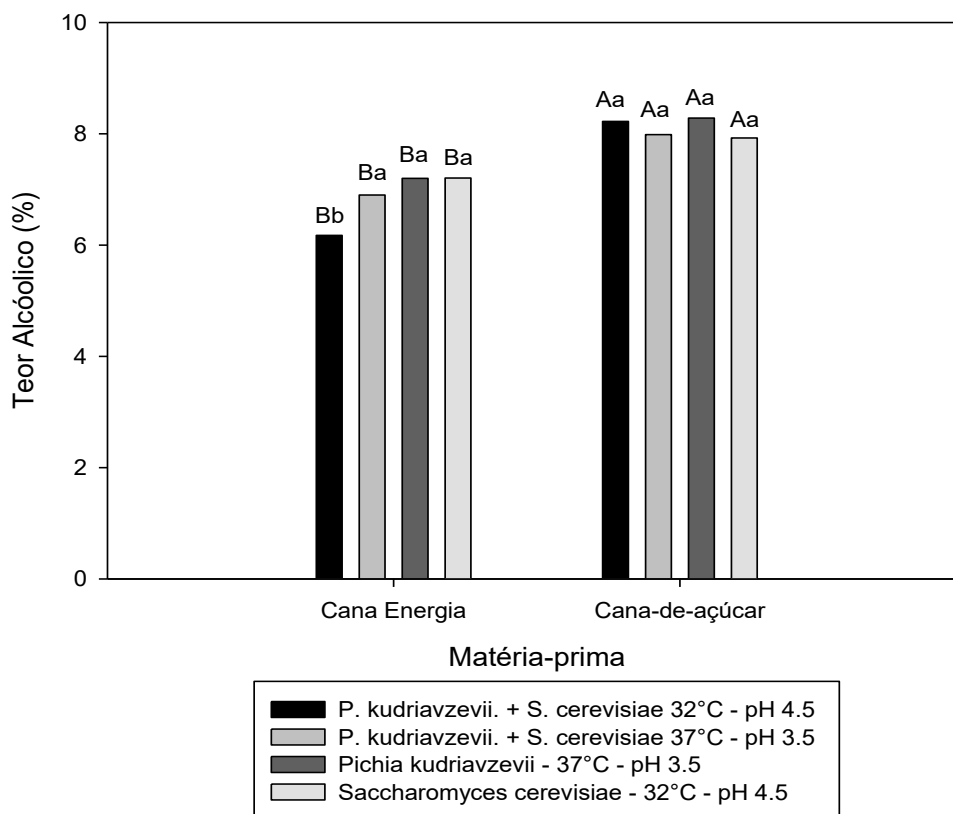


Figura 09. Desdobramento de interações para o parâmetro Teor alcoólico. Letras minúsculas comparam as matérias-primas dentro de cada combinação de microrganismo e letras maiúsculas comparam as combinações de microrganismos dentro de cada matéria-prima.

O glicerol é uma substância produzida durante a fermentação alcoólica, e o substrato para a sua produção também vêm de fontes complexas de carbono como o etanol. Dessa forma, a produção de glicerol não é desejada quando se deseja a produção de etanol.

Os teores de glicerol no vinho (Figura 10) evidenciam uma melhor performance fermentativa para os tratamentos com o microrganismo *P. kudriavzevii* (LJ-03) fermentando em suas condições ideais mostos preparados a partir de cana energia e cana-de-açúcar, e uma maior produção de glicerol para tratamentos com *S. cerevisiae* (PE-2) em cana-de-açúcar.

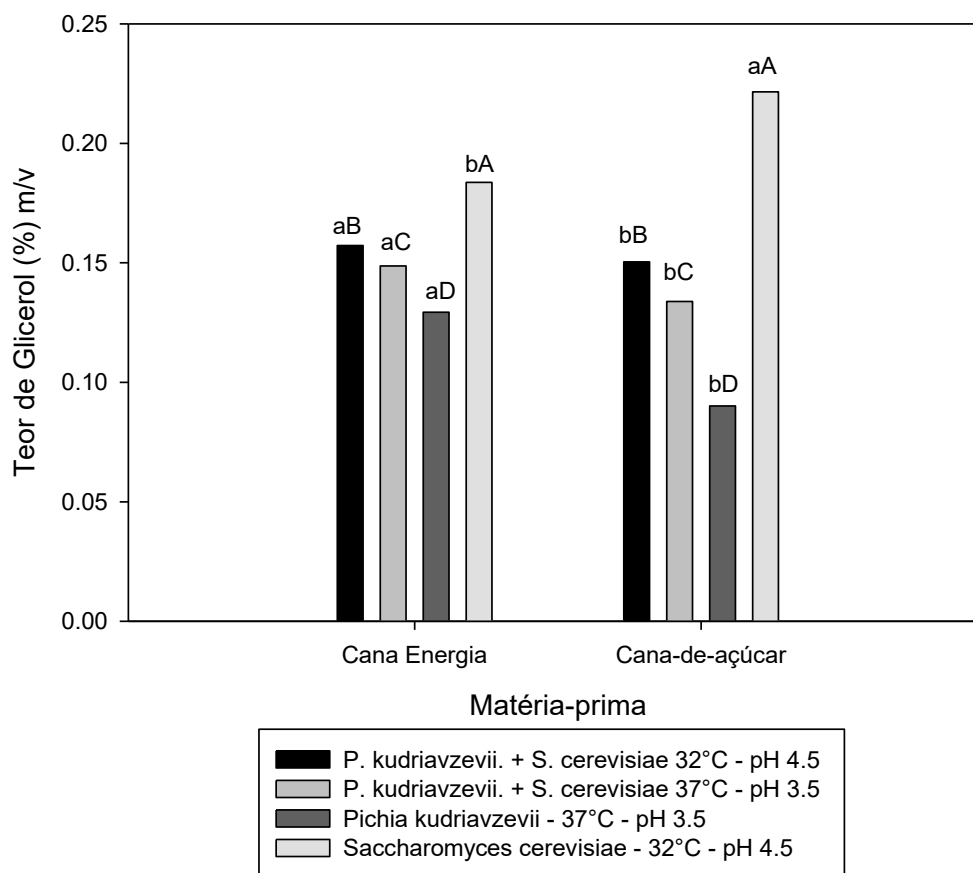


Figura 10. Desdobramento de interações para o parâmetro Teor de glicerol. Letras minúsculas comparam as matérias-primas dentro de cada combinação de microrganismo e letras maiúsculas comparam as combinações de microrganismos dentro de cada matéria-prima.

Silva et al. (2017) determinaram teores de glicerol de 0,33 a 0,63 % m/v, valores considerados baixos quando resultantes de fermentações industriais. Os teores quantificados por estes autores são superiores aos observados nesse estudo, sendo a maior quantidade de glicerol produzida a partir de mostos preparados de cana-de-açúcar fermentados com *S. cerevisiae* a 32°C e pH 4,5. Os valores observados para *P. kudriavzevii* indicam que a levedura produziu menos glicerol a 37°C e pH 3,5. Para as matérias-primas, a avaliação estatística mostrou que os mostos preparados a partir de cana energia apresentaram maiores teores de glicerol que os de cana-de-açúcar.

4.7 Eficiência fermentativa

Os resultados obtidos para cálculos de eficiências fermentativas estão na Figura 11. Da sua análise verifica-se que não houve diferença significativa entre as médias observadas para as matérias-primas, mostrando que, estatisticamente não houve diferença entre os mostos preparados a partir de cana energia suplementada com nutrientes e mostos preparados a partir de caldo de cana-de-açúcar.

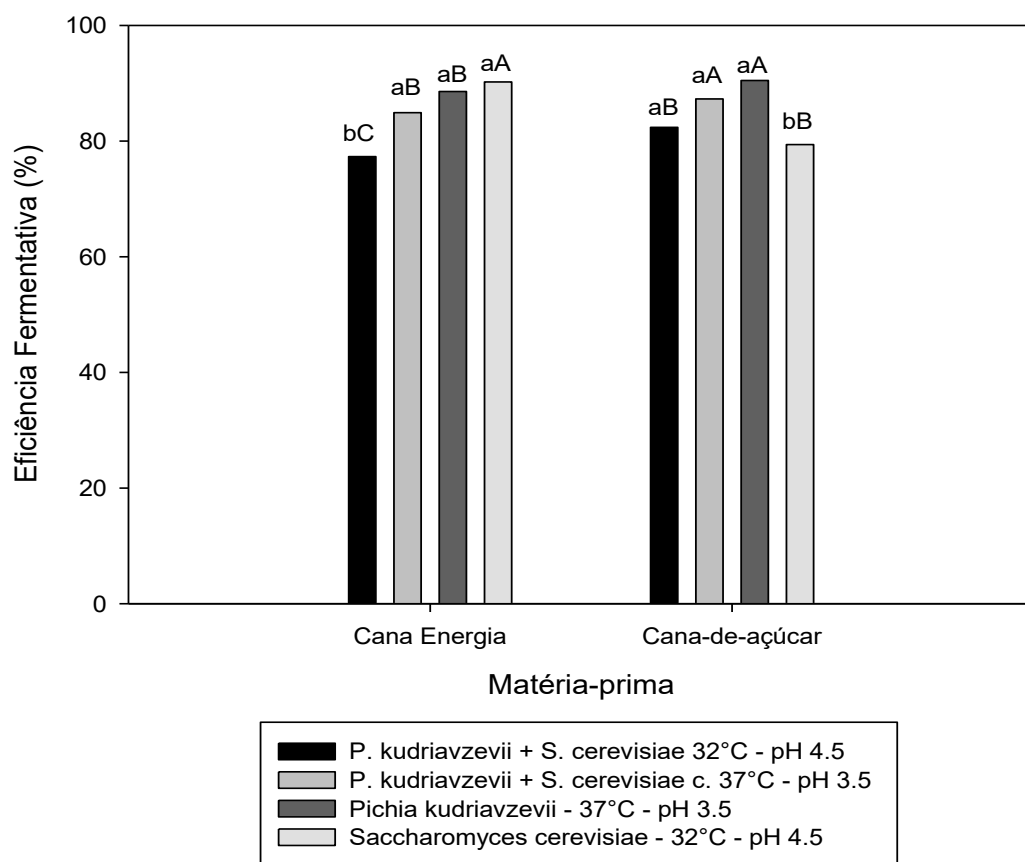


Figura 11. Desdobramento de interações para o parâmetro Eficiência Fermentativa. Letras minúsculas comparam as matérias-primas dentro de cada combinação de microrganismo e letras maiúsculas comparam as combinações de microrganismos dentro de cada matéria-prima.

Da análise geral dos ensaios verifica-se boas performances fermentativas, com melhores valores de eficiência fermentativa de 89,52% para fermentações com *P. kudriavzevii* sob pH 3,5 a 37°C. Quando se estudou *S. cerevisiae* sob pH 4,5 a 32°C os valores médios foram da ordem de 84,8%. Silva et al. (2017), obtiveram eficiências

fermentativas de 89,13% - 93,37% estudando fermentações industriais realizadas com *S. cerevisiae* puras e com a presença de outras leveduras, utilizando mostos preparados a partir de cana-de-açúcar. Verificaram queda na eficiência fermentativa quando há consórcio de leveduras associadas nas dornas, resultados semelhantemente ao observado neste estudo.

As fermentações que apresentaram melhores eficiências fermentativas foram as que se desenvolveram a 37°C e pH 3,5 com *P. kudriavzevii* em mostos preparados a partir de cana-de-açúcar (90,48%). O melhor desempenho fermentativo para a levedura *S. cerevisiae* foi o determinado em mostos preparados a partir de cana energia, com eficiência fermentativa de 90,21%, performance 13,61% melhor que a determinada para *S. cerevisiae* em mostos de cana-de-açúcar.

Os resultados obtidos demonstraram que se pode alcançar maiores eficiências fermentativas, com o uso de microrganismos adequados, sob condições mais eficientes de fermentação com pH 3,5 e temperatura de 37°C. Aliando-se estas condições a mostos com adequados teores de nutrientes, pode-se elevar a produção de etanol e reduzir a produção de glicerol nas dornas, contribuindo para melhoria do processo industrial.

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 (Vertex9, 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 Agronômica & AgroEstat – Sistema para Análises Estatísticas de Ensaios Agronômicos. 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.

Marengo 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, Kgatla 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 Agrônomo, 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.