



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

TATIANE OLIVEIRA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS RELACIONADOS
AO PERFIL DE AMINOÁCIDOS E VITAMINAS EM DIFERENTES
VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR UTILIZANDO *Saccharomyces
cerevisiae* PE-2**

Goiânia – GO

2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Tatiane Oliveira dos Santos

3. Título do trabalho

Avaliação dos parâmetros fermentativos relacionados ao perfil de aminoácidos e vitaminas em diferentes variedades de cana-de-açúcar utilizando *Saccharomyces cerevisiae* PE-2

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Gabriel Luis Castiglioni, Professor do Magistério Superior**, em 15/04/2024, às 08:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tatiane Oliveira Dos Santos, Discente**, em 15/04/2024, às 16:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4506369** e o código CRC **A4EA6BE2**.

Referência: Processo nº 23070.016184/2024-87

SEI nº 4506369

TATIANE OLIVEIRA DOS SANTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS RELACIONADOS
AO PERFIL DE AMINOÁCIDOS E VITAMINAS EM DIFERENTES
VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR UTILIZANDO *Saccharomyces
cerevisiae* PE-2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de mestre em Engenharia Química.

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos

Linha de Pesquisa: Processos Químicos e Biotecnológicos

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Luis Castiglioni

Co-orientador: Prof. Dr. Francielo Vendruscolo

Goiânia – GO

2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Santos, Tatiane Oliveira dos

Avaliação dos parâmetros fermentativos relacionados ao perfil de aminoácidos e vitaminas em diferentes variedades de cana-de-açúcar utilizando *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 [manuscrito] / Tatiane Oliveira dos Santos. - 2024.

83 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Luis Castiglioni; co-orientador Dr. Franciello Vendruscolo.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química (IQ), Engenharia Química, Goiânia, 2024.

Bibliografia.

Inclui siglas, fotografias, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Fermentação alcoólica. 2. Etanol. 3. HPLC. 4. Análise de aminoácidos. 5. Produção de vitaminas. I. Castiglioni, Gabriel Luis, orient. II. Título.

CDU 66.0



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

ATA IQ 64/2024

Ata nº 64 da sessão da Defesa de Mestrado de **Tatiane Oliveira dos Santos**, que confere o título de **Mestra em Química**, na área de concentração em **Química**.

Aos **22 (vinte e dois) dias do mês de março de 2024 (dois mil e vinte e quatro)**, a partir das **14h00m**, no **miniauditório 3 do PPGEQ do IQ II**, realizou-se a sessão pública da Defesa de Mestrado intitulada **"Quantificação de aminoácidos e vitaminas em cultivares cana-de-açúcar e determinação de parâmetros fermentativos na produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* PE-2"**. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, **Prof. Dr. Gabriel Luis Castiglioni (UFG)**, com a participação dos demais membros da Banca Examinadora **Prof^ª. Dr^ª. Inti Doraci Cavalcanti Montano (UFG) e Prof^ª. Dr^ª. Fabrícia Paula de Faria (UFG)**. Durante a arguição da banca foi sugerida a modificação do título do trabalho para **"Avaliação dos parâmetros fermentativos relacionados ao perfil de aminoácidos e vitaminas em diferentes variedades de cana-de-açúcar utilizando *Saccharomyces cerevisiae* PE-2"**. A sugestão foi acatada e a Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Defesa de Mestrado, tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Prof. Dr. Gabriel Luis Castiglioni, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos 22 (vinte e dois) dias do mês de março de 2024 (dois mil e vinte e quatro).



Documento assinado eletronicamente por **Gabriel Luis Castiglioni, Professor do Magistério Superior**, em 24/03/2024, às 15:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Inti Doraci Cavalcanti Montano, Professora do Magistério Superior**, em 25/03/2024, às 10:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabrícia Paula De Faria, Professor do Magistério Superior**, em 25/03/2024, às 14:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4469417** e o código CRC **BA6A6A5F**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e Nossa Senhora pelo sereno apoio nos momentos em que pensei em desistir, me concedendo coragem, resiliência e sabedoria.

Agradeço profundamente à minha mãe Lucilene pelo seu amparo, sempre me incentivando com conselhos esperançosos e ao meu pai Valdivino por acreditar e me oferecer apoio.

À minha irmã Júlia e a toda minha família pelo incentivo.

A todos os meus amigos que estiveram presente nos dias difíceis e pelos momentos agradáveis compartilhados durante esse período, especialmente Blendo, Giovanna, Nathalia, Kayro e Débora.

À Ana Elisa por todo carinho e paciência.

Agradeço à Me. Kamylla de Paula por ter me auxiliado com conhecimentos práticos que foram indispensáveis para o desenvolvimento de partes deste trabalho.

Ao meu orientador Professor Dr. Gabriel pela orientação, paciência, compreensão e por ter acreditado no meu trabalho no momento mais crítico da pesquisa.

Ao meu coorientador Professor Dr. Francielo pelas contribuições.

À coordenadora do PPGEQ/UFG, Professora Dra. Fernanda pelo auxílio em diversos momentos.

Aos técnicos Anna Paula, Deivis, Jussara e Taís por todo suporte durante os dias de pesquisa no laboratório.

A UFG pela estrutura e a CAPES pelo auxílio financeiro.

Enfim, agradeço a todos que passaram, permaneceram e aos que chegaram na minha vida durante esse período e que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse aqui.

Lavoisier explicou melhor

A percibibilidade das coisas e dos entes. Mas a percibibilidade das coisas existentes, sendo substituída por outras percíveis que são substituídas pela percibibilidade de outras – a essa constância se pode, querendo, chamar de percibibilidade eterna: que é a eternidade ao alcance de nós. Mas Lavoisier explicou melhor.

(Clarice Lispector)

RESUMO

A cultura da cana-de-açúcar é uma das principais atividades econômicas do Brasil, sendo a matéria prima majoritária na fabricação de etanol, uma alternativa aos combustíveis fósseis para a descarbonização do setor de transportes. Apesar do processo produtivo já ser bem elucidado, há inúmeras possibilidades de otimização da produção de etanol. Visto que quase a totalidade da produção de etanol é feita pela fermentação da cana-de-açúcar, e que as leveduras têm requisitos nutricionais específicos, é de grande utilidade o conhecimento da composição química do caldo da cana para se obter a maior eficiência de conversão dos açúcares em etanol. Portanto, esse trabalho teve o objetivo de caracterizar o mosto obtido de cinco cultivares de cana-de-açúcar quanto aos açúcares, aminoácidos livres e vitaminas. Foram realizados ensaios fermentativos com os mostos de cada cultivar separadamente. A fermentação iniciou-se com 130 g.L^{-1} de açúcares totais (sacarose, glicose e frutose), e duração de 72h, utilizando a linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. A composição química dos mostos foi determinada com relação aos açúcares, aminoácidos e vitaminas, antes e depois da fermentação por HPLC. Os parâmetros fermentativos de fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{x/s}$), fator de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$), produtividade (ϕ) e eficiência da fermentação (η) foram calculados e submetidos a análise de variância de fator único (ANOVA) e teste de Tukey, ambos ao nível de significância estatística de 5%. Todas as cultivares mostraram boa eficiência de fermentação alcoólica: 86,6% (RB867515), 88,2% (RB044108), 92,6% (RB988082), 93,5% (RB034045) e 97,4% (RB074067). Observou-se diferença estatística entre a maioria dos parâmetros fermentativos, com destaque para a cultivar RB074067 com maior produção de etanol e menor produção de metabólitos secundários. Os aminoácidos quantificados (Ala, Arg, Gli, Glu, Met, Tre e Val) apresentaram variações de concentração entre as cultivares, assim como as vitaminas do complexo B (B1, B3, B5, B6, B7 e PABA). Observou-se o consumo total da maioria dos aminoácidos e a biossíntese de vitaminas pelas leveduras no decorrer da fermentação. Os resultados fermentativos evidenciam a cultivar RB074067 como uma variedade promissora para se conseguir um aumento da eficiência da fermentação alcoólica industrial com *S. cerevisiae* PE-2 sem custos adicionais com suplementação de nutrientes para correção da composição química do mosto.

Palavras-chave: fermentação alcoólica, etanol, produção de vitaminas, HPLC, quantificação de aminoácidos, quantificação de vitaminas, glicerol, ácido acético

ABSTRACT

The sugarcane culture is one of Brazil's main economic activities, being the predominant raw material in bioethanol production, an alternative to fossil fuels for decarbonizing the transportation sector. Although the production process is well elucidated, there are numerous possibilities for optimizing ethanol production. Since almost all ethanol production is done through the fermentation of sugarcane, and yeast have specific nutritional requirements, knowledge of the chemical composition of sugarcane juice is of great importance for achieving the highest efficiency in converting sugars into ethanol. Therefore, this study aimed to characterize the wort obtained from five sugarcane cultivars in terms of sugars, free amino acids, and vitamins. Fermentation assays were performed with the worts of each cultivar separately. Fermentation started with 130 g.L⁻¹ of total sugars (sucrose, glucose, and fructose) and lasted 72 hours, using the *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 strain. The chemical composition of the worts was determined for sugars, amino acids, and vitamins, before and after fermentation by HPLC. Fermentative parameters such as substrate to biomass conversion factor ($Y_{x/s}$), substrate to product conversion factor ($Y_{p/s}$), productivity (ϕ), and fermentation efficiency (η) were calculated and subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey test, both at a statistical significance level of 5%. All cultivars showed good efficiency in alcoholic fermentation: 86.6% (RB867515), 88.2% (RB044108), 92.6% (RB988082), 93.5% (RB034045), and 97.4% (RB074067). Statistical differences were observed among most fermentative parameters, with emphasis on cultivar RB074067 with higher ethanol production and lower production of secondary metabolites. The quantified amino acids (Ala, Arg, Gli, Glu, Met, Tre, and Val) showed concentration variations among cultivars, as did B-complex vitamins (B1, B3, B5, B6, B7, and PABA). Total consumption of most amino acids and vitamin biosynthesis by yeast during fermentation were observed. The fermentation results highlight cultivar RB074067 as a promising variety for achieving increased industrial alcoholic fermentation efficiency with *S. cerevisiae* PE-2 without additional costs for nutrient supplementation to correct the wort's chemical composition.

Keywords: alcoholic fermentation, ethanol, vitamin production, HPLC, amino acid quantification, vitamin quantification, glycerol, acetic acid

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema simplificado do processo de produção de etanol por fermentação alcoólica, onde: (1) moenda; (2) decantador; (3) evaporador; (4) trocador de calor; (5) Dorna de fermentação; (6) centrífuga; (7) tanque; (8) caldeira; (9) gerador. 24
- Figura 2.** Síntese do etanol na célula de levedura. Abreviações: P – fosfato, HK – Hexoquinase, PGI – Fosfoglicomutase, PFK – Fosfofrutoquinase, FBPA - Frutose difosfato aldolase, TPI – Fosfotrioseisomerase, GAPDH – Gliceraldeído fosfato desidrogenase, PGK - Fosfogliceroquinase, PGM – Fosfogliceromutase, ENO – Enolase, PYK – Quinase pirúvica, PDC – Descarboxilase pirúvica e ADH – Desidrogenase alcoólica..... 29
- Figura 3.** Esquema ilustrativo das etapas executadas no presente trabalho. 37
- Figura 4.** Variedades de cana-de-açúcar utilizadas no presente estudo. (a) RB867515, (b) RB988082, (c) RB034045, (d) RB044108 e (e) RB074067, da esquerda para a direita.38
- Figura 5.** Caldos extraídos das 5 variedades de cana-de-açúcar estudadas..... 39
- Figura 6.** Comparativo dos resultados de concentração de etanol (A), concentração celular (B), açúcar consumido (C), concentração de glicerol (D) e concentração de ácido acético (D) das variedades RB867515 (M1), RB988082 (M2), RB034045 (M3), RB044108 (M4) e RB074067 (M5). 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Curva de calibração da cepa PE-2, onde (y) é concentração celular (g.L^{-1}) e (x) absorvância.	39
Tabela 2. Meio de cultura GPY líquido para crescimento das leveduras	40
Tabela 3. Gradiente de eluição para separação de aminoácidos, sendo % A a proporção da fase móvel mais polar e % B a proporção da fase móvel menos polar, em determinado tempo.	44
Tabela 4. Curvas de calibração dos aminoácidos, em que X é a concentração de aminoácidos em mg.L^{-1} , (Y) é a área do pico, e R^2 é o coeficiente de correlação linear.	45
Tabela 5. Gradiente de eluição para separação de vitaminas hidrossolúveis, onde % A é a proporção da fase móvel mais polar e % B é a proporção da fase móvel menos polar, em determinado tempo.	46
Tabela 6. Curvas de calibração das vitaminas, em que X é a concentração de vitaminas em mg.L^{-1} , Y é a área do pico, e R^2 é o coeficiente de correlação linear.	47
Tabela 7. Concentração de açúcares totais (somatório da concentração de sacarose, glicose e frutose) nos mostos das cultivares estudadas: RB867515 (M1), RB988082 (M2), RB034045 (M3), RB044108 (M4) e RB074067 (M5).	51
Tabela 8. Resultados das fermentações realizadas em triplicata, de produção de etanol, fator de conversão de substrato em produto (YP/S), produtividade (\emptyset), eficiência fermentativas (η), concentrações celulares, fator de conversão de substrato a células (YX/S), consumo de açúcares, concentração celular, concentração de glicerol e ácido acético das variedades RB867515 (M1), RB988082 (M2), RB034045 (M3), RB044108 (M4) e RB074067 (M5).	51
Tabela 9. Concentração de aminoácidos no mosto das cultivares RB867515 (M1), RB988082 (M2), RB034045 (M3), RB044108 (M4) e RB074067 (M5).	58
Tabela 10. Concentração de aminoácidos no mosto das variedades de cana-de-açúcar RB867515 (M1), RB988082 (M2), RB034045 (M3), RB044108 (M4) e RB074067 (M5), antes (inicial) e depois da fermentação alcoólica (final).	60
Tabela 11. Concentração total, concentração residual e consumo total de aminoácidos no mosto das variedades de cana-de-açúcar RB867515 (M1), RB988082 (M2), RB034045 (M3), RB044108 (M4) e RB074067 (M5).	63

Tabela 12. Concentração de vitaminas do complexo B quantificadas nos mostos das cultivares de cana-de-açúcar RB867515 (M1), RB988082 (M2), RB034045 (M3), RB044108 (M4) e RB074067 (M5).	65
Tabela 13. Concentrações de vitaminas do complexo B no mosto das variedades de cana-de-açúcar RB867515 (M1), RB988082 (M2), RB034045 (M3), RB044108 (M4) e RB074067 (M5), antes (inicial) e depois da fermentação alcoólica (final).	65
Tabela 14. Produção de vitaminas pela levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2, no mosto das diferentes variedades de cana-de-açúcar RB867515 (M1), RB988082 (M2), RB034045 (M3), RB044108 (M4) e RB074067 (M5).	66

SIGLAS E ABREVIACOES

ATP	Adenosina Trifosfato
BOD	Demanda Bioquímica de Oxignio (Biochemical Oxygen Demand)
$C_{12}H_{22}O_{11}$	Sacarose
C_2H_5OH	Etanol
$C_6H_{12}O_6$	Glicose
CO_2	Dióxido de Carbono
CONAB	Comissão Nacional de Abastecimento
DNA	cido desoxirribonucleico
GPY	Glucose, Peptone, Yeast extract
H^+	íon de Hidrognio
H_2O	gua
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IAA	Instituto do Açúcar e do lcool
PE-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIB	Produto Interno Bruto
PRÓALCOOL	Programa Nacional do lcool
RNA	cido ribonucleico
RIDESA	Rede Interuniversitária de Desenvolvimento do Setor Sulcrocroleiro
TCA	cido tricarbxlico
UNFCCC	Conveno-Quadro das Nao Unidas sobre Mudanças Climáticas (United Nations Framework Convention on Climate Change)

SÍMBOLOS E UNIDADES

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
°GL	Graus Gay-Lussac (mililitros de álcool em 100 mililitros de solução hidroalcólica)
°Brix	Grau Brix (gramas de açúcar em 100 gramas de solução)
H	Horas
Rpm	Rotações por minuto
mmol	Milimolar
% v/v	Porcentagem de volume em 100 mililitros de solução
% m/v	Porcentagem de massa em 100 mililitros de solução
g.L^{-1}	Gramas por litro
$\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$	Gramas por litro por hora
$\text{g}_{\text{etanol}}.\text{g}^{-1}$	Gramas de etanol por gramas de mosto fermentado
$\text{g}_{\text{biomassa}}.\text{g}^{-1}$	Gramas de biomassa por gramas de mosto fermentado
$Y_{P/S}$	Fator de conversão de substrato em produto ($\text{g}_{\text{etanol}}.\text{g}^{-1}$)
$Y_{X/S}$	Fator de conversão de substrato em células ($\text{g}_{\text{biomassa}}.\text{g}^{-1}$)
P_f	Concentração final de etanol (g.L^{-1})
P_0	Concentração inicial de etanol (g.L^{-1})
S_f	Concentração final de substrato (g.L^{-1})
S_0	Concentração inicial de substrato (g.L^{-1})
t_f	tempo total de fermentação
\emptyset	Produtividade ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
H	Eficiência fermentativa (%)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Cana-de-açúcar	16
2.1.1 Cultivares RB	18
2.2 Etanol	19
2.2.1 Características e aplicações	19
2.2.2 Contexto histórico e econômico da produção de etanol no Brasil	19
2.3 Processo produtivo.....	22
2.3.1 Extração do caldo	24
2.3.2 Preparo do mosto	25
2.3.3 Fermentação alcoólica	25
2.3.4 Recuperação do etanol.....	26
2.4 Microrganismos utilizados na fermentação alcoólica industrial.....	26
2.5 Processo bioquímico da fermentação alcoólica	28
2.6 Fatores que afetam o rendimento da fermentação	31
2.6.1 Condições do processo	31
2.6.2 Presença de contaminantes	32
2.6.3 Nutrição do meio fermentativo.....	32
3. OBJETIVOS.....	36
3.1 Objetivo geral	36
3.2 Objetivos específicos	36
4. METODOLOGIA.....	37
4.1 Obtenção das cultivares de cana-de-açúcar e preparo dos mostos	37
4.2 Determinação da concentração celular inicial	39
4.3 Microrganismos e preparo do inóculo	40
4.4 Fermentação.....	40
4.5 Determinação da Biomassa produzida.....	41
4.6 Caracterização do mosto de cana-de-açúcar e do mosto fermentado	41
4.6.1 Quantificação de açúcares, etanol, glicerol, ácido acético e metanol.....	42
4.6.2 Quantificação de aminoácidos.....	42
4.6.3 Determinação de vitaminas	46
4.7 Cálculo dos parâmetros fermentativos.....	47
4.7.1 Fator de conversão de substrato a células ($Y_{X/S}$).....	47
4.7.2 Fator de conversão de substrato a produto ($Y_{p/s}$).....	48

4.7.3	Eficiência da fermentação	48
4.7.4	Produtividade.....	49
4.8	Análise estatística	49
5.	Resultados e Discussão.....	51
5.1	Parâmetros Fermentativos.....	51
5.1.1	Eficiência de fermentação	52
5.1.2	Fator de conversão de substrato em produto	52
5.1.3	Produtividade.....	54
5.1.4	Eficiência de fermentação	54
5.1.5	Biomassa.....	55
5.1.6	Consumo açúcar	55
5.1.7	Glicerol	56
5.1.8	Ácido acético	57
5.2	Quantificação de Aminoácidos	57
5.2.1	Consumo de aminoácidos durante a fermentação alcoólica.....	59
5.3	Quantificação de Vitaminas Hidrossolúveis.....	64
6.	CONCLUSÃO.....	68
7.	Considerações finais	69
	REFERÊNCIAS	70

1. INTRODUÇÃO

A crescente necessidade de energia para suprir a demanda mundial juntamente com os danos ambientais causados principalmente pela queima de combustíveis fósseis evidenciam a urgência em buscar fontes de energia renováveis e com menor impacto ambiental. O etanol é um biocombustível que tem ganhado por ser uma fonte de energia renovável, já que utiliza matéria prima vegetal e gera entre 40 e 62% menos emissões de gases do efeito estufa no processo de combustão, comparado com a gasolina. (Baeyens et al., 2015; De Carvalho et al., 2016; Mohd Azhar et al., 2017).

A maior parte do etanol produzido mundialmente é pela via biotecnológica (fermentação). Nesse processo, um substrato contendo açúcares (mosto) é inoculado com microrganismos capazes de converter os açúcares em etanol, processo denominado fermentação alcoólica. No Brasil utiliza-se majoritariamente o caldo de cana-de-açúcar como substrato, ou o melaço, um subproduto do processamento do açúcar. Os agentes fermentadores em geral são leveduras do gênero *Saccharomyces cerevisiae*. A concentração de açúcares no mosto deve ser entre 18 e 20 ° Brix, o que corresponde a 180 e 200 g.L⁻¹ respectivamente. A fermentação industrial tem duração de 4 a 12 h, produzindo entre 7 e 10 % (m/v) de etanol. Após a fermentação as leveduras são separadas e o etanol é recuperado por destilação. O fermento é tratado com ácido sulfúrico para reutilização. O resíduo de todo o processo (vinhaça) geralmente é usado como fertilizante na lavoura de cana (da Silva Fernandes *et al.*, 2022; de Vasconcelos, 2015; Góes-Favoni *et al.*, 2018; Shuler, 2018).

Muitos fatores afetam a eficiência de conversão dos açúcares em etanol, dentre os quais estão a temperatura, concentração de açúcares, pH, grau de agitação, nutrientes no mosto, uso de antibióticos, inclusive a presença de contaminantes. Portanto, as condições do processo devem ser ideais para a sobrevivência das leveduras produtoras de etanol proporcionando sua dominância em relação a outros microrganismos contaminantes. Além desses fatores, a qualidade da matéria prima é de suma importância pois deve fornecer a nutrição adequada para que a levedura tenha a máxima taxa de conversão dos açúcares em etanol (de Vasconcelos, 2015).

Além da concentração adequada de açúcares (fonte de carbono), a matéria prima deve conter uma fonte de nitrogênio, fósforo, enxofre, minerais e vitaminas. O nitrogênio

é o segundo elemento em maior percentual na composição da célula microbiana, podendo ser assimilado na forma de ureia, amônia ou aminoácidos livres, sendo que algumas formas são preferenciais a outras. Dentre elas, os aminoácidos merecem destaque pois desempenham funções na estrutura de proteínas e como reguladores de vias metabólicas (Varaee et al., 2019; Tse; Wiens; Reaney, 2021). As vitaminas são necessárias em menores quantidades comparadas ao nitrogênio. Mesmo assim exercem papéis importantes na multiplicação celular e atuam como cofatores de enzimas das vias metabólicas. Assim como outros microrganismos, as leveduras são capazes de sintetizar a maioria das vitaminas, entretanto a depender da condição, esse processo pode implicar em um alto custo energético. Nesse sentido, é importante conhecer a composição química da matéria prima assegurando que contenha todos nutrientes necessários para que a levedura tenha a taxa máxima de metabolismo, evitando custos adicionais com suplementação (Lima et al., 2001; Labuschagne; Divol, 2021).

O caldo de cana-de-açúcar, assim como outras matérias primas que servem de substrato para fermentações, é uma mistura complexa de nutrientes. A composição química difere de acordo com a variedade da cana e condições ambientais como o tipo de solo, altitude e índice pluviométrico da região onde foi cultivada, entre outros (Miranda Júnior *et al.*, 2009; Petrovic; Aleixandre-Tudo; Buica, 2019). Entender as variações na composição química entre diferentes variedades de cana de açúcar é crucial para identificar os requisitos nutricionais da levedura durante a fermentação e assim selecionar a melhor cultivar para a produção de etanol de acordo com a cepa e o microambiente específico de cada usina.

Considerando a importância do etanol na transição da matriz energética global e sua relevância econômica, é justificada uma análise mais detalhada da composição química do mosto de cana-de-açúcar. Isso permite buscar melhores condições para o processo fermentativo, visando aumentar o rendimento em etanol, o que é significativo dada a alta produção no país. Assim, este estudo visa caracterizar o mosto de diferentes cultivares de cana-de-açúcar e avaliar a produtividade em etanol.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cana-de-açúcar

A cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum L.*) é uma das principais atividades econômicas no Brasil por ser uma planta que se adapta a regiões de climas tropical e subtropical. As primeiras mudas foram trazidas no ano de 1532 da Ilha da Madeira. Os principais produtos obtidos da cana são o açúcar e o etanol, porém, inicialmente produzia-se somente açúcar e possivelmente cachaça a partir do melaço, em menor escala. Somente no início do século XX teve início a produção integrada de açúcar e etanol, e instalação de unidades destinadas unicamente à produção de etanol. Atualmente também se produz eletricidade a partir dos subprodutos como o bagaço da cana, que é usada para fornecer energia às operações da própria indústria e o remanescente é vendido para as companhias elétricas (Kezzy De Moraes *et al.*, 2015).

O Brasil lidera a produção mundial de cana, seguido pela Índia. A safra 2022/2023 fechou em 610 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, com uma área plantada de 8,29 milhões de hectares. Estima-se que o setor sucroenergético emprega aproximadamente 800 mil pessoas, desde o cultivo da cana até a produção de açúcar e etanol, além de representar 2% do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro. A safra desse período fechou com um faturamento de R\$ 95,9 bilhões, 4,5 % acima do ano anterior (2021) (Silva *et al.*, 2019; Cruz, 2022; CONAB, 2023).

O Brasil tem o clima ideal para o desenvolvimento dessa planta, que necessita de uma estação quente e úmida para o desenvolvimento vegetativo e uma estação fria e seca para a maturação, o que justifica o cultivo da cana em todas as regiões do país (Silva *et al.*, 2021). Outro aspecto é que essa planta pode se desenvolver em solos com poucos recursos como o cerrado. É uma cultura semiperene, ou seja, é cortada algumas vezes antes de ser replantada. O ciclo produtivo médio é de 6 anos, com 5 cortes (Viana *et al.*, 2023).

As células parenquimatosas da cana-de-açúcar são ricas em um líquido açucarado que pode ser facilmente extraído, tornando-a uma matéria prima importante para as indústrias de açúcar e etanol. A cana de açúcar é altamente nutritiva e contém uma variedade de açúcares incluindo sacarose, frutose, glicose, além de minerais como cálcio,

ferro e zinco. Também é uma fonte de vitaminas, aminoácidos, carotenoides, fosfolípidos e polifenóis (Koubaa; Barba; Roohinejad, 2021; Chen et al., 2024). A concentração de açúcar varia de acordo com a idade, o período da colheita e o grau de degradação devido a atrasos na colheita, a localização geográfica e o tipo de produção (Arif *et al.*, 2019; Koubaa; Barba; Roohinejad, 2021). Em média, a concentração de açúcares no caldo de cana varia numa faixa de 170 a 200 g.L⁻¹ e o pH entre 4,0 e 5,2 (Ronquillo Blau et al., 2023; Chen et al., 2024).

O aumento da produtividade da cana-de-açúcar pode ser conseguido a partir do desenvolvimento de novas tecnologias na fase de cultivo ou pelo melhoramento genético clássico com cruzamentos de variedades e pela manipulação genética das plantas a fim de se obter variedades que apresentem características específicas como a maior resistência a pragas e doenças, maior concentração de açúcares, melhores tempos de maturação, o que contribui para o aumento da produtividade industrial, gerando maiores ganhos econômicos (Kezzy De Moraes et al., 2015; Vandenberghe et al., 2022). Um dos mais importantes programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar no Brasil é a RIDESA, que é responsável pelo desenvolvimento de grande parte das variedades de cana cultivadas no país (RIDESA, 2015).

A Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (RIDESA) foi criada em 1990 com a extinção do Programa Nacional de Melhoramento da Cana-de-açúcar (PLANALSUCAR), um programa do governo federal que tinha como meta melhorar o rendimento da cana-de-açúcar, tanto no campo como na indústria. Houve a incorporação dos recursos humanos e da tecnologia por universidades federais que criaram a rede para continuar desenvolvendo as pesquisas, mas com o fim do investimento governamental, passaram a buscar aporte financeiro nas usinas. Essa rede é formada pelas Universidades Federais de Alagoas (UFAL), Rural de Pernambuco (UFRPE), Viçosa-MG (UFV), São Carlos-SP (UFSCar), Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Paraná (UFPR), de Sergipe (UFS), de Goiás (UFG), do Mato Grosso (UFMT) e do Piauí (UFPI). A principal linha de pesquisa é o melhoramento genético de cultivares da sigla RB (República Brasil), que representa mais de 65% da área cultivada de cana-de-açúcar no país (“RIDESA: Site Oficial”, 2022).

2.1.1 Cultivares RB

As variedades desenvolvidas pela RIDESA usam a sigla RB para identificação, que significa “República Brasil”. Até 2016 haviam sido lançadas 94 cultivares RB. O processo de liberação de uma cultivar envolve uma série de etapas, com duração aproximada de 14 anos. Inicialmente são feitos cruzamentos entre duas variedades que apresentam características desejáveis e então inicia-se a fase de plantio e testes por volta do terceiro ano. Até o décimo terceiro ano é avaliada a resistência às principais doenças e o desempenho em usinas conveniadas. A última etapa consiste na validação dos testes de doenças, curva de maturação, e plantio em áreas pré-comerciais. A partir daí a cana pode ser liberada para o plantio em larga escala (“RIDESA: Site Oficial”, 2022).

Uma das variedades mais antigas e de maior sucesso é a RB867515 que começou a ser desenvolvida em 1986 e foi lançada somente em 1997. Seu sucesso se deu por exibir bom desenvolvimento em solos de baixa fertilidade, arenosos e com restrições hídricas, o que permitiu a expansão de áreas cultivadas na região nordeste do país. É resultado de uma série de cruzamentos a partir da RB72454 com pólen de diversas variedades ao acaso. Apresenta hábito de crescimento ereto, despalha fácil, o perfilhamento é médio com colmos de diâmetro médio e alta uniformidade; colmos com entrenós cilíndricos de cor verde-arroxeadado sob a palha e roxo intenso quando exposto ao sol. Recomenda-se o corte de junho a agosto; o teor de fibra é relativamente alto (13%). Apresentou produtividade maior em ensaios industriais quando comparada com outras quatro importantes variedades comerciais: SP79-1011, RB765418, RB72454 e RB739359 (RIDESA, 2010; Vital, 2016).

Outra cultivar que tem alta produtividade agrícola é a RB988082, com médio teor de sacarose, ampla adaptabilidade e estabilidade, e tolerante às principais doenças da cana-de-açúcar. O corte deve ser feito nos meses de junho a setembro com indicação de plantio em solos de média a alta fertilidade. Apresenta rendimento maior que a RB867515 (RIDESA BRASIL, 2015).

A RB034045 é um cruzamento entre as variedades SP71-5181 e SP80-1816. Foi lançada em 2015 pela Universidade Federal de Goiás. Tem desenvolvimento rápido, hábito de crescimento ereto, despalha média, diâmetro médio do colmo, cor verde-amarelada e com pouca cera. Possui alto teor de fibra, médio teor de sacarose e alta

produtividade agrícola. Tem indicação de plantio em solos de médio a bom potencial e corte de maio a agosto. Apresenta maior produtividade do que a cultivar RB867515 (Oliveira; Barbosa; Daros, 2021).

2.2 Etanol

2.2.1 Características e aplicações

O etanol ou álcool etílico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) é um líquido incolor, volátil e inflamável, de densidade igual a $789 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ e massa molar de $46,07 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Tem ponto de ebulição inicial e faixa de temperatura de ebulição de 78 a $78,4 \text{ }^\circ\text{C}$. É miscível em água, éter etílico, acetona, benzeno, clorofórmio e solventes orgânicos. É estável em condições normais de temperatura e pressão, porém deve-se evitar temperaturas elevadas, fontes de ignição e os seguintes materiais que são incompatíveis: 2,4-dinitrotolueno, ácido sulfúrico, agentes oxidantes fortes, alumínio, amônia, halogênios e metais alcalinos (Quimesp Química, 2021).

O etanol anidro é amplamente utilizado como matéria prima na indústria farmacêutica, de cosméticos, alimentos, bebidas, produtos de limpeza, aromatizantes, tintas e solventes. É misturado à gasolina na proporção de 20% (obrigatório) e 8% misturado ao diesel (opcional). Além disso sua forma hidratada é usada como combustível direto em motores veiculares e é amplamente usado como antisséptico diluído em água na concentração de 70% (de Vasconcelos, 2015).

2.2.2 Contexto histórico e econômico da produção de etanol no Brasil

Diante da crise nas exportações do açúcar em 1929 a economia açucareira no Brasil foi direcionada para a produção de etanol a partir da criação do Instituto do Açúcar e do Alcool (IAA) em 1933 e o surgimento da primeira usina brasileira de etanol (Silveira, 2022).

Entretanto, já em 1931 foi criada a primeira lei brasileira que determinou a obrigatoriedade da mistura de etanol na gasolina, na qual se exigia uma proporção de 5%

de etanol em toda gasolina importada. Essa quantidade variou ao longo do tempo de acordo com as flutuações do preço do petróleo, à medida em que utilizar o etanol ficava mais ou menos atrativo. Em 1975 o governo federal criou o ProAlcool, um programa de incentivo à produção de etanol como alternativa para os altos preços da gasolina, consequência da crise do petróleo de 1973 (Balat; Balat, 2009; Silveira, 2022).

Desde a criação do Proálcool até os dias atuais, o mercado do etanol passou por diversas oscilações. Com o surgimento dos carros *flex* a partir de 2003, houve um aumento na demanda interna por etanol. No entanto, em 2008, com a crise financeira mundial, as unidades produtoras enfrentaram endividamento. Na época, a política nacional de controle de preços da gasolina estabeleceu um teto para o custo do etanol, restringindo a margem de lucro e consequentemente reduzindo os investimentos no setor. Em 2015, com o fim da política de manutenção do preço da gasolina e o aumento do percentual de etanol misturado à gasolina, o consumo interno aumentou levando a marca da histórica na produção de etanol na safra 2019/2020 de 36,5 bilhões de litros. Entretanto, a pandemia de Covid-19 enfraqueceu mais uma vez o setor (Silveira, 2022).

Mesmo com essas oscilações, o Brasil é o segundo maior produtor de etanol atualmente, representando 27% da produção mundial, estando atrás apenas dos EUA com 55%. A safra 2022/2023 gerou um total de 26.52 bilhões de litros de etanol de cana-de-açúcar (Renewable Fuels Association, 2022; CONAB, 2023;). As exportações cresceram 26,3% em 2022, representando 2,43 bilhões de litros, valor próximo do recorde batido em 2020, de 2,64 bilhões. A receita acumulada em 2022 somou US\$ 1,76 bilhão (NOVACANA, 2023).

Inicialmente, os incentivos governamentais para a produção de etanol no Brasil se deram em decorrência de fatores puramente econômicos e foram se transformando gradualmente em novos programas governamentais motivados também por questões ambientais.

O Acordo de Paris, estabelecido na 21ª Conferência das Partes (COP21) da Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre Mudança do Clima (UNFCCC) em dezembro de 2015, teve como principal objetivo combater as mudanças climáticas e seus impactos em dois eixos: a partir do estabelecimento de metas para limitar o aumento da temperatura global (mitigação) e fortalecer a capacidade dos países em lidar com os efeitos das mudanças climáticas (adaptação). Sendo assim, foi determinado que cada país

deveria definir metas individuais para redução das emissões de CO₂ a partir de 2020 a fim de manter um aumento na temperatura global de no máximo 2°C até o fim deste século. As metas estabelecidas voluntariamente pelo Brasil foram a redução de 37% dos gases de efeito estufa até 2025 e 43% até 2030 (Klein et al., 2019).

A Política Nacional dos Biocombustíveis (RenovaBio) foi instituída pela Lei 13.576/2017 a fim de contribuir para o cumprimento dos compromissos determinados pelo Brasil no âmbito do Acordo de Paris, promovendo a expansão dos biocombustíveis na matriz energética de transportes, assegurando a previsibilidade para o mercado de combustíveis e induzindo ganhos de eficiência energética e redução das emissões de gases causadores do efeito estufa (GEE) na produção, comercialização e uso de biocombustíveis (Agência Nacional do Petróleo, 2024)

Nesse sentido, o principal instrumento é o estabelecimento de metas nacionais de descarbonização. Os distribuidores de combustíveis precisam cumprir metas de redução de emissões de carbono com base em sua participação no mercado de combustíveis fósseis, enquanto os produtores de biocombustíveis passam por um processo de certificação que avalia a eficiência energético-ambiental de sua produção, resultando na emissão de Créditos de Descarbonização (CBIOs), que podem ser negociados no mercado financeiro. As distribuidoras de combustíveis podem adquirir esses CBIOs para cumprir suas metas de descarbonização (Agência Nacional do Petróleo, 2024).

Essa certificação leva em conta também a origem da matéria prima do biocombustível. Se é produzida em território nacional como é o caso do etanol, somente pode ser considerada a biomassa produzida em imóvel com Cadastro Ambiental Rural (CAR) ativo ou pendente, mas sem ocorrência de supressão da vegetação nativa a partir do marco legal do RenovaBio (Agência Nacional do Petróleo, 2024).

A promoção do uso de biocombustíveis como medida de mitigação às mudanças climáticas, redução da emissão de poluentes e diversificação da matriz energética assume grande relevância uma vez que os combustíveis líquidos representam cerca de 40% da energia consumida no mundo e o setor de transporte representa a maior parcela de emissões de GEE, sendo aproximadamente 20% das emissões globais de dióxido de carbono (CO₂) (Mohd Azhar et al., 2017; Albuquerque et al., 2020). O etanol surge como alternativa para substituir os combustíveis fósseis pois é derivado de matéria prima

renovável e emite entre 40 e 62% menos gases do efeito estufa comparado com a gasolina (Baeyens *et al.*, 2015; de Carvalho; Antunes; Freire, 2016).

Considerando toda a cadeia produtiva, o etanol produzido a partir da cana-de-açúcar é reconhecido como um combustível ambientalmente amigável em comparação com os combustíveis fósseis. Durante o processo de produção, a matéria-prima vegetal absorve dióxido de carbono (CO₂) da atmosfera durante a fotossíntese, transformando-o em açúcares e polímeros que compõem a estrutura da planta (de Carvalho; Antunes; Freire, 2016; Silva *et al.*, 2019). Esse mecanismo de sequestro de carbono ajuda a mitigar as emissões de gases de efeito estufa. A captura de CO₂ pela cana-de-açúcar é cerca de 653 kg por tonelada de cana (Silva *et al.*, 2019).

Apesar do processo de produção requerer energia, o uso do bagaço da cana-de-açúcar para a queima nas caldeiras supre a demanda energética da usina. Além disso, o uso dos variados efluentes vindos da usina para a irrigação do canavial contribui para a redução do uso de água e fertilizantes, tornando a produção ainda mais sustentável (Machado; Abreu, 2006).

Em função das vantagens do uso do etanol preferencialmente aos combustíveis fósseis, as projeções indicam que a produção desse biocombustível deverá ter um aumento considerável até 2030. A substituição completa da gasolina pelo etanol exigiria um aumento na produção de quase 100% nos próximos 10 anos (Vandenberghe *et al.*, 2022).

Apesar da área plantada de cana-de-açúcar representar apenas cerca de 1% do território brasileiro (8,3 milhões de hectares na safra 2022/2023), não é interessante aumentar as áreas de cultivo do ponto de vista ambiental. Portanto, para que se consiga um aumento na produção de etanol sem a expansão dos canaviais, investe-se em pesquisas de melhoramento genético da cana para a obtenção de cultivares com maior resistência a pragas (redução de perdas) e/ou maior concentração de açúcares (maior produtividade por hectare), otimização do processo industrial de produção do etanol e desenvolvimento de tecnologias que permitam o aproveitamento de resíduos para a produção de etanol de segunda geração (Magalhães; Braunbeck, 2014; CONAB, 2023).

2.3 Processo produtivo

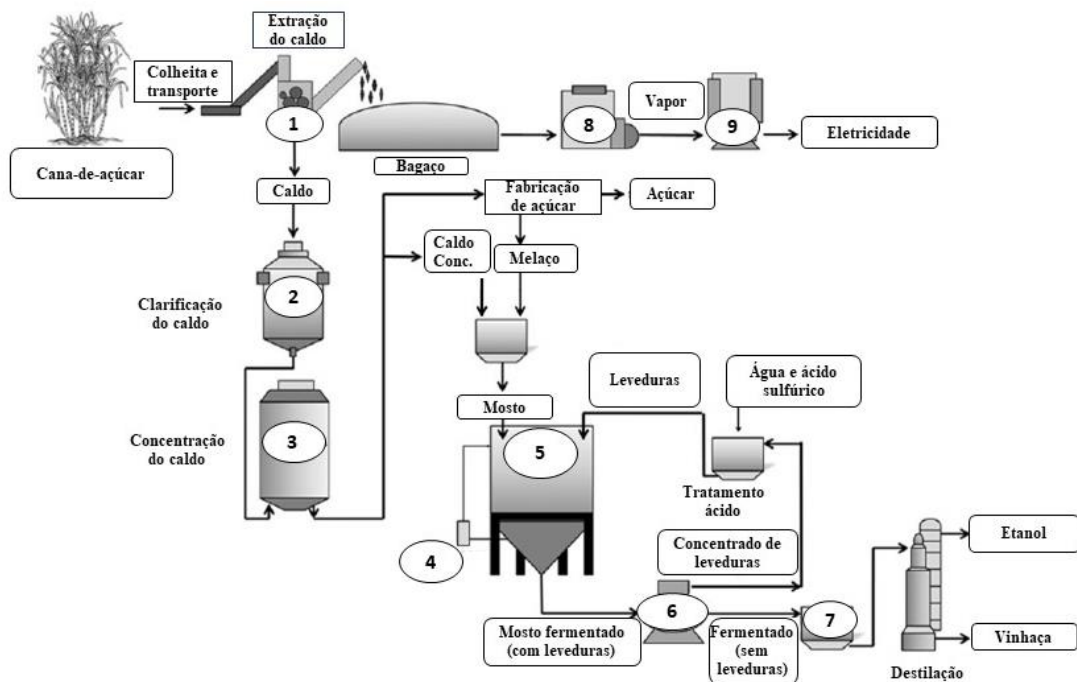
Existem três vias de obtenção do etanol: por síntese química, por destilação (de líquidos alcoólicos) e por fermentação. Na primeira via, o etanol é produzido a partir de hidrocarbonetos insaturados como o eteno, etino, gases de petróleo e hulha. Entretanto, esse processo é significativo apenas onde há grandes reservas de petróleo além de não resolver o problema da dependência dos combustíveis fósseis. Na segunda via o etanol é obtido a partir da destilação de bebidas alcoólicas em condições excepcionais tais como quando há excesso de produção, para regular os preços no mercado; quando um lote grande de bebida apresenta problemas; ou quando uma variedade específica de álcool precisa ser obtida. Todavia, essa forma de obtenção não tem relevância econômica no Brasil (Lima et al., 2001; Machado; Abreu, 2006; de Vasconcelos, 2015;).

A terceira e mais importante, a via fermentativa, é a principal rota de obtenção do etanol correspondendo a cerca de 80% da produção mundial. A fermentação alcoólica é o processo no qual microrganismos produzem energia (ATP) a partir de um substrato (carboidratos) tendo como subprodutos etanol, dióxido de carbono (CO₂) e outros compostos orgânicos em menor quantidade. Uma grande vantagem da obtenção industrial de etanol por fermentação é a quantidade de matérias primas naturais disponíveis, ou seja, qualquer material que contenha açúcares ou outros carboidratos em concentração significativa. Esses materiais podem ser açucarados (cana-de-açúcar, beterraba, milho, sorgo, melão, frutas), amiláceos (grãos amiláceos, raízes, tubérculos) e celulósicos (palhas, madeiras, resíduos agrícolas e resíduos de fábricas de papel) (Lima et al., 2001; de Vasconcelos, 2015).

No Brasil, a matéria-prima majoritariamente utilizada na produção do etanol é o caldo de cana-de-açúcar e o melão, devido a alguns fatores como, o cultivo da cana ser favorável em clima tropical e subtropical, apresentar boa produtividade agrícola, ser viável economicamente, e não necessitar de pré-tratamento. Os materiais amiláceos devem ser hidrolisados para liberar os açúcares fermentescíveis (monossacarídeos), e os celulósicos também necessitam de pré-tratamento, mas ainda mais complexo que os anteriores. Além disso, a cana-de-açúcar apresenta a maior produtividade de carboidratos por hectare cultivado, resultando em uma maior produtividade de etanol por hectare, se comparada a outras matérias-primas açucaradas como milho, sorgo e mandioca. Apesar disso, há uma tendência de crescimento da produção de etanol a partir do milho devido a facilidade de mais safras ao longo do ano (Dorta et al., 2006; Baeyens et al., 2015).

O processo produtivo do etanol por via fermentativa mostrado na Figura 1 consiste resumidamente nas seguintes etapas: preparo do substrato, fermentação e destilação para recuperação do álcool.

Figura 1. Esquema simplificado do processo de produção de etanol por fermentação alcoólica, onde: (1) moenda; (2) decantador; (3) evaporador; (4) trocador de calor; (5) Dorna de fermentação; (6) centrífuga; (7) tanque; (8) caldeira; (9) gerador.



Fonte: Adaptado de Amorim et al., 2011.

2.3.1 Extração do caldo

Ao chegar na usina, a cana passa por processo de lavagem em esteiras para retirada de impurezas grosseiras. Em seguida é picada e desfibrada. A extração do caldo é realizada na moenda ou no difusor. A moenda consiste em um conjunto de rolos que esmagam a cana extraindo o caldo. É formada por quatro a seis ternos de moenda e cada terno é formado por três cilindros principais denominados cilindro de entrada, cilindro superior e cilindro de saída. A cana picada chega ao primeiro terno onde recebe uma compressão e o bagaço segue por uma esteira até o segundo terno e assim por diante. Entre um terno e outro realiza-se a adição de água (embebição) para aumentar a eficiência de extração dos açúcares (EMBRAPA, 2022).

Já a extração por difusão é um processo de extração sólido-líquido (lixiviação), em que a cana picada passa por uma lavagem para solubilização da sacarose adsorvida ao material fibroso. Faz-se uma operação de retorno do caldo diluído e quando o bagaço está esgotado ao máximo, faz-se a lavagem com água. Esse retorno pode ser feito de 5 a 20 vezes. A extração com difusor tem eficiência de 98% enquanto na extração por moenda consegue-se uma eficiência de 96% (EMBRAPA, 2022).

2.3.2 Preparo do mosto

Denomina-se mosto qualquer substrato açucarado destinado à fermentação alcoólica. A concentração adequada de açúcares no mosto está entre 180 - 200 g.L⁻¹, que equivale a 18 - 20 °Brix, unidade amplamente utilizada nas usinas de álcool. Após a moagem da cana, o caldo normalmente apresenta concentração adequada, podendo eventualmente ser diluído. Em seguida passa por um processo de clarificação, que consiste no aquecimento a 103 – 105°C, decantação e filtração para retirar as impurezas mais finas (coloides e gomas), seguido pelo resfriamento até 28 – 30 °C que é a temperatura ideal para fermentação (Paschoalini, 2009).

Na maioria das fábricas de açúcar existem usinas anexas que produzem etanol a partir do melaço, um subproduto que contém em torno de 50 a 60% de açúcares. Nesse caso, o melaço é obrigatoriamente diluído até a concentração ideal (Küüt *et al.*, 2018; Lima *et al.*, 2001).

2.3.3 Fermentação alcoólica

Após o preparo do mosto, ocorre a fermentação alcoólica que é o processo de transformação dos açúcares do mosto em energia, etanol, CO₂ e outros produtos orgânicos em menor quantidade (Koubaa; Barba; Roohinejad, 2021).

Denomina-se pé-de-cuba o fermento inicial, preparado em fermentadores menores para proporcionar o crescimento celular antes de inocular nas dornas de fermentação. Entretanto em algumas destilarias brasileiras é empregado como inóculo inicial a

levedura desidratada, que diminui os riscos durante a operação de multiplicação. Esse tipo de inoculação chama-se partida direta (Paschoalini, 2009).

O processo fermentativo nas usinas ocorre em tanques de aço (dornas de fermentação) com trocador de calor para manter a temperatura na faixa de 28 °C a 30 °C. Tem duração de 4 a 12 horas, e termina com um líquido de teor alcoólico entre 7 % e 10 %, denominado de vinho fermentado ou vinho levedurado (Paschoalini, 2009; Santos, 2021).

2.3.4 Recuperação do etanol

Após a etapa de fermentação o vinho é enviado para a centrífuga, onde a parte líquida é separada das leveduras. O fermento passa por um tratamento com ácido sulfúrico em pH 2,5 e em alguns casos adiciona-se antibióticos para eliminação de bactérias contaminantes. Esse processo de recuperação do inóculo para reutilização em outros ciclos de fermentação é conhecido como processo Melle-Boinot (Bergmann *et al.*, 2018).

O vinho de levedurado segue para a destilação (separação por diferença do ponto de ebulição dos componentes da mistura), obtendo-se um vapor etanólico com 40-50°GL (flegma) e um líquido com menos de 0,03 °GL (vinhaça). Este último é usado como fertilizante na lavoura de cana. A flegma passa por um processo de retificação (purificação e concentração) até resultar no etanol hidratado a 96°GL. Para se obter o etanol anidro (99,7°GL), normalmente se adiciona ciclohexano, que forma uma mistura ternária com água e etanol, cujo ponto de ebulição é menor que a mistura binária inicial (Bergmann *et al.*, 2018; Da Silva Fernandes *et al.*, 2022).

2.4 Microrganismos utilizados na fermentação alcoólica industrial

As leveduras são os microrganismos preferenciais para produção de etanol pois tem alto rendimento teórico, alta tolerância ao etanol e são capazes de se desenvolver em meios de baixo custo, sendo exemplos as espécies *Pichia stipitis*, *S. cerevisiae* e *Kluyveromyces fragilis* (Mohd Azhar *et al.*, 2017).

São unicelulares, heterotróficos, pertencem ao reino *Fungi* e são aeróbios facultativos, ou seja, sobrevivem tanto em condições de abundância como de ausência de

oxigênio. O crescimento celular é favorecido na presença de oxigênio, em que a oxidação dos carboidratos resulta em biomassa, CO₂ e H₂O, enquanto a fermentação alcoólica é favorecida na ausência de oxigênio (Ciani, M.; Comitini; Mannazzu, 2008; Bergmann et al., 2018; Walker; Walker, 2018).

Entretanto, a produção de etanol em escala industrial ocorre na presença de oxigênio. Isso é possível devido ao efeito Crabtree, que é um mecanismo de sobrevivência e consiste na capacidade do microrganismo em produzir etanol mesmo na presença de oxigênio quando este se encontra em um meio com alta concentração de açúcares. Outro fator que viabiliza a produção em larga escala é a tolerância das leveduras ao etanol, pois o acúmulo de etanol no meio é tóxico para outros microrganismos, reduzindo a competição pelo substrato (Ciani, M; Comitini; Mannazzu, 2008; Parapouli *et al.*, 2020).

Há evidências arqueológicas da produção de uma bebida fermentada na China por volta de 7000 a.c. e da produção de vinho no Iran e no Egito em 6000 a.c. e 3000 a.c. respectivamente, mesmo que a existência desses microrganismos não fosse conhecida (Da Silva Fernandes *et al.*, 2022).

A espécie *Saccharomyces cerevisiae* é o organismo eucarioto mais estudado e com metabolismo mais bem conhecido. Seu genoma foi sequenciado em 1996, sendo 6000 genes organizados em 16 cromossomos. Paralelamente à fermentação, ocorrem desvios da rota de produção do etanol com formação de outros produtos, inclusive o crescimento celular (em menor quantidade) (Parapouli et al., 2020; Da Silva Fernandes et al., 2022).

Para que a fermentação alcoólica tenha sucesso é importante que se escolha uma linhagem de *S. cerevisiae* que apresente alta conversão de substrato em etanol, alta velocidade de fermentação, resistência a pH baixos, resistência a antibióticos, estabilidade genética, tolerância a altas concentrações de açúcares e etanol, baixa produção de glicerol e dominância sobre leveduras selvagens (contaminantes) (Amorim et al., 2011; Santos et al., 2020; da Silva Fernandes et al., 2022).

Em geral, os microrganismos presentes naturalmente em uma determinada usina tendem a serem mais adaptados ao ambiente desse local, e mesmo que a fermentação seja iniciada com uma linhagem pura, ao longo dos ciclos fermentativos, uma linhagem considerada selvagem, originária desse microambiente específico, prevalecerá sobre as outras. Com esse propósito, vários programas de pesquisa têm isolado linhagens

selvagens que melhor se adaptaram aos microambientes das próprias usinas, visando reduzir o tempo de fermentação ao minimizar o período necessário para a adaptação das leveduras (Basso et al., 2008; Amorim et al., 2011)

A cepa de *S. cerevisiae* PE-2 foi isolada de destilarias brasileiras na década de 1990. Apresenta boas características de fermentação sendo amplamente usada na produção industrial de etanol atualmente. Dentre essas características, destaca-se a alta eficiência de fermentação e persistência prolongada durante os ciclos de recirculação. Está presente em 30% das usinas de etanol do país e é responsável pela produção de aproximadamente 10% de todo o suprimento mundial de etanol (Amorim et al., 2011; Soares-Costa et al., 2014; Da Silva Fernandes et al., 2022).

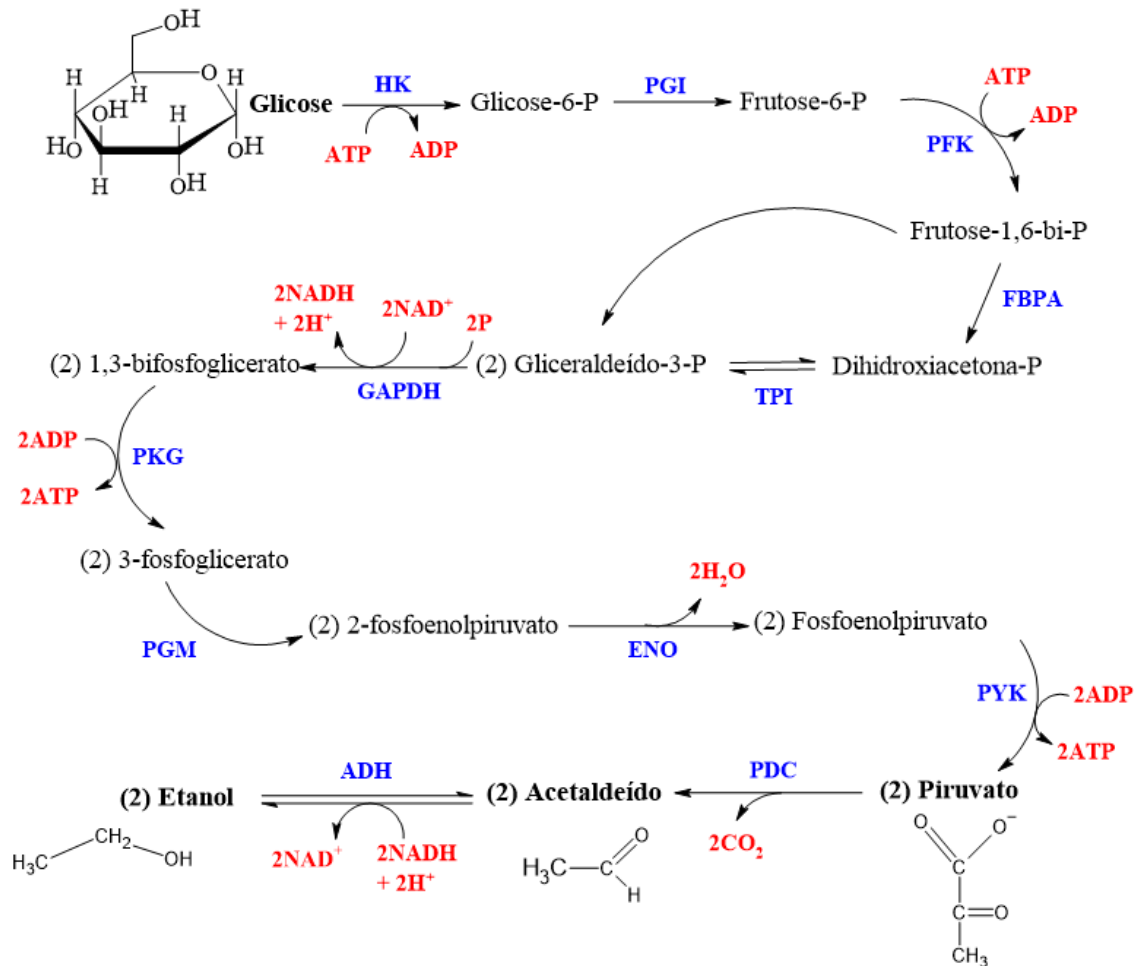
2.5 Processo bioquímico da fermentação alcoólica

O objetivo da fermentação para o microrganismo é produzir energia para manutenção da célula na forma de moléculas de ATP (adenosina trifosfato). Para isso, a *S. cerevisiae* produz uma enzima, a invertase, que faz a quebra da sacarose em açúcares fermentescíveis, glicose e frutose. Em seguida, esses monossacarídeos sofrem 10 reações sucessivas, etapa conhecida como glicólise, onde há formação de 2 moléculas de ATP, como mostrado na Figura 2 (Lehninger; Nelson; Cox, 2014).

A glicólise foi a primeira via metabólica a ser desvendada nas leveduras por Louis Pasteur em 1860 (Pasteur, 1860). Resumidamente, nessa etapa uma molécula de NAD^+ é reduzida a NADH, e como produto final duas moléculas de ácido pirúvico (3 carbonos).

A partir daí inicia-se a fermentação, em que não há produção de ATP, mas serve como meio de regenerar a molécula de NAD^+ para ser usada na quebra de mais moléculas de glicose e assim produzir mais ATP. As duas moléculas de ácido pirúvico são transformadas em duas moléculas de acetaldeído e CO_2 , pela enzima piruvato descarboxilase. Essa reação é irreversível, atuando como “regulador” do processo. Em seguida ocorre uma reação reversível, catalisada pela enzima álcool desidrogenase, em que ocorre a redução do acetaldeído a etanol com elétrons fornecidos pelo NADH, que é oxidado a NAD^+ . Sendo assim, a fermentação alcoólica tem como saldo 2 moléculas de etanol e 2 moléculas de CO_2 e 2 ATPs (da glicólise) para cada molécula de açúcar consumida (Lehninger; Nelson; Cox, 2014; Tortora; Funke; Case, 2017).

Figura 2. Síntese do etanol na célula de levedura. Abreviações: P – fosfato, HK – Hexoquinase, PGI – Fosfoglicomutase, PFK – Fosfofrutoquinase, FBPA - Frutose difosfato aldolase, TPI – Fosfotrioseisomerase, GAPDH – Gliceraldeído fosfato desidrogenase, PGK - Fosfogliceroquinase, PGM – Fosfogliceromutase, ENO – Enolase, PYK – Quinase pirúvica, PDC – Descarboxilase pirúvica e ADH – Desidrogenase alcoólica.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Entretanto, as leveduras produzem compostos secundários como glicerol, álcoois superiores e ácido succínico, sendo que o glicerol é o mais relevante do ponto de vista quantitativo (Gutierrez, 1991; Berovic et al., 2007). Por serem os biocatalisadores da fermentação, entender a fisiologia das leveduras é a chave para otimizar a produção industrial de etanol (Walker; Walker, 2018).

O glicerol está relacionado a uma resposta à alteração do equilíbrio redox da célula, o qual é afetado pela produção de biomassa, presença de sulfito no mosto ou formação de

ácidos orgânicos; e como resposta ao estresse osmótico causado por concentração elevada de açúcares no mosto. É produzido durante a glicólise (Lima et al., 2001; Berovic et al., 2007).

A mudança da fermentação alcoólica para a rota glicero-pirúvica ocorre principalmente devido a necessidade de regeneração do NAD^+ quando a redução do acetaldeído a etanol não é possível, podendo ser por: (1) indisponibilidade de acetaldeído quando este está ligado ao sulfito; (2) ausência ou baixa atividade da piruvato descarboxilase e (3) alta atividade da enzima aldeído desidrogenase em pH alcalino, que catalisa a reação do acetaldeído a acetato (Ciani, M; Comitini; Mannazzu, 2008).

O ácido acético é o principal ácido orgânico produzido no percurso da fermentação alcoólica pela *S. cerevisiae*. Pode ser usado como fonte única de carbono e energia, não sendo tóxico em condições onde há baixa concentração de açúcar disponível. No citoplasma, o acetato é convertido para Acetil-CoA pela Acetil-CoA sintase. O Acetil-CoA é consumido no ciclo do glioxilato ou oxidado na mitocôndria no ciclo do TCA. Todavia, em meio contendo glicose a *S. cerevisiae* não é capaz de metabolizar o ácido acético pois essa via sofre repressão pela glicose. Ou seja, o ácido acético nessas condições se torna tóxico para as células sendo associado a ativação de um mecanismo de morte celular programada (Giannattasio *et al.*, 2013).

Em pH menor que 4,75 (pKa do ácido acético), esse ácido encontra-se na forma não ionizada (CH_3COOH) e é transportado para o meio intracelular por difusão através dos canais de aquagliceroporinas Fps1p. No citoplasma, onde o pH é mais próximo da neutralidade, o ácido acético se dissocia em acetato (CH_3COO^-) e um próton (H^+). Quando há saturação do sistema tampão do meio intracelular, o ácido acético não é metabolizado pela célula e o acúmulo de prótons causa acidificação do citoplasma, criando um estado de deficiência energética e privação de nutrientes. Isso leva tanto a uma inibição do crescimento microbiano quanto da atividade metabólica como consumo de glicose, danos oxidativos e esgotamento energético, dependendo da concentração de ácido acético e disponibilidade de glicose (Giannattasio *et al.*, 2013; Guaragnella; Bettiga, 2021).

Além disso, diversos genes relacionados ao metabolismo de carboidratos, lipídeos, na função de transporte da parede celular e no enovelamento de proteínas estão envolvidos na tolerância ao ácido acético na *Saccharomyces cerevisiae*. Portanto,

elevadas concentrações de ácido acético causam efeitos negativos nas fermentações industriais em que a glicose é a principal fonte de carbono como na produção de vinhos e etanol (Giannattasio *et al.*, 2013; Guaragnella; Bettiga, 2021).

2.6 Fatores que afetam o rendimento da fermentação

Uma produção de etanol eficiente dependerá de certas características da levedura como boa capacidade fermentativa, viabilidade celular e habilidade de sobreviver em condições de estresse, como é o caso do ambiente das fermentações industriais (Stambuk *et al.*, 2009).

Sendo assim, as condições do processo como temperatura, pH, pressão osmótica, concentração de etanol e concentração de nutrientes presentes no meio fermentativo tem influência direta na célula e conseqüentemente, na eficiência da fermentação alcoólica.

2.6.1 Condições do processo

A temperatura é uma das variáveis mais importantes do processo de fermentação pois a taxa de metabolismo das células aumenta com o aumento da temperatura, o que leva a uma maior produção de etanol. O acúmulo do etanol intracelular danifica a estrutura da membrana (Da Silva Fernandes *et al.*, 2022).

A maioria das leveduras são organismos mesófilos, crescendo bem em entre 20 e 35°C, como é o caso da *Saccharomyces cerevisiae*. Entretanto, no decorrer da fermentação pode-se chegar a 38°C se não houver controle adequado da temperatura da dorna de fermentação. Em temperaturas acima da ideal para a *Saccharomyces cerevisiae* (30°C), além de aumentar a toxicidade do etanol, favorece a contaminação por microrganismos termotolerantes (Mohd Azhar *et al.*, 2017; Da Silva Fernandes *et al.*, 2022).

O pH deve ser mantido entre 4,0 - 5,0 que é a faixa ideal para sobrevivência das leveduras, visto que a permeabilidade de alguns nutrientes é influenciada pela concentração de íons H⁺ do meio fermentativo. Além disso, dificulta a permanência de

bactérias contaminantes pois a maioria não consegue sobreviver em meio ácido (Mohd Azhar et al., 2017; Da Silva Fernandes et al., 2022).

Quanto mais elevada a concentração de açúcares, maior a taxa de fermentação e mais etanol será produzido. Entretanto, concentrações muito acima de 150 g.L⁻¹ a pressão osmótica elevada causa a inviabilidade das células, além de que a alta quantidade de etanol produzida torna-se tóxica para as leveduras (Da Silva Fernandes *et al.*, 2022)

A agitação controla a permeabilidade dos nutrientes do mosto para dentro da célula e a remoção do etanol da célula para o mosto. Geralmente usa-se agitação de 150 – 200 rpm (Lima et al., 2001; Mohd Azhar et al., 2017; dos Santos; Silva; Castiglioni, 2021; da Silva Fernandes et al., 2022).

2.6.2 Presença de contaminantes

Devido à dificuldade de esterilização dos grandes volumes de mosto, a fermentação industrial não é conduzida em condições totalmente assépticas, estando suscetível a contaminações bacterianas ou por leveduras selvagens (Basso *et al.*, 2008).

Além disso, o reciclo das células pode favorecer a resistência desses contaminantes que competem pelo substrato com as leveduras industriais e algumas bactérias podem produzir toxinas que reduzem o número de células viáveis da *Saccharomyces cerevisiae*, levando a uma redução na produtividade de etanol. Em alguns casos, a ocorrência de floculação está associada à presença de microrganismos contaminantes, o que leva a problemas no tratamento do fermento (Amorim et al., 2011; dos Santos; Silva; Castiglioni, 2021). Em destilarias que produzem 1 milhão de litros diários de etanol, uma contaminação na ordem de 10⁸ bastonetes por mL causa perdas de 10.000 a 30.000 L de etanol por dia (Lima et al., 2001; Amorim et al., 2011).

2.6.3 Nutrição do meio fermentativo

A fermentação alcoólica é um processo dinâmico e complexo que é influenciado por diversos fatores, e em grande parte pela composição do meio fermentativo. As leveduras necessitam de uma variedade de nutrientes além do carbono, nitrogênio, vitaminas e

minerais para sua sobrevivência e multiplicação. Prover a nutrição adequada é tarefa difícil quando se trabalha em larga escala. Todavia, o caldo da cana-de-açúcar atende à maioria das exigências nutricionais exigidas (Koubaa; Barba; Roohinejad, 2021).

Os macronutrientes como nitrogênio, oxigênio, enxofre, fósforo, potássio e magnésio, devem estar disponíveis em concentrações da ordem de mili mol (10^{-3} mol). O nitrogênio constitui parte dos ácidos nucleicos e dos aminoácidos que formam as proteínas; o enxofre é usado na síntese de 3 aminoácidos importantes: cisteína, cistina e metionina; e o fósforo é usado na síntese de ácidos nucleicos e ATP (Pelczar, 1996; Tse; Wiens; Reaney, 2021). Alguns minerais (micronutrientes) como ferro, cálcio, cobalto, zinco, cobre, manganês, devem estar disponíveis em concentrações na ordem de micro mol (10^{-6} mol), podendo estar presentes no mosto natural ou suplementados em concentrações específicas para o processo (Walker; Stewart, 2016).

A *Saccharomyces cerevisiae* é capaz de utilizar o nitrogênio na forma de nitrogênio orgânico e inorgânico, sendo que algumas fontes são preferenciais a outras. Na presença de fontes preferenciais, as vias metabólicas das fontes não preferenciais são reprimidas. Na ausência de fontes preferenciais, essas vias são desreprimidas, o que possibilita a utilização dessas outras fontes de nitrogênio pela levedura (Lima et al., 2001; Magasanik; Kaiser, 2002; Miranda Júnior et al., 2009; Crépin et al., 2012).

Como em geral o açúcar sempre está presente em quantidades suficientes, a fonte de nitrogênio em quantidades limitadas é considerada a causa mais comum de fermentação lenta, pois a disponibilidade de nitrogênio regula a formação de biomassa celular, a taxa de fermentação e o tempo necessário para fermentação completa, podendo ocasionar um decréscimo no rendimento de etanol. Os aminoácidos livres representam até 90 % de todo o nitrogênio assimilado (Miranda Júnior et al., 2009; Crépin et al., 2012; Petrovic; Aleixandre-Tudo; Buica, 2019; Koubaa; Barba; Roohinejad, 2021).

O nitrogênio orgânico (aminoácidos) exerce papel importante no crescimento e metabolismo da levedura, sendo que concentrações abaixo da necessária resultam em fermentação lenta ou com baixa conversão de etanol (Bell; Henschke, 2005; Wang et al., 2014). A presença de aminoácidos no mosto permite que a levedura os incorpore para a síntese das proteínas, minimizando o gasto energético da biossíntese desses aminoácidos (Bell; Henschke, 2005; Varaee *et al.*, 2019).

As funções específicas de cada aminoácido tem sido objeto de vários estudos, principalmente na fermentação para produção de vinhos e cervejas, já que aminoácidos são precursores de alguns álcoois superiores, aldeídos, ésteres e ácidos cetônicos, compostos desejados na fabricação de bebidas por proporcionarem características sensoriais específicas (Wang *et al.*, 2014a).

Na produção de etanol industrial as pesquisas têm se voltado para a compreensão da relação entre aminoácidos e a regulação das vias metabólicas, como a tolerância ao etanol associada aos aminoácidos valina (Val), glicina (Gli), isoleucina (Ile) e ácido glutâmico (Glu) que foi demonstrada por meio de estudos de metabolômica (Aguilar *et al.*, 2023).

A absorção dos aminoácidos varia ao longo da fermentação e é afetado por alguns fatores de estresse que influenciam no funcionamento das permeases de membrana afetando o transporte de aminoácidos para o meio intracelular, e inclusive, o transporte de outros compostos como os açúcares (Guadalupe-Daqui *et al.*, 2023).

As vitaminas atuam como precursores para a síntese de componentes estruturais da célula e como reguladoras da atividade enzimática, participando ativamente das diversas vias metabólicas e, portanto, influenciando diretamente na velocidade de conversão dos açúcares em produtos desejáveis. A deficiência de vitaminas pode acarretar na morte celular (Labuschagne; Divol, 2021).

Foi demonstrado que a assimilação e armazenamento de vitamina B7 (biotina) condiciona a taxa de crescimento da *S. cerevisiae* sendo que uma concentração de 3 – 4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ é suficiente para obter a taxa máxima de crescimento específico. Além disso, observou-se que ao dobrar a concentração de vitaminas no meio fermentativo, a taxa de produção de etanol e a produtividade média aumentaram em 34% e 7% respectivamente. (Alfenore *et al.*, 2002).

Assim como outros microrganismos pertencentes ao reino *Fungi*, as leveduras *S. cerevisiae* são capazes de sintetizar as próprias vitaminas. Entretanto, devido ao alto custo energético, é mais vantajoso que a célula capture essas moléculas do meio extracelular pois nesse processo quase não há dispêndio de energia. Além do mais, dependendo do microrganismo, a síntese pode não ser suficiente para atender as necessidades da célula, o que faz com que a levedura fique parcialmente dependente de vitaminas exógenas (Labuschagne; Divol, 2021).

Nas usinas de etanol é comum a prática de suplementação do mosto para suprir possíveis deficiências nutricionais. Pode-se adicionar a substância pura, que em geral têm alto custo financeiro, ou materiais como extratos de levedura, de carne, de malte ou hidrolisado de proteínas, que apesar de terem custo inferior, sua composição varia ao longo do tempo e dependendo do fabricante, levando a incertezas no processo de fermentação (Schmidell, 2001; Vandenberghe et al., 2022).

Portanto, a análise detalhada da composição do mosto de diferentes variedades de cana-de-açúcar, principal matéria prima na produção de etanol no Brasil, por meio de técnicas analíticas de alta precisão é fundamental para selecionar a melhor combinação entre microrganismo e a variedade de cana utilizada, garantindo que atenda às necessidades nutricionais da levedura durante a fermentação alcoólica, e assim possa reduzir custos com suplementação e possibilitar um aumento de produtividade.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a composição do mosto de diferentes cultivares de cana-de-açúcar em relação aos açúcares, aminoácidos e vitaminas e estudar sua influência nos parâmetros fermentativos da produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* PE-2.

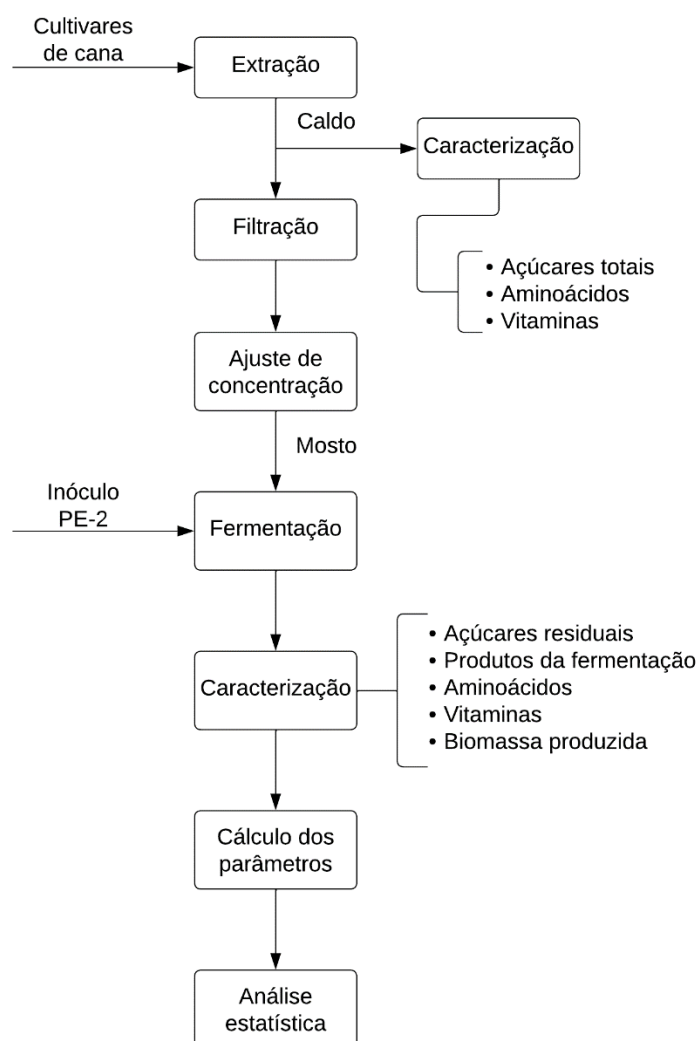
3.2 Objetivos específicos

- Quantificar os açúcares, aminoácidos e vitaminas presentes no mosto de três cultivares de cana mais plantadas na região Centro-Oeste (RB867515, RB988082 e RB034045) e de duas cultivares em fase de pré-lançamento (RB044108 e RB074067).
- Realizar ensaios fermentativos com cada cultivar utilizando a cepa de *S. cerevisiae* PE-2.
- Quantificar os açúcares residuais, etanol, glicerol e ácido acético a partir da fermentação do mosto de cada variedade de cana.
- Calcular os parâmetros fermentativos a partir dos valores de produção de etanol e consumo de açúcares e comparar a eficiência de fermentação entre as cultivares por meio de análises estatísticas.
- Quantificar os aminoácidos e vitaminas no mosto fermentado das cultivares RB867515, RB988082, RB034045, RB044108 e RB074067 e calcular o consumo de aminoácidos e vitaminas durante a fermentação alcoólica.

4. METODOLOGIA

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal de Goiás, localizado na Escola de Engenharia de Alimentos no *campus* Samambaia, Goiânia, Goiás. As variedades de cana-de-açúcar foram cedidas pela RIDESA, imediatamente após o corte, e processadas na UFG. O fluxograma das etapas dessa pesquisa é mostrado na Figura 3.

Figura 3. Esquema ilustrativo das etapas executadas no presente trabalho.



4.1 Obtenção das cultivares de cana-de-açúcar e preparo dos mostos

As cultivares de cana-de-açúcar fornecidas pela RIDESA foram a RB867515, RB988082, RB034045, RB044108 e RB074067 (Figura 4). As três primeiras têm

recomendação de cultivo na região Centro-oeste do Brasil. A RB867515 é a variedade mais cultivada no Brasil, lançada em 1998 pela UFV; a RB988082 foi liberada em 2015, também pela UFV; e a RB034045 foi lançada em 2015 pelo Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar (PMGCA) da UFG. As outras duas cultivares, RB044108 e RB074067, serão lançadas em breve, com perspectiva de liberação para o cultivo em 2025 (Ruiz, 2020; Oliveira; Barbosa; Daros, 2021).

Figura 4. Variedades de cana-de-açúcar utilizadas no presente estudo. (a) RB867515, (b) RB988082, (c) RB034045, (d) RB044108 e (e) RB074067, da esquerda para a direita.



Fonte: A autora (2022).

A extração dos caldos foi realizada no Laboratório de Panificação da Escola de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás. As canas foram lavadas para reduzir a possibilidade de contaminação e o caldo foi extraído por esmagamento em uma moenda elétrica Cana Shop Maqtron 60. Foi obtido aproximadamente 2 L de caldo de cada variedade, os quais foram filtrados e armazenados em frascos de vidro como os mostrados na Figura 5. Os mostos foram identificados usando as siglas M1, M2, M3, M4 e M5, que indicam as cultivares de cana na seguinte ordem: RB867515, RB988082, RB034045, RB044108 e RB074067.

Em seguida, a concentração de açúcares foi estimada com uso de refratômetro manual que mede os sólidos totais dissolvidos, técnica simples e amplamente usada nas

usinas. A menor concentração de açúcar foi de 13 °Brix, ou seja, aproximadamente 130 g.L⁻¹ em dois mostos. Os demais que tiveram valores mais altos foram diluídos com água ultrapura para 130 g.L⁻¹, a fim de realizar o ensaio fermentativo com uniformidade da concentração de açúcar entre os mostos.

Figura 5. Caldos extraídos das cinco variedades de cana-de-açúcar estudadas: RB867515 (M1), RB988082 (M2), RB034045 (M3), RB044108 (M4) e RB074067 (M5).



Fonte: A autora (2023).

4.2 Determinação da concentração celular inicial

A cepa de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada para as fermentações foi a PE-2, obtida do banco de cepas do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás.

As concentrações celulares foram estimadas pela construção de curva de calibração que correlaciona massa celular seca com a absorbância. A curva foi construída a partir do crescimento das cepas em GPY líquido durante 12 h. Em seguida, o meio foi centrifugado, lavado e as células foram ressuspensas com água destilada e diluídas em diferentes concentrações para leitura das absorbâncias. Nesta etapa, 1 mL da suspensão de células foi filtrada em sistema de filtração a vácuo utilizando filtros Merck MF-Millipore™ 0,45 µm. Em seguida, os filtros com as biomassas foram secos em micro-ondas até peso constante. A curva de calibração obtida é mostrada na Tabela 1.

Tabela 1. Curva de calibração da cepa PE-2, onde (y) é concentração celular (g.L⁻¹) e (x) absorbância.

Cepa	Equação	R ²
------	---------	----------------

4.3 Microrganismos e preparo do inóculo

A levedura seca foi ativada em meio de cultura estéril GPY, de composição descrita na Tabela 2, em ambiente esterilizado por 15 minutos com luz ultravioleta. Foi transferido uma quantidade suficiente de levedura para cobrir o fundo de um frasco *ependorf* de volume útil de 1,5 mL e adicionado 1 mL de meio GPY. Em seguida a suspensão foi incubada em estufa BOD a 30°C durante 24 h.

Tabela 2. Meio de cultura GPY líquido para crescimento das leveduras

Componentes	Concentração (g.L ⁻¹)
D-(+)-Glicose Anidra P.A.	20
Peptona	5
Extrato de Levedura	5

Após a incubação do inóculo, as células foram lavadas com água destilada estéril, centrifugadas a 8000 rpm por 2 minutos e ressuspendidas em 5 mL de água destilada estéril. Foi transferido 50 µL da suspensão para uma cubeta de quartzo, e o volume foi completado para 1 mL com água destilada para a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm. O branco foi feito com o mesmo volume de água destilada. A partir da substituição do valor de absorbância na Equação 1, foi possível estimar a concentração inicial de células nos 5 mL da suspensão, seguindo com o cálculo da concentração inicial de células no meio fermentativo.

4.4 Fermentação

Foram realizados ensaios fermentativos utilizando mosto das cultivares de cana de açúcar RB044108, RB867515, RB074067, RB988082, RB034045 separadamente. As fermentações foram conduzidas em triplicata, em frascos estéreis, com volume útil de 100 mL. O volume de mosto foi de 50 mL e o volume da suspensão de leveduras inoculado foi 300 µL, totalizando um volume reacional de 50,3 mL.

Os mostos foram fermentados em um agitador orbital da marca Termo Fisher, na temperatura de 30 °C, sob agitação de 145 rpm, durante 72 h. A concentração inicial de açúcares totais em cada mosto foi de 130 g.L⁻¹. As fermentações foram iniciadas ao mesmo tempo, com o inóculo proveniente da mesma suspensão.

Após a fermentação, cada mosto foi homogeneizado para a leitura da absorbância a 600 nm e determinação da concentração celular final.

4.5 Determinação da Biomassa produzida

Após as fermentações, a concentração celular final foi determinada pelo mesmo método descrito no item 4.2. O mosto foi homogeneizado e foi transferido 100 µL para uma cubeta para espectrofotômetro moldada em poliestireno PS óptico, e completado o volume de 1 mL com água destilada para leitura da absorbância a 600 nm. A leitura do branco foi feita com 100 µL de cada mosto, separadamente, sem adição das leveduras. A absorbância correspondente à concentração celular após a fermentação foi calculada pela diferença entre as absorbâncias dos mostos contendo as leveduras e dos mostos puros. A concentração celular final foi então estimada a partir do valor de absorbância por meio da Equação 1.

A quantidade de biomassa produzida foi calculada pela diferença entre a concentração celular final e a concentração celular inicial do inóculo no mosto.

4.6 Caracterização do mosto de cana-de-açúcar e do mosto fermentado

Todos os compostos orgânicos foram identificados e quantificados utilizando cromatógrafo líquido da marca Shimadzu[®] modelo Prominence, com degaseificador DGU-20A, sistema de bomba LC-20AT, amostrador automático SIL-20A, módulo de comunicação CBM-20A, forno de coluna CTO-20A, com detector de índice de refração RID-20A e detector UV-Vis SPD-20A. O software usado para registro dos cromatogramas foi o LabSolutions LC – HPLC.

4.6.1 Quantificação de açúcares, etanol, glicerol, ácido acético e metanol

Para a quantificação de açúcares, etanol, glicerol e ácido acético da fermentação foi usada a coluna Shim-pack SCR-102HG[®] com coluna de guarda. A análise foi feita em regime isocrático utilizando como fase móvel uma solução de ácido perclórico (HClO₄) 50 mM em fluxo constante de 0,6 mL.min⁻¹. A temperatura do forno ficou fixa em 50 °C. Cada corrida teve duração de 30 min.

As amostras foram preparadas da seguinte maneira: cada mosto foi diluído com água ultrapura Mili-Q[®] por um fator de diluição igual a 21 e filtrado utilizando microfiltro de porosidade 0,22 µm acoplado a uma seringa e transferidos diretamente para os vials de análise.

Já os mostos fermentados foram centrifugados por 2 minutos a 8000 rpm e o sobrenadante foi diluído com um fator de diluição igual a 5 e filtrados utilizando microfiltro de porosidade 0,22 µm acoplado a uma seringa, sendo transferidos diretamente para os vials de análise.

4.6.2 Quantificação de aminoácidos

4.6.2.1 *Desenvolvimento do método*

O cromatógrafo líquido do Laboratório de Engenharia Bioquímica da UFG é equipado com um detector por índice de refração, e um detector ultravioleta. A escolha do método levou em consideração a sensibilidade, a seletividade, bem com as limitações técnicas.

Devido à ausência de um grupo cromóforo ou fluoróforo, que possibilite a detecção direta por UV ou fluorescência, a maioria dos métodos para análise de aminoácidos utilizam algum tipo de derivatização, ou seja, escolhe-se um reagente adequado que tenha propriedades que possibilitem que ele possa ser detectado e que irá reagir com o analito. Essa reação pode ocorrer antes da amostra ser injetada no sistema (pré-coluna) ou depois que os compostos são separados (pós-coluna) (Alterman; Hunziker, 2012).

Para separar misturas complexas como soluções contendo diversos aminoácidos, que são compostos de polaridade semelhante, em geral é necessário o uso de um programa de gradiente para eluição da fase móvel. Conseqüentemente, a detecção ficou restrita ao UV ou fluorescência já que o uso de gradiente não permite a detecção por variação no índice de refração.

Apesar de existirem outras técnicas de quantificação de aminoácidos, a análise em HPLC fase reversa com detector UV é popular devido sua sensibilidade e rapidez, se comparado a outras técnicas específicas para aminoácidos (Alterman; Hunziker, 2012; Cooper; Packer; Williams, 2000).

Alguns dos métodos mais específicos utilizam uma coluna de troca iônica para separar os aminoácidos, seguido da derivatização pós-coluna com algum dos seguintes reagentes: ninidrina, fluorescamina ou o-ftalaldeído (OPA). Entretanto, essa técnica exige um tipo de coluna específica e um aparato após a coluna para a derivatização, tornando o método mais custoso (JÁMBOR; MOLNÁR-PERL, 2009). Já os métodos em fase reversa incluem a derivatização pré-coluna com cloreto de 5-naftaleno-1-sulfonila (Dansyl), Fenil isothiocyanate (PITC), Cloroformiato de 9-fluorenilmetila (FMOC-Cl), carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil (ACQ) e também o o-ftalaldeído (OPA) (Cooper; Packer; Williams, 2000).

Em geral, os principais requisitos para escolha de um reagente de derivatização para HPLC fase reversa são: reagir rapidamente, reação em solução aquosa e temperatura ambiente, preparação simples e de baixo custo, e produtos que tenham alta sensibilidade e seletividade (Jámbor; Molnár-Perl, 2009).

Dentre os reagentes para derivatização pré-coluna para análise de aminoácidos por HPLC de fase reversa citados anteriormente, o fenil isotiocianato (PITC) possui algumas desvantagens, como a necessidade de um sistema de vácuo para evaporar o excesso de reagente, a reação é lenta e possui menor sensibilidade que outros métodos (Jámbor; Molnár-Perl, 2009; Wang et al., 2014).

O método do o-ftalaldeído tem elevada sensibilidade, porém os aminoácidos derivatizados são instáveis, sendo pouco reprodutível se a reação for realizada manualmente, além de ser restrita a aminoácidos primários. Já o Dansyl apresenta problemas na quantificação de alguns aminoácidos pois forma vários compostos

derivados, além de que a reação é pouco efetiva em matrizes complexas, como é o caso do caldo de cana (Jámbor; Molnár-Perl, 2009).

Diante das informações apresentadas, o cloroformiato de 9-fluorenilmetila (FMOC-Cl) foi o reagente de escolha pois satisfaz a maioria dos requisitos para uma boa reação de derivatização (Fabiani *et al.*, 2002; Jámbor; Molnár-Perl, 2009).

A reação ocorreu a partir da mistura de 100 µL de solução de Cloroformiato de 9-fluorenilmetila (Fmoc-Cl) 15 mM, com 100 µL da solução padrão de aminoácidos, 200 µL de tampão borato 0,2 N (pH 10) e 100 µL de acetonitrila, diretamente no vial de análise.

O tampão foi preparado com ácido bórico ajustando-se o pH da solução com hidróxido de sódio (NaOH) 4,0 mol.L⁻¹. A solução estoque de Fmoc-Cl foi preparada pesando-se 0,3482 g de Fmoc-Cl que foi dissolvido em acetonitrila, para um volume de 50 mL. Tanto o tampão quanto o Fmoc-Cl foram armazenados sob refrigeração.

As amostras de caldo de cana foram diluídas com água ultrapura (20x) e filtradas em filtros nylon de porosidade de 0,22 µm. A reação foi conduzida misturando-se os reagentes de forma manual, diretamente no vial, 10 minutos antes de cada análise.

4.6.2.2 Condições cromatográficas

As análises foram feitas de acordo com as seguintes condições: coluna Raptor™ ARC-18 (100 x 4,6 mm, 2,7 µm); fase móvel A: 0,1% ácido fórmico + formiato de amônio 20 mM; fase móvel B: 0,1% ácido fórmico + formiato de amônio 10 mM em acetonitrila:água (90:10). O gradiente de separação está descrito na Tabela 3. O fluxo de eluente foi constante, 0,8 mL.min⁻¹, volume de injeção de amostra igual a 1 µL, temperatura do forno em 30 °C e comprimento de onda de detecção 265 nm para todos os aminoácidos separados.

Tabela 3. Gradiente de eluição para separação de aminoácidos, sendo % A a proporção da fase móvel mais polar e % B a proporção da fase móvel menos polar, em determinado tempo.

Tempo (min)	% A	% B
0,01	63	37

7,50	63	37
15,00	50	50
18,00	50	50
19,00	35	65
20,00	35	65
27,00	63	37
30,00	63	37

Para a identificação dos aminoácidos preparou-se uma solução contendo vários padrões de aminoácidos e soluções desses padrões individuais, de concentração conhecida. Fez-se sucessivas corridas nas condições mencionadas anteriormente, adicionando um aminoácido por vez ao mix em cada corrida.

Como a concentração do analito é proporcional à área do pico, foi possível a identificação de acordo com o tempo de retenção dos seguintes aminoácidos: ácido aspártico (Asp), ácido glutâmico (Glu), alanina (Ala), arginina (Arg), glicina (Gli), metionina (Met), serina (Ser), treonina (Tre) e valina (Val). Entretanto, apenas 7 puderam ser quantificados pois os picos referentes ao Asp e Ser ficaram sobrepostos no cromatograma, o que de acordo com vários testes de otimização do gradiente, seria necessário alterar a seletividade da fase móvel, ou seja, alterar o tipo de solvente orgânico ou o pH da fase móvel a fim de obter uma melhor resolução entre os picos. Em seguida, foi construída uma curva de calibração (Tabela 4) para os aminoácidos que puderam ser separados, com seis níveis de concentração, entre 0,7 mg.L⁻¹ a 135 mg.L⁻¹.

Tabela 4. Curvas de calibração dos aminoácidos, em que X é a concentração de aminoácidos em mg.L⁻¹, (Y) é a área do pico, e R² é o coeficiente de correlação linear.

Aminoácido	Equação	R ²
Arginina	$Y = 1,36489 \times 10^6 (X) - 2448,23$ (2)	0,9995
Ácido Glutâmico	$Y = 2,02405 \times 10^6 (X) - 4108,14$ (3)	0,9994
Treonina	$Y = 2,56180 \times 10^6 (X) - 8714,74$ (4)	0,9976
Glicina	$Y = 3,91134 \times 10^6 (X) - 1387,69$ (5)	0,9994
Alanina	$Y = 3,28567 \times 10^6 (X) - 4035,70$ (6)	0,9987
Metionina	$Y = 2,05429 \times 10^6 (X) - 5444,90$ (7)	0,9980
Valina	$Y = 2,52370 \times 10^6 (X) - 314,882$ (8)	0,9985

4.6.3 Determinação de vitaminas

Como as vitaminas hidrossolúveis absorvem energia na região do espectro ultravioleta, maioria das análises usa um detector de arranjo de diodos que é capaz de trabalhar com vários comprimentos de onda ao mesmo tempo. Entretanto, como foi usado o detector UV, foi necessário ajustar um método para cada comprimento de onda, mas com os demais parâmetros idênticos.

Foi usada a coluna Shimadzu® shim-pack VP-ODS (4,6 mm x 150 mm, 4,6 µm); detector UV-Vis (SPD-20A); fase móvel A: um tampão fosfato 25 mM, pH 5,7 + hexassulfonato de sódio 5 mM e fase móvel B: metanol. O gradiente de separação está descrito na Tabela 5. O fluxo de eluente foi constante, 0,8 mL.min⁻¹, volume de injeção de amostra igual a 5 µL e temperatura do forno em 40 °C. A detecção foi feita nos seguintes comprimentos de onda: 210 nm (Biotina e pantotenato de cálcio), 245 nm (ácido ascórbico), 265 nm (ácido nicotínico e tiamina), 283 nm (ácido para-aminobenzoico) e 290 nm (piridoxina).

Tabela 5. Gradiente de eluição para separação de vitaminas hidrossolúveis, onde % A é a proporção da fase móvel mais polar e % B é a proporção da fase móvel menos polar, em determinado tempo.

Tempo (min)	% A	% B
0,01	95	5
4,00	95	5
13,00	75	25
15,00	75	25
15,01	95	5
20,00	95	5

A identificação dos picos correspondentes a cada uma das vitaminas foi feita a partir do preparo de soluções individuais das vitaminas ou de solução contendo duas vitaminas, nos casos em que era possível observar mais de uma no mesmo comprimento de onda.

A curva de calibração (Tabela 6) foi construída pelo método do padrão externo, com soluções padrão das vitaminas em cinco níveis de concentração para cada vitamina: vitamina B1 4,0 – 9,0 mg.L⁻¹; vitamina B3 3,3 – 101,3 mg.L⁻¹; vitamina B5 4,0 – 204,8 mg.L⁻¹; vitamina B6 3,6 – 109,4 mg.L⁻¹; Vitamina B7 4,4 - 244 mg.L⁻¹; PABA 5,3 – 21,1 mg.L⁻¹;

Tabela 6. Curvas de calibração das vitaminas, em que X é a concentração de vitaminas em mg.L⁻¹, Y é a área do pico, e R² é o coeficiente de correlação linear.

Vitamina	Equação	R ²
Biotina (B7)	$Y = 3508,73(X) + 8242,29$ (10)	0,9999
Pantotenato de cálcio (B5)	$Y = 2896,16(X) - 9963,76$ (11)	0,9991
Ácido ascórbico (C)	$Y = 10481,6(X) - 8793,09$ (12)	0,9999
Ácido nicotínico (B3)	$Y = 8782,45(X) + 8956,06$ (13)	0,9994
Tiamina (B1)	$Y = 8418,41(X) - 61280,0$ (14)	0,9999
Ácido p-aminobenzoico	$Y = 30738,0(X) - 1086,36$ (15)	0,9999
Piridoxina (B6)	$Y = 4832,46(X) + 7513,96$ (16)	0,9998

As amostras foram preparadas centrifugando-se o caldo de cana por 5 min a 10.000 rpm, em seguida o sobrenadante foi reservado e foi diluído (5x) com água ultrapura. Em seguida foi filtrado em membrana de nylon de 0,22 µm, diretamente para os vials.

4.7 Cálculo dos parâmetros fermentativos

4.7.1 Fator de conversão de substrato a células (Y_{X/S})

O fator de conversão de substrato a células é definido como a proporção de substrato que foi convertida a biomassa (Equação 17).

$$Y_{X/S} = \frac{X_F - X_0}{S_0 - S_F} \quad (17)$$

Em que:

X_0 = concentração celular no início da fermentação

X_F = concentração celular ao final da fermentação

S_0 = concentração de substrato no início fermentação

S_F = concentração de substrato ao final da fermentação (açúcar residual)

4.7.2 Fator de conversão de substrato a produto ($Y_{p/s}$)

O fator de conversão de substrato é entendido como a proporção de substrato (açúcares) que foi convertido a produto, nesse caso o etanol, sendo calculado pela Equação 18:

$$Y_{P/S} = \frac{P_F - P_0}{S_0 - S_F} \quad (18)$$

P_0 = concentração de etanol no início da fermentação

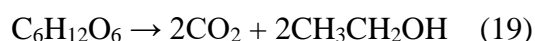
P_F = concentração de etanol ao final da fermentação

S_0 = concentração de substrato no início fermentação

S_F = concentração de substrato ao final da fermentação (açúcar residual)

4.7.3 Eficiência da fermentação

O rendimento teórico (Y_T) da fermentação é calculado a partir da Equação 19 proposta por Gay-Lussac em 1815,



o que significa que para 100 g de sacarose, é produzido 51,11 g de etanol. Portanto a fermentação alcoólica tem um rendimento teórico de 51,1 %.

O rendimento prático (Y_P) é a razão entre a quantidade de etanol obtida após a fermentação e a quantidade inicial de sacarose, como mostra a Equação 20:

$$Y_P (\%) = \frac{\text{g de etanol obtido}}{\text{g de sacarose inicial}} \times 100 \quad (20)$$

A eficiência da fermentação é calculada pela Equação 21:

$$\eta (\%) = \frac{Y_P}{Y_T} \times 100 \quad (21)$$

η = eficiência da fermentação

Y_P = rendimento prático

Y_T = rendimento teórico

4.7.4 Produtividade

A produtividade (ϕ) do etanol é a variação da concentração de etanol no tempo total de fermentação, como mostrado na Equação 22:

$$\phi = \frac{P_F - P_0}{t} \quad (22)$$

Onde:

P_0 = concentração de etanol no início da fermentação

P_F = concentração de etanol ao final da fermentação

t = duração da fermentação

4.8 Análise estatística

Foram calculadas as médias dos parâmetros fermentativos obtidos para cada cultivar e foram comparadas por testes estatísticos. Os dados passaram pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Todos os conjuntos de dados que apresentaram

distribuição normal, foram submetidos à análise de variância de um fator (ANOVA) e teste de Tukey ambos com significância estatística ao nível de 5%. Os softwares usados para as análises foram o Microsoft Excel, Statistica 7.0 e Past 4.03.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Parâmetros Fermentativos

Os açúcares totais contidos nos mostos foram quantificados por HPLC e estão dispostos na Tabela 7. Em geral, a concentração de açúcares no mosto de cana varia entre diferentes variedades da planta e de acordo com a região de cultivo, entre outros fatores (Raby et al., 2023; Ronquillo Blau et al., 2023; Chen et al., 2024).

Tabela 7. Concentração de açúcares totais (somatório da concentração de sacarose, glicose e frutose) nos mostos das cultivares estudadas: RB867515 (M1), RB988082 (M2), RB034045 (M3), RB044108 (M4) e RB074067 (M5).

	M1	M2	M3	M4	M5
Açúcares Totais (g.L ⁻¹)	149,50	131,06	130,38	178,96	220,83

Os resultados fermentativos, em termos de biomassa, concentração de etanol, eficiência de fermentação e produtividade, obtidos após 72h de fermentação dos mostos das cultivares de cana pela *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 estão dispostos na Tabela 8. Os índices que acompanham os valores da Tabela 8 foram obtidos a partir do teste de Tukey. Valores acompanhados da mesma letra não apresentaram diferença estatisticamente significativa ao nível de 5 % ($p > 0,05$), enquanto valores que se diferenciam quanto a letra foram estatisticamente diferentes dos demais ($p < 0,05$).

Tabela 8. Resultados das fermentações realizadas em triplicata, de produção de etanol, fator de conversão de substrato em produto (YP/S), produtividade (\emptyset), eficiência fermentativas (η), concentrações celulares, fator de conversão de substrato a células (YX/S), consumo de açúcares, concentração celular, concentração de glicerol e ácido acético das variedades RB867515 (M1), RB988082 (M2), RB034045 (M3), RB044108 (M4) e RB074067 (M5).

	M1	M2	M3	M4	M5
Etanol					
Final (g.L ⁻¹)	52,18 ± 1,205 ^a	55,49 ± 1,504 ^a	59,35 ± 2,248 ^{ab}	55,501 ± 0,981 ^a	62,71 ± 1,345 ^b
Y _{P/S} (g.g ⁻¹)	0,442 ± 0,013 ^a	0,473 ± 0,013 ^b	0,478 ± 0,019 ^b	0,451 ± 0,008 ^b	0,497 ± 0,01 ^b
ϕ (g.L ⁻¹ h ⁻¹)	0,725 ± 0,017 ^a	0,771 ± 0,021 ^a	0,824 ± 0,031 ^{ab}	0,773 ± 0,014 ^a	0,871 ± 0,019 ^b
η	0,866 ± 0,025 ^a	0,926 ± 0,025 ^a	0,935 ± 0,037 ^a	0,882 ± 0,016 ^a	0,974 ± 0,020 ^b

Biomassa

Final (g.L ⁻¹)	3,35 ± 0,205 ^a	2,23 ± 0,249 ^b	1,86 ± 0,032 ^b	2,36 ± 0,073 ^c	1,74 ± 0,034 ^b
Y _{x/s} (g.g ⁻¹)	0,028 ± 0,002 ^a	0,019 ± 0,002 ^b	0,015 ± 0,0002 ^{bc}	0,019 ± 0,0006 ^b	0,014 ± 0,0003 ^c
Açúcares					
Res. (g.L ⁻¹)	12,017 ± 1,020 ^a	12,775 ± 0,236 ^a	5,741 ± 0,754 ^b	6,483 ± 0,185 ^b	3,939 ± 0,444 ^c
Consumido (g.L ⁻¹)	117,98 ± 1,02 ^a	117,22 ± 0,236 ^a	124,26 ± 0,754 ^b	123,52 ± 0,185 ^b	126,061 ± 0,444 ^c
Glicerol					
Final (g.L ⁻¹)	6,052 ± 0,171 ^a	6,315 ± 0,125 ^{ab}	5,959 ± 0,0008 ^a	5,291 ± 0,412 ^a	4,345 ± 0,355 ^c
Ácido acético					
Final (g.L ⁻¹)	1,268 ± 0,149 ^a	1,299 ± 0,202 ^a	1,451 ± 0,365 ^a	1,253 ± 0,205 ^a	1,144 ± 0,603 ^c

Valores acompanhados da mesma letra e na mesma linha não se diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de significância estatística a 5 %.

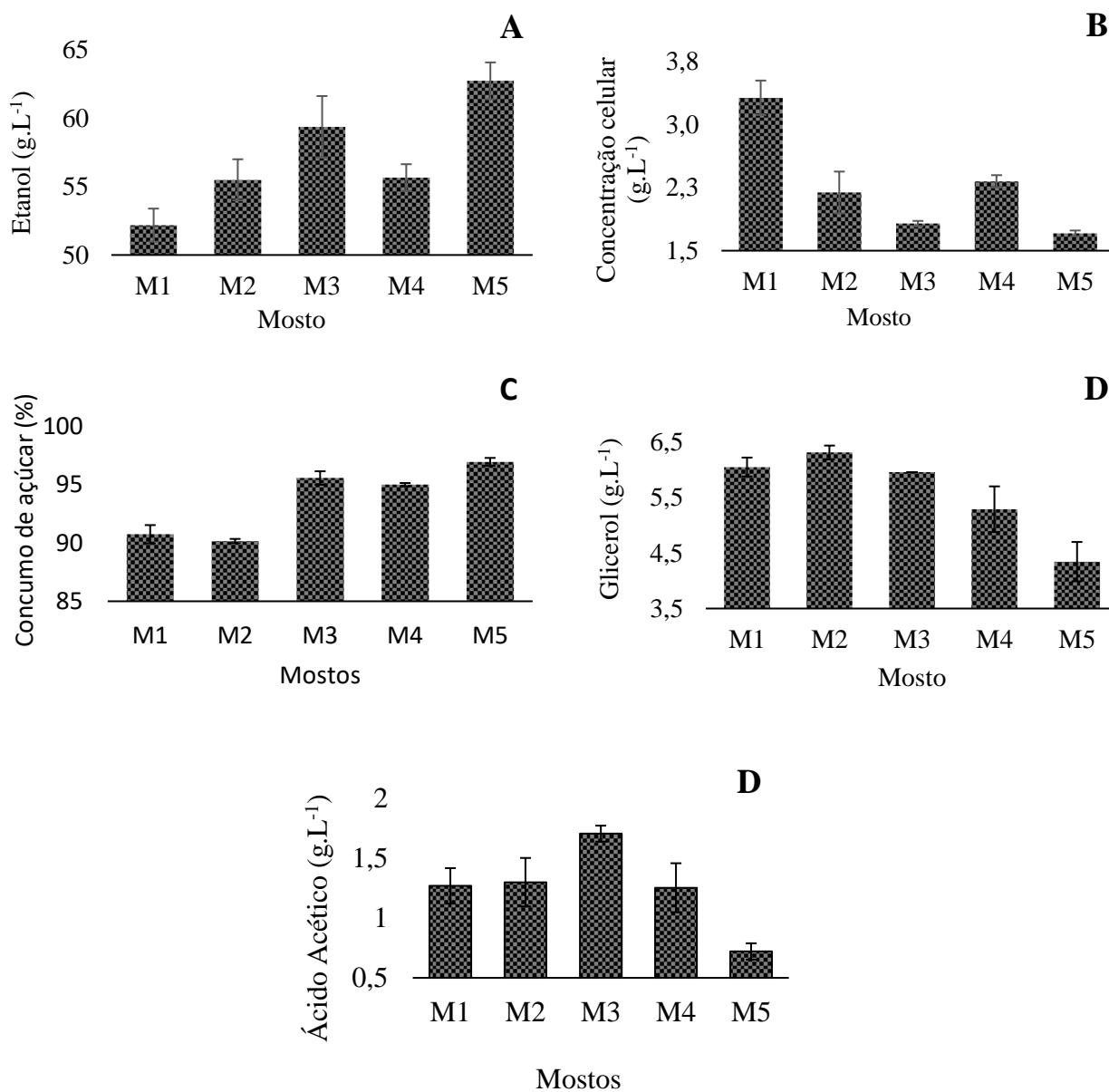
5.1.1 Eficiência de fermentação

A Figura 6 evidencia a comparação dos principais parâmetros fermentativos entre as cinco cultivares estudadas. Observa-se que as leveduras tiveram bom desempenho em todos os mostos, variando de 52,18 g.L⁻¹ no mosto da cultivar RB867515 (M1) a produção máxima de 62,71 g.L⁻¹ no mosto da cultivar RB074067 (M5). A segunda concentração mais alta de etanol foi produzida a partir do mosto da RB034045 (M3), sendo de 59,35 g.L⁻¹. RB988082 (M2) e RB044108 (M4) apresentaram respectivamente concentrações de 55,49 e 55,50 g.L⁻¹. A partir do teste de Tukey ao nível de 5% de significância estatística ($p < 0,05$), observou-se que RB867515 (M1), RB988082 (M2) e RB044108 (M4) não tiveram diferenças significativas com relação a eficiência de fermentação. Do mesmo modo, as duas cultivares com maior produção de etanol, RB074067 (M5) e RB034045 (M3), não tiveram diferença estatisticamente significativa entre si, mas diferiram das demais.

5.1.2 Fator de conversão de substrato em produto

Considerando o fator de conversão de substrato em produto (Y_{p/s}), as leveduras mostraram boas conversões em todos os mostos, variando entre 0,442 g.g⁻¹ em RB867515 (M1) a 0,497 g.g⁻¹ em RB074067 (M5).

Figura 6. Comparativo dos resultados de concentração de etanol (A), concentração celular (B), açúcar consumido (C), concentração de glicerol (D) e concentração de ácido acético (D) das variedades RB867515 (M1), RB988082 (M2), RB034045 (M3), RB044108 (M4) e RB074067 (M5).



OLIVEIRA *et al.* (2004) classificam o fator de conversão de substrato em produto em baixa conversão para valores inferiores a 0,41 g.g⁻¹, média conversão entre 0,41 e 0,44 g.g⁻¹, e alta acima de 0,45 g.g⁻¹. Sendo assim, RB867515 (M1) proporcionou conversão inferior de açúcares em etanol e todas as demais cultivares proporcionaram alta conversão. De fato, observa-se na Tabela 8 que apenas o Yp/s da cultivar RB867515 (M1) diferenciou-se estatisticamente dos demais, pelo teste de Tukey a 5% de significância ($p < 0,05$).

5.1.3 Produtividade

A produtividade da fermentação (ϕ) em $\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$, variou de 0,725 em M1 (RB867515) a 0,871 em M5 (RB074067), valores que estão próximos aos encontrados como resultado de fermentações nas mesmas condições de temperatura, agitação, e duração utilizando a *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 (Santos et al., 2020; dos Santos; Silva; Castiglioni, 2021).

O mosto que proporcionou a maior produtividade, RB074067 (M5), foi estatisticamente diferente dos demais exceto a RB034045 (M3) com produtividade igual a 0,824 $\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

5.1.4 Eficiência de fermentação

Em média a eficiência das usinas encontra-se em torno de 91% (dos Santos; Silva; Castiglioni, 2021) e experimentos laboratoriais utilizando a cepa PE-2 como cultura pura mostram eficiências de 90,0 %, 83,6 %, 81,2 % (Soares-Costa et al., 2014; Santos et al., 2020; dos Santos; Silva; Castiglioni, 2021).

No presente estudo, a mesma cepa apresentou eficiências similares à literatura, sendo a mais baixa em M1 (RB867515), 86,6%, seguida por M4 (RB044108), 88,2%. As eficiências em M2 (RB988082) e M3 (RB034045) foram acima da média, 92,6 e 93,5 % respectivamente, enquanto em M5 (RB074067) foi obtida uma eficiência muito boa de conversão de substrato em etanol, 97,4 % que se diferencia estatisticamente do menor valor de eficiência pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Na safra de 2022/2023, a RB867515 foi a variedade mais utilizada no Brasil pelo 16º ano consecutivo. Em Goiás, essa mesma cultivar esteve também em primeiro lugar em termos plantio e de colheita. Há um uso intensivo no estado de variedades antigas oriundas de cruzamentos realizados há mais de 29 anos pelos programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar, evidenciando a necessidade de substituição dessas variedades por outras de liberação mais recente. A diversificação das variedades plantadas é desejável, pois minimiza o risco de perdas provocadas pelo surgimento de doenças da cana (Braga Junior *et al.*, 2023).

Uma usina que produz anualmente 130 milhões de litros de etanol por ano considerando a eficiência da fermentação alcoólica de RB867515, a que é a variedade mais plantada no país, teria um aumento de 13 milhões de litros/ano substituindo-se a RB867515 pela cultivar que apresentou a maior eficiência de fermentação, RB074067.

Fazendo-se uma estimativa a partir do indicador semanal de preço do etanol hidratado do CEPEA/ESALQ, utilizando o valor do litro fechado no dia 16/02/2024 a R\$ 2,130, um aumento de 10% na eficiência de fermentação como observado ao comparar a variedade RB074067 com a cultivar mais plantada, RB867515, equivaleria a um ganho de R\$ 27.690.000,00 (Cepea/Esalq, 2024).

5.1.5 Biomassa

Observa-se que no mosto M1 (RB867515) a produção de biomassa celular foi maior que nos demais, $3,35 \text{ g.L}^{-1}$, inversamente à produção de etanol. Da mesma forma, o mosto em que foi produzido a maior concentração de álcool, M5 (RB074067) foi onde houve o menor crescimento celular, $1,74 \text{ g.L}^{-1}$, diferenças estas confirmadas pelo teste de Tukey a 5 % de significância.

Em geral o crescimento celular está associado à capacidade das células realizarem a fermentação alcoólica de forma eficiente. Entretanto, investigações feitas em mosto de vinho não encontraram correlação entre o aumento da população celular e a atividade fermentativa, sendo que o crescimento celular nem sempre resulta em boa capacidade fermentativa (Kemsawasd et al., 2015). No presente trabalho, essa última hipótese parece se confirmar pois no mosto onde houve o maior crescimento celular houve menor produção de etanol, indicando que o substrato foi direcionado majoritariamente à produção de etanol, e em menor quantidade à produção de biomassa celular.

5.1.6 Consumo açúcar

A utilização eficaz de açúcar pela *Saccharomyces cerevisiae* é indispensável para sua versatilidade industrial (Raby et al., 2023).

A fermentação teve início com concentração de açúcares totais igual a 130 g.L⁻¹ em todos os mostos. Entretanto, a quantidade de açúcares consumidos foi diferente entre as cultivares. A variedade RB074067 (M5) teve 97% dos açúcares totais (sacarose, frutose e glicose) consumidos pelas leveduras enquanto RB867515 (M1) e RB988082 (M2) tiveram a maior quantidade de açúcar residual, não consumido pelas leveduras. RB034045 (M3) foi semelhante a M5, e RB044108 (M4) apresentou um desempenho intermediário. Essas diferenças foram confirmadas pelo teste de Tukey, com 5% de significância (Tabela 8).

5.1.7 Glicerol

O mosto M2 (RB988082) levou a uma maior produção de glicerol pelas leveduras, 6,31 g.L⁻¹, seguido por M1 (RB867515), com 6,05 g.L⁻¹, sem diferença estatística entre essas duas cultivares. Em M4 (RB044108) houve uma produção intermediária de 5,29 g.L⁻¹ que foi significativamente diferente ($p < 0,05$) das maiores concentrações e da menor, encontrada em M5 (RB074067), 4,35 g.L⁻¹, valores que foram semelhantes aos encontrados na literatura em condições normais de fermentação (Berovic *et al.*, 2007).

O glicerol está relacionado a uma resposta à alteração do equilíbrio redox da célula e como resposta ao estresse osmótico devido a elevada concentração de açúcar. Segundo estudo feito com *Saccharomyces cerevisiae* (Berovic *et al.*, 2007) na fermentação de mosto de uva, em condições normais de fermentação as leveduras produzem em média 4 g.L⁻¹ de glicerol, enquanto sob condições de estresse a concentração de glicerol chega a 7 g.L⁻¹ (Berovic *et al.*, 2007; Mueller *et al.*, 2019).

O etanol compartilha a mesma rota bioquímica do glicerol: o primeiro origina-se a partir da conversão do piruvato, que é o produto final da glicólise. O glicerol é formado por um desvio durante a glicólise. Isso significa que há redução da produção de etanol caso haja acúmulo de glicerol e, portanto, este pode ser considerado um fator de inibição ou limitante da fermentação alcoólica (Mueller *et al.*, 2019).

De fato, o mosto em que houve a maior produção de etanol, M5 (RB074067), teve a menor produção de glicerol entre todas as cultivares. Inversamente, os mostos que apresentaram as menores concentrações de etanol, M1 (RB867515) e M2 (RB988082),

tiveram as maiores concentrações de glicerol, sem diferença estatística entre essas duas cultivares ($p < 0,05$).

5.1.8 Ácido acético

Altas concentrações de ácido acético são tóxicas para a *S. cerevisiae*, e estão relacionadas a inibição do crescimento e da atividade metabólica como o consumo de glicose (Giannattasio *et al.*, 2013; Guaragnella; Bettiga, 2021).

Não houve diferença ao nível de significância estatística ($p > 0,05$) na concentração de ácido acético produzida pelas leveduras nos mostos M1 (RB867515), M2 (RB988082), M3 (RB034045) e M4 (RB044108). Entretanto, observa-se que a menor concentração, encontrada em M5 (RB074067), difere estatisticamente das demais, com 5% de significância ($p < 0,05$), concordando com os demais parâmetros desse mosto – alta produção de etanol e baixa produção de glicerol.

A atividade de vias metabólicas envolvidas na produção de glicerol e ácidos orgânicos tem mostrado ser dependente da fonte de nitrogênio e sua concentração (Crépin *et al.*, 2012).

5.2 Quantificação de Aminoácidos

A Tabela 9 apresenta as concentrações de aminoácidos encontradas nas cinco variedades de cana-de-açúcar estudadas neste trabalho.

O ácido glutâmico (Glu) foi encontrado apenas no mosto da cultivar RB034045 (M3), na concentração de 2,72 mg.L⁻¹. Esse aminoácido é utilizado na produção de ácido succínico nos estágios iniciais da fermentação alcoólica e atua como intermediário no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e outras vias metabólicas adjacentes (Torres-Guardado *et al.*, 2023).

A alanina (Ala) foi encontrada em concentrações próximas em todos os mostos, entre 4,54 e 6,45 mg.L⁻¹, exceto em M4 (RB044108), onde foi encontrada uma concentração de 36,17 mg.L⁻¹. A alanina está envolvida na biossíntese de tirosina e fenilalanina pela

levedura. O excesso de alanina pode estar relacionado a taxa de fermentação lenta (Rollero *et al.*, 2019).

Tabela 9. Concentração de aminoácidos no mosto das cultivares RB867515 (M1), RB988082 (M2), RB034045 (M3), RB044108 (M4) e RB074067 (M5).

Aminoácido	M1	M2	M3	M4	M5
	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)
Ác. glutâmico	ND	ND	2,72	ND	ND
Alanina	4,54	4,07	6,45	36,17	4,87
Arginina	404,0	138,3	215,7	704,7	244,5
Glicina	1,84	1,09	1,63	6,17	1,07
Metionina	5,08	1,24	ND	3,32	ND
Treonina	7,91	4,81	7,38	20,11	7,39
Valina	8,87	2,05	4,51	11,80	ND

ND = Não detectado pelo método utilizado.

A arginina foi quantificada em todos os mostos estudados e em concentrações significativamente superior que os demais aminoácidos, entre 138,3 mg.L⁻¹ em RB988082 (M2) a 704,7 mg.L⁻¹ em RB044108 (M4). Essa variação ocorre entre diferentes cultivares, pois, a composição química da planta pode variar de acordo com o solo da região de cultivo, o uso de fertilizantes, entre outros fatores (Arif *et al.*, 2019; Koubaa; Barba; Roohinejad, 2021). Em mostos de uva por exemplo, a concentração de arginina pode variar numa faixa de 13,56 a 1616,56 mg.L⁻¹ dependendo da região de plantio e da cultivar (Petrovic; Aleixandre-Tudo; Buica, 2019).

A maior concentração de glicina (Gli) foi encontrada em M4 (RB044108) sendo de 6,17 mg.L⁻¹. Os demais mostos tiveram concentração de Gli entre na faixa de 1,07 mg.L⁻¹ em RB074067 (M5) a 1,84 mg.L⁻¹ em RB867515 (M1). Estudos indicaram que a glicina atua como um protetor contra o estresse osmótico, o que aumenta a tolerância da *S. cerevisiae* ao etanol na presença de alta concentração de açúcares (Karuna *et al.*, 2023).

A metionina foi quantificada nos mostos em diferentes concentrações, em ordem decrescente: 5,08 mg.L⁻¹ em M1 (RB867515); 3,32 mg.L⁻¹ em M4 (RB044108); 1,24 mg.L⁻¹ em M2 (RB988082). Entretanto, não foi detectada em M3 e M5. Está relacionada com mecanismos de crescimento celular e autofagia (Walvekar; Laxman, 2019).

A treonina, assim como alanina e glicina, foi encontrada em M4 (RB044108) na concentração de 20,11 mg.L⁻¹, quase três vezes maior que nas demais cultivares, como mostrado na Tabela 7.

A valina não apresentou uniformidade entre os mostos, sendo a concentração máxima em M4 (RB044108), de 11,80 mg.L⁻¹ e não foi detectada no mosto da cultivar RB074067 (M5).

5.2.1 Consumo de aminoácidos durante a fermentação alcoólica

A Tabela 10 mostra a concentração de aminoácidos quantificados nos mostos das cinco cultivares no início e ao final da fermentação. As leveduras usam preferencialmente a fonte de nitrogênio que permite o melhor crescimento através de um mecanismo de regulação conhecido como Repressão Catabólica de Nitrogênio (*Nitrogen Catabolite Repression* – NCR) (Torres-Guardado *et al.*, 2023). Esse mecanismo opera em vários níveis, pela repressão da transcrição de genes que codificam permeases de membrana que fazem o transporte de aminoácidos ou pela inativação seletiva (desfosforilação) dos produtos correspondentes e subsequente degradação, cujo objetivo é prevenir a assimilação de fontes não preferenciais de nitrogênio se fontes preferenciais estiverem disponíveis, induzindo a utilização das consideradas melhores (Miranda Júnior *et al.*, 2009; Crépin *et al.*, 2012).

Observa-se que os aminoácidos Arg, Glu, Met e Val, quando presentes no mosto, foram totalmente consumidos pelas leveduras. Isso sugere que a incorporação desses aminoácidos pela *S. cerevisiae* PE-2 independe da concentração inicial no meio fermentativo.

De fato, a *Saccharomyces cerevisiae* assimila facilmente o nitrogênio exógeno como aminoácidos e os direciona para rotas de síntese de outros aminoácidos quando necessário, ao contrário de outros microrganismos como a *K. marxianus* que captura apenas certos aminoácidos para suprir requisitos específicos, resultando em baixa ou nenhuma assimilação de outros aminoácidos que não atendam a essas necessidades (Rollero *et al.*, 2019).

Tabela 10. Concentração de aminoácidos no mosto das variedades de cana-de-açúcar RB867515 (M1), RB988082 (M2), RB034045 (M3), RB044108 (M4) e RB074067 (M5), antes (inicial) e depois da fermentação alcoólica (final).

Aminoácido	M1		M2		M3		M4		M5	
	Inicial (mg.L ⁻¹)	Final (mg.L ⁻¹)	Inicial (mg.L ⁻¹)	Final (mg.L ⁻¹)	Inicial (mg.L ⁻¹)	Final (mg.L ⁻¹)	Inicial (mg.L ⁻¹)	Final (mg.L ⁻¹)	Inicial (mg.L ⁻¹)	Final (mg.L ⁻¹)
Ác. glutâmico	0,00	0,00	0,00	0,00	2,72	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Alanina	3,96	0,00	4,07	1,70	6,45	0,00	26,42	0,00	2,87	0,00
Arginina	352,5	0,00	138,3	0,00	215,7	0,00	514,6	0,00	144,5	0,00
Glicina	1,61	0,70	1,08	2,33	1,62	0,73	4,50	0,00	0,63	1,12
Metionina	4,43	0,00	1,24	0,00	0,00	0,00	2,43	0,00	0,00	0,00
Treonina	6,89	5,54	4,80	0,00	7,37	4,62	14,69	0,00	4,36	4,40
Valina	7,73	0,00	2,05	0,00	4,51	0,00	8,61	0,00	0,00	0,00

A arginina foi totalmente consumida em todos os mostos. Esse resultado concorda com a investigação de Aquino et al. (2008) onde a média de concentração de arginina após a fermentação alcoólica por *S. cerevisiae* foi menor que 0,008 mg.L⁻¹, e ainda sendo encontrada em menos de 50 % do total de amostras.

Rollero et al. (2019) avaliaram o perfil de consumo de alguns aminoácidos durante a fermentação alcoólica de mosto de uva por *S. cerevisiae* EC1118. Todo o conteúdo de arginina disponível foi esgotado ao longo da fermentação. Durante a fase de crescimento, arginina representou aproximadamente 13% do nitrogênio capturado pela levedura e o nitrogênio inorgânico (amônia) 35% até atingir um quarto da população celular máxima e a contribuição da arginina aumentou para 30% quando a população máxima foi alcançada, enquanto a proporção de nitrogênio inorgânico (amônia) caiu consideravelmente para menos de 1% (Rollero et al., 2019).

Esses resultados evidenciam que parte da arginina atua no crescimento celular incorporando-se às proteínas e que concorda com o resultado encontrado no presente trabalho onde as maiores concentrações de biomassa encontradas foram nos mostos M1 (RB867515) e M4 (RB044108) respectivamente, onde foram encontradas as maiores concentrações iniciais de arginina.

Foi demonstrado em outros trabalhos que o consumo de açúcares é alterado na presença de ácido glutâmico, podendo ser aumentado ou reduzido a depender da cepa, tendo ocorrido variabilidade entre, inclusive entre duas cepas de *S. cerevisiae* (Kemsawasd et al., 2015; Torres-Guardado et al., 2023).

Sendo assim, o ácido glutâmico presente no mosto da cultivar RB034045 (M3), parece não alterar o consumo de açúcares pela cepa PE-2, pois as leveduras desse mosto apresentaram alto consumo de açúcar, sem diferença estatística ($p < 0,05$) do mosto que proporcionou o maior consumo de açúcar, M5 (RB074067), onde não foi encontrado ácido glutâmico.

A metionina foi totalmente consumida nos mostos em que esteve presente: M1 (RB867515), M2 (RB988082) e M4 (RB044108). Foi observado em estudos realizados por Walvekar et al. (2019) com *S. cerevisiae* que a abundância de metionina no meio pode inibir a autofagia e aumentar o anabolismo e a proliferação celular, enquanto a restrição de metionina implica no aumento da vida útil da célula. Esse resultado foi obtido também para outros organismos como *Drosophila* (Walvekar; Laxman, 2019).

De acordo com essas observações, a ausência de metionina nos mostos M3 (RB034045) e M5 (RB074067) implicaria numa taxa de proliferação celular menor, podendo ser uma das causas da baixa concentração celular obtida nesses mostos, entretanto as células teriam boa longevidade pois foram capazes de realizar a fermentação alcoólica com alta eficiência.

A valina pode ser sintetizada pelas leveduras e origina-se do piruvato. Apenas uma pequena fração da valina exógena é diretamente incorporada na biomassa como constituinte de proteínas, pois o catabolismo desse aminoácido gera precursores que são usados por um número limitado de rotas biossintéticas. O esqueleto carbônico derivado da reação de transaminação da valina em geral é recuperado em leucina, aminoácido sintetizado a partir de uma rota relacionada (Rollero *et al.*, 2019).

Pela avaliação dos parâmetros obtidos na fermentação dos mostos das cinco cultivares de cana-de-açúcar, pode-se dizer que a presença de Val no meio fermentativo não é obrigatória para uma boa eficiência de fermentação pois o mosto que levou à máxima eficiência de conversão do substrato em etanol não continha esse aminoácido. Entretanto, a valina foi totalmente consumida nos mostos das variedades de cana que esteve presente.

Apenas três aminoácidos tiveram diferentes perfis de consumo: treonina (Tre), glicina (Gli) e alanina (Ala). Em alguns mostos foram encontradas concentrações finais de Gli e Tre maiores que as iniciais, sugerindo uma produção desses aminoácidos durante a fermentação.

A alanina foi totalmente consumida em todos os mostos, com exceção de M2 (RB988082). A presença desse aminoácido pode estar relacionada a uma taxa de fermentação lenta em *Kluyveromyces marxianus*. Baixa velocidade de fermentação pode resultar em acúmulo de piruvato que pode ser facilmente convertido em alanina, por uma reação de transaminação. Tendo a Ala intracelular em quantidades suficientes, a célula não terá tanta necessidade de assimilação do meio extracelular (Rollero *et al.*, 2019).

O consumo de glicina apresentou grande variabilidade entre os mostos. Foi totalmente consumida apenas em M4 (RB044108), parcialmente em M1 (RB867515) e M3 (RB034045), mostrando consumo de 56% e 55% respectivamente, e em M2 (RB988082) e M5 (RB074067) houve aumento da concentração desse aminoácido ao final da fermentação.

Após a incorporação da Gli pelas células da levedura através da permease de aminoácidos Gap1, é usada como componente de proteínas ou clivada em unidades amino ou carboxil pelo Sistema de Clivagem da Glicina (SCG) (Ferdouse *et al.*, 2019). A glicina também pode ser obtida através da biossíntese a partir da serina. Alguns microrganismos especializados são capazes de sintetizar glicina a partir de compostos 1C (um carbono) como CO₂ (Bysani *et al.*, 2024).

Os resultados obtidos concordam com a literatura mostrando que em alguns mostos houve a incorporação da glicina exógena e em outros houve a biossíntese desse aminoácido. De acordo com a Tabela 10, sugere-se que quanto maior a concentração de glicina no meio fermentativo maior o consumo e quanto menor a concentração, menor a proporção incorporada do meio extracelular, até que em concentrações muito baixas a biossíntese tem preferência.

O perfil de consumo de treonina nos mostos foi variável, desde seu consumo total em M2 (RB988082) e M4 (RB044108), parcialmente consumida em M1 (RB867515) e M3 (RB034045), sendo 20% e 37% respectivamente, e em M5 (RB074067) não foi assimilada pelas leveduras.

Alguns trabalhos mencionam que a glutamina (Gln) e asparagina (Asn) são fontes preferenciais de nitrogênio enquanto prolina (Pro) como o único aminoácido não preferencial para leveduras do gênero *Saccharomyces* (Magasanik; Kaiser, 2002b); outros citam como fontes preferenciais Asp, Tre, Glu, Leu, His, Met, Ile, Ser, Gln, Fen e como não preferenciais, Ala, Arg, Gli (Crépin *et al.*, 2012). Experimentos de Kemsawasd *et al.*,

(2015) mostram que apenas a lisina (Lis) é uma fonte não preferencial de nitrogênio, enquanto Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Ile, Leu, Fen, Ser, Tre e Val seriam fontes preferenciais de nitrogênio, proporcionando a máxima taxa de crescimento celular.

No presente trabalho, Arg, Glu, Met e Val parecem ser fontes preferenciais de nitrogênio para a *S. cerevisiae* PE-2 já que foram totalmente consumidos em todos os mostos, enquanto Ala, Tre e Gli seriam consumidos após esgotarem-se os aminoácidos preferenciais.

A Tabela 11 compara a concentração total de aminoácidos em cada mosto. Observa-se que a maior quantidade de aminoácidos foi encontrada no caldo da cultivar RB044108.

Tabela 11. Concentração total, concentração residual e consumo total de aminoácidos no mosto das variedades de cana-de-açúcar RB867515 (M1), RB988082 (M2), RB034045 (M3), RB044108 (M4) e RB074067 (M5).

Mosto	Aminoácidos		
	Total (mg.L ⁻¹)	Residual (mg.L ⁻¹)	Consumo (mg.L ⁻¹)
M1 (RB867515)	377,1	6,24	370,9
M2 (RB988082)	151,6	2,79	148,8
M3 (RB034045)	238,4	5,35	233,0
M4 (RB044108)	571,3	0,00	571,3
M5 (RB074067)	152,3	5,00	147,3

Entretanto, apenas uma concentração elevada de aminoácidos não parece ser um fator determinante do bom desempenho da fermentação alcoólica, já que todos os aminoácidos quantificados nesse mosto foram consumidos no decorrer da fermentação mostrou a menor eficiência de produção de etanol.

Ao contrário, o mosto com menor concentração de aminoácidos, M5 (RB074067), mostrou maior eficiência de fermentação, além de restar uma quantidade de aminoácidos residuais que não foram consumidos. Essa hipótese é suportada pelo fato de que nem todos os aminoácidos permitem o crescimento microbiano de forma eficaz e alguns deles são capturados preferencialmente a outros (Crépin *et al.*, 2012).

As diferenças observadas nos parâmetros fermentativos das cinco cultivares de cana-de-açúcar podem ser atribuídas em parte à variação da composição química de

aminoácidos nos mostos, considerando que a interação mútua dos dois principais nutrientes para a levedura (carbono e nitrogênio) tem papel importante no seu metabolismo, como já foi descrito que as permeases de transporte de aminoácidos são reguladas pela repressão catabólica do nitrogênio. Sendo assim, os aminoácidos influenciam nos produtos primários e secundários da glicólise por ser a eles atribuídas funções na regulação do transporte, metabolismo e acúmulo de açúcar pela levedura (Miranda Júnior *et al.*, 2009; Petrovic; Aleixandre-Tudo; Buica, 2019).

5.3 Quantificação de Vitaminas Hidrossolúveis

As vitaminas hidrossolúveis que foram quantificadas nos caldos das variedades de cana estudadas estão dispostas na Tabela 12. No caldo de cana, o conteúdo de vitaminas decresce com o tempo, dependendo do método de armazenamento empregado. Em temperaturas de 25 °C, a quantidade de vitaminas sofre diminuição acentuada. Porém quando armazenado a 4 °C o decréscimo é mais lento (Arif *et al.*, 2019). As amostras de caldo de cana no presente trabalho foram armazenadas sob refrigeração a – 18 °C, portanto, considera-se que as vitaminas foram conservadas no período de armazenamento.

A concentração de vitaminas nos mostos foi semelhante ao conteúdo de vitaminas do jagra, um adoçante (em inglês *jaggery*) produzido a partir da concentração do caldo de cana onde são preservadas as vitaminas e outros compostos orgânicos (Bashir; Younis; Yousuf, 2023).

A vitamina B1 (tiamina) costuma ser encontrada na faixa de 0,01 - 0,05 mg.L⁻¹ no caldo de cana concentrado (Sharifi-Rad *et al.*, 2023). Essa vitamina não foi detectada nas cinco cultivares, podendo estar abaixo dos limites de detecção do método utilizado. O ácido para-aminobenzoico (pABA) e a vitamina B5 (pantotenato de cálcio) não foram detectados nos mostos M3 (RB034045) e M5 (RB074067). A vitamina B7 (biotina) foi detectada e quantificada em todos os mostos, exceto em M4 (RB044108). A vitamina B6 foi encontrada apenas em M5 (RB074067).

Tabela 12. Concentração de vitaminas do complexo B quantificadas nos mostos das cultivares de cana-de-açúcar RB867515 (M1), RB988082 (M2), RB034045 (M3), RB044108 (M4) e RB074067 (M5).

Vitamina	M1	M2	M3	M4	M5
	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)
B1	ND	ND	ND	ND	ND
B3	0,61	ND	ND	0,39	0,74
B5	5,59	10,91	0,08	7,28	244,5
B6	ND	ND	ND	ND	1,23
B7	0,43	2,97	ND	3,26	2,47
PABA	0,13	0,10	ND	0,52	ND

ND = Não detectado pelo método utilizado.

A quantificação das vitaminas no mosto fermentado das cultivares de cana é mostrada na Tabela 13. Todos os fermentados tiveram concentrações de vitaminas mais elevadas do que os respectivos mostos (antes da fermentação), sugerindo que houve um processo de produção de vitaminas durante a fermentação.

Tabela 13. Concentrações de vitaminas do complexo B no mosto das variedades de cana-de-açúcar RB867515 (M1), RB988082 (M2), RB034045 (M3), RB044108 (M4) e RB074067 (M5), antes (inicial) e depois da fermentação alcoólica (final).

Vitamina	M1		M2		M3		M4		M5	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)
B1	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
B3	0,53	2,74	0,00	1,05	0,00	5,35	0,28	19,18	0,43	15,72
B5	4,87	55,19	10,91	25,28	0,08	77,50	5,32	129,5	0,00	33,17
B6	0,00	3,26	0,00	3,26	0,00	1,66	0,00	4,366	0,73	0,88
B7	0,38	73,06	2,97	19,20	0,00	35,32	2,38	9,94	1,46	5,34
PABA	0,11	1,32	0,10	0,73	0,00	3,278	0,38	1,57	0,00	1,58

A Tabela 14 evidencia a produção de vitaminas pela *Saccharomyces cerevisiae* PE-2, nos mostos das cinco cultivares de cana estudadas.

Muitos microrganismos são capazes de produzir e acumular certos compostos dependendo das condições nutricionais do substrato oferecido. Leveduras oleaginosas acumulam lipídeos no meio fermentativo quando se oferece uma fonte extra de carbono e restrição de nitrogênio; *Saccharomyces cerevisiae* é usada para produzir em larga escala

certos hormônios como glucagon, insulina e hormônio do crescimento (para humanos) e hirudina, um anticoagulante (Koubaa; Barba; Roohinejad, 2021).

Tabela 14. Produção de vitaminas pela levedura *S. cerevisiae* PE-2, no mosto das diferentes variedades de cana-de-açúcar RB867515 (M1), RB988082 (M2), RB034045 (M3), RB044108 (M4) e RB074067 (M5).

Vitamina	M1	M2	M3	M4	M5
	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)	(mg.L ⁻¹)
B1	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00
B3	2,20	1,05	5,35	18,89	15,29
B5	50,32	14,36	77,42	124,1	33,17
B6	3,26	3,265	1,66	4,36	0,15
B7	72,68	16,22	35,3	7,56	3,88
PABA	1,21	0,62	3,27	1,19	1,58

A *Saccharomyces cerevisiae*, por ser um microrganismo modelo muito bem estudado, tem sido cada vez mais explorada para produção industrial de vitaminas, tanto pela investigação de substâncias que ao serem adicionadas no meio atuam como substrato ou que influenciam uma rota metabólica específica, quanto por meio de modificações no genoma microbiano (Stambuk et al., 2009; Zhou et al., 2021; Rocchi et al., 2023).

No estudo de (Stambuk *et al.*, 2009), o genoma das leveduras industriais mais utilizadas na produção de etanol no Brasil, dentre elas a PE-2, foi comparado com outras cepas não industriais. Foram identificados 72 genes que mostraram um número de cópias alterados exclusivamente nas leveduras usadas na fabricação do etanol. Especialmente os genes SNO e SNZ, que codificam proteínas que fazem parte de um complexo enzimático envolvido na síntese da forma biologicamente ativa da vitamina B6, estão amplificados nas leveduras industriais de etanol. A forma biologicamente ativa da vitamina B6 (piridoxal-5'-fosfato), além de suas funções específicas, serve de precursor para produção da vitamina B1 (tiamina), que forma o cofator tiamina pirofosfato, que tem papel importante na utilização do açúcar pela *S. cerevisiae*, particularmente para a fermentação alcoólica (Stambuk *et al.*, 2009). Entretanto, sabe-se que a presença de tiamina no meio fermentativo tem um efeito negativo na fase inicial de crescimento das células. Experimentos confirmaram que a presença de tiamina num meio com falta de piridoxina reduz severamente a taxa de crescimento das leveduras. Em contraste, no experimento descrito anteriormente as cepas industriais tiveram máxima taxa de crescimento

independente da presença ou ausência de tiamina no meio, indicando que a biossíntese na cepa industrial supre a demanda celular e regula o transporte de vitaminas do meio externo (Stambuk *et al.*, 2009).

Portanto, a *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 aparentemente é capaz de suprir a própria demanda por vitaminas por meio da biossíntese, mostrando-se promissora para a separação e aproveitamento desses produtos que tem alto valor agregado.

6. CONCLUSÃO

A partir da quantificação dos açúcares totais, aminoácidos e vitaminas nos mostos das variedades de cana-de-açúcar RB867515, RB988082, RB034045, RB044108 e RB074067 foi observado variação na composição desses nutrientes entre as diferentes cultivares.

Após a realização dos ensaios fermentativos utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 por meio de análise estatística e comparação da produção de etanol entre as variedades de cana estudadas, observou-se que todas apresentaram boa eficiência na fermentação alcoólica.

Em especial, a cultivar RB074067, que obteve eficiência de 97,4 %, acima do valor médio obtido nas usinas (91%). Além disso, outros parâmetros foram satisfatórios para essa cultivar, como o elevado consumo de açúcares no decorrer da fermentação, a baixa produção de glicerol e ácido acético, e a menor concentração de biomassa produzida. Tudo isso indica que a maior parte dos açúcares assimilados foram destinados à produção de etanol, e, portanto, pode-se considerar que a RB074067 poderá se tornar preferencial para produção industrial de etanol nos próximos anos.

A partir da quantificação de aminoácidos e vitaminas no mosto fermentado, observou-se que as cultivares apresentaram variações no consumo de aminoácidos, sendo que Arg, Glu, Met e Val foram totalmente consumidos em todos os mostos, enquanto Ala, Gli e Tre mostraram perfil de consumo variável. Em relação à concentração total de aminoácidos em cada cultivar, apenas uma alta concentração desses nutrientes não implica em máxima eficiência de fermentação, já que a variedade de cana que apresentou maior eficiência na produção de etanol, RB074067, foi o mosto com a menor concentração de aminoácidos totais disponíveis além de representar o menor consumo percentual.

As concentrações finais das vitaminas do complexo B foram superiores às concentrações iniciais, indicando que houve produção de vitaminas pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 em todos os mostos, porém com quantidades variáveis dependendo da cultivar de cana utilizada. Essa cepa é amplamente utilizada nas usinas de etanol do Brasil, estando adaptada às condições intensas de estresse a que estão

submetidas no ambiente industrial, sendo capaz de suprir a própria demanda de vitaminas por meio da biossíntese.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dada a significância do etanol no cenário brasileiro, este estudo destaca a necessidade de monitorar a composição nutricional do mosto de diversas variedades de cana-de-açúcar. Esse monitoramento é crucial para orientar a seleção da combinação ideal entre variedades de cana e microrganismos para a fermentação alcoólica. Tal abordagem visa otimizar a produtividade sem incorrer em custos adicionais com suplementação do mosto, ao mesmo tempo em que oferece oportunidades para explorar a produção de produtos adicionais, como vitaminas.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). **O RenovaBio. 2024.**

AGUILAR, Cristóbal N. *et al.* **Bioethanol: Biochemistry and Biotechnological Advances.** 1. ed. 2023.

ALBUQUERQUE, Francisco D.B. *et al.* **Greenhouse gas emissions associated with road transport projects: Current status, benchmarking, and assessment tools.** 2020. Transportation Research Procedia. Elsevier B.V., 2020. p. 2018–2030.

ALFENORE, S. *et al.* **Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 60, n. 1–2, p. 67–72, 2002.

ALTERMAN, Michail A.; HUNZIKER, Peter. **Amino Acid Analysis: Methods and Protocols.** Humana Press, 2012. v. 828 Disponível em: <http://www.springer.com/series/7651>.

AMORIM, *et al.* **Scientific challenges of bioethanol production in Brazil.** 2011.

AQUINO, Francisco W.B. *et al.* **Amino acids profile of sugar cane spirit (cachaça), rum, and whisky.** Food Chemistry, v. 108, n. 2, p. 784–793, 2008.

ARIF, Sania *et al.* **Physiochemical characteristics nutritional properties and health benefits of sugarcane juice.** In: non-alcoholic beverages: volume 6. The Science of Beverages. Elsevier, 2019. p. 227–257.

BAEYENS, Jan *et al.* **Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol.** Elsevier Ltd, 2015.

BALAT, Mustafa; BALAT, Havva. **Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel.** Elsevier Ltd, 2009.

BASHIR, Nuzhat; YOUNIS, Kaiser; YOUSUF, Owais. **An Overview Encompassing the Present Status of Jaggery Processing.** Springer, 2023.

BASSO, Luiz C. *et al.* **Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil.** In: FEMS Yeast Research. 2008. p. 1155–1163.

BELL, Sally Jean; HENSCHKE, Paul A. **Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine.** Australian Society of Viticulture and Oenology, 2005.

BERGMANN, Jessica C. *et al.* **Technological Advancements in 1G Ethanol Production and Recovery of By-Products Based on the Biorefinery Concept.** *In: Advances In Sugarcane Biorefinery: Technologies, Commercialization, Policy Issues and Paradigm Shift for Bioethanol and By-Products.* Elsevier Inc., 2018. p. 73–95.

BEROVIC, Marin *et al.* **Influence of Heat Shock on Glycerol Production in Alcohol Fermentation.** v. 103, n. 2, p. 111–999, 2007.

BRAGA JUNIOR, Rubens Leite do Canto *et al.* **Censo Varietal IAC de Cana-de-Açúcar no Brasil Safra 2022/2023.** Campinas: 2023.

BYSANI, Viswanada R. *et al.* **Engineering and evolution of the complete Reductive Glycine Pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for formate and CO₂ assimilation.** *Metabolic Engineering*, v. 81, p. 167–181, 2024.

CEPEA/ESALQ. **Indicador Semanal Etanol Hidratado Cepea/Esalq.** 2024.

CHEN, Ronghua *et al.* **Effect of different sterilization methods on the appearance, composition, and flavor of sugarcane juice.** *Journal of Food Science*, 2024.

CIANI, M.; COMITINI, F.; MANNAZZU, I. **Fermentation.** *In: Encyclopedia of Ecology, Five-Volume Set.* Elsevier Inc., 2008. p. 1548–1557. Disponível em: Acesso em: 26 abr. 2023.

CIANI, M; COMITINI, F; MANNAZZU, I. **Fermentation Metabolic Biodiversity.** 2008.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar.** Brasília: 2023. v. 11

COOPER, Catherine; PACKER, Nicolle; WILLIAMS, Keith. **Amino Acid Analysis Protocols.** , 2000. v. 159

CRÉPIN, Lucie *et al.* **Sequential use of nitrogen compounds by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: A model based on kinetic and regulation characteristics of nitrogen permeases.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, n. 22, p. 8102–8111, 2012.

- CRUZ, Delcy Mac. **PIB da cana avança 4,5% e fecha o ano em R\$ 95,9 bilhões.** 2022.
- DA SILVA FERNANDES, Flávia *et al.* **Current Ethanol Production Requirements for the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** Hindawi Limited, 2022.
- DE CARVALHO, Ariovaldo Lopes; ANTUNES, Carlos Henggeler; FREIRE, Fausto. **Economic-energy-environment analysis of prospective sugarcane bioethanol production in Brazil.** Applied Energy, v. 181, p. 514–526, 2016.
- DE VASCONCELOS, João Nunes. **Ethanol Fermentation. Sugarcane: Agricultural Production, Bioenergy and Ethanol,** p. 311–340, 2015.
- DORTA, C. *et al.* **Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26).** World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 22, n. 2, p. 177–182, 2006.
- DOS SANTOS, Camila Oliveira; SILVA, Maria Carolina Santos; CASTIGLIONI, Gabriel Luis. **Industrial yeast strains competence in mixed culture with wild flocculent yeast.** Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 36, p. 102144, 2021a. Disponível em: Acesso em: 23 fev. 2022.
- EMBRAPA. **Cana - Extração.** 2022.
- FABIANI, A. *et al.* **High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Free Amino Acids in Fruit Juices Using Derivatization with 9-Fluoreylmethyl-Chloroformate.** Journal of Chromatographic Science, v. 40, p. 14–18, 2002.
- FERDOUSE, Jannatul *et al.* **Methionine and glycine stabilize mitochondrial activity in sake yeast during ethanol fermentation.** Food Technology and Biotechnology, v. 57, n. 4, p. 535–543, 2019.
- GIANNATTASIO, Sergio *et al.* **Molecular mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* stress adaptation and programmed cell death in response to acetic acid.** Frontiers Research Foundation, 2013.
- GÓES-FAVONI, Silvana Pedroso de *et al.* **Fermentação alcoólica na produção de etanol e os fatores determinantes do rendimento.** Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais, , v. 9, n. 4, p. 285–296, 2018.

GUADALUPE-DAQUI, Mario *et al.* **The effect of CO₂ concentration on yeast fermentation: rates, metabolic products, and yeast stress indicators.** *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 50, n. 1, 2023.

GUARAGNELLA, Nicoletta; BETTIGA, Maurizio. **Acetic acid stress in budding yeast: From molecular mechanisms to applications.** *Yeast*, v. 38, n. 7, p. 391–400, 2021.

GUTIERREZ, Luiz Eduardo. **Produção de Glicerol por Linhagens de *Saccharomyces* Durante Fermentação Alcoólica.** *Anais ESALQ*, v. 48, p. 55–69, 1991.

JÁMBOR, A.; MOLNÁR-PERL, I. **Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride. Literature overview and further study.** *Journal of Chromatography A*, v. 1216, n. 15, p. 3064–3077, 2009.

KARUNA, Nardrapee *et al.* **Cassava Leaves as an Alternative Nitrogen Source for Ethanol Fermentation.** *Bioenergy Research*, v. 16, n. 2, p. 835–842, 2023.

KEMSAWASD, Varongsiri *et al.* **Influence of nitrogen sources on growth and fermentation performance of different wine yeast species during alcoholic fermentation.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 99, n. 23, p. 10191–10207, 2015.

KEZZY DE MORAIS, Lizz *et al.* **Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar Documentos.** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Tabuleiros Costeiros Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2015. Disponível em: www.embrapa.com.br.

KLEIN, Bruno Colling *et al.* **Low carbon biofuels and the New Brazilian National Biofuel Policy (RenovaBio): A case study for sugarcane mills and integrated sugarcane-microalgae biorefineries.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 115, 2019.

KOUBAA, Mohamed; BARBA, Francisco J; ROOHINEJAD, Shahin. **Fermentation Processes: Emerging and Conventional Technologies.** First Edition. Edited. 2021. Disponível em: <https://www.ventureradar.com/similar/Ginkgo%20BioWorks/>.

KÜÜT, Arne *et al.* **State of the art on the conventional processes for ethanol production.** *In: ETHANOL: SCIENCE AND ENGINEERING.* Elsevier, 2018. p. 61–101.

LABUSCHAGNE, Pwj; DIVOL, & B. **Thiamine: a key nutrient for yeasts during wine alcoholic fermentation.** 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-020-11080-2>.

LEHNINGER, T. M.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica.** 6. ed. : Ed. Artmed, 2014.

LIMA, U. A. *et al.* **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos.** 1. ed. São Paulo: Blücher, 2001. v. 3

MACHADO, Cristina Maria Monteiro; ABREU, Frederique Rosa. **Produção de álcool combustível a partir de carboidratos.** *Revista de Política Agrícola*, v. 15, n. 3, p. 64–78, 2006.

MAGALHÃES, Paulo Sérgio Graziano; BRAUNBECK, Oscar A. **Sugarcane and Straw Harvesting for Ethanol Production.** *In: Sugarcane Bioethanol — R&D for Productivity and Sustainability.* Editora Edgard Blücher, 2014. p. 465–476.

MAGASANIK, Boris; KAISER, Chris A. **Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*.** 2002. Disponível em: www.elsevier.com/locate/gene.

MIRANDA JÚNIOR, Messias *et al.* **Sucrose fermentation by Brazilian ethanol production yeasts in media containing structurally complex nitrogen sources.** *Journal of the Institute of Brewing*, v. 115, n. 3, p. 191–197, 2009.

MOHD AZHAR, Siti Hajar *et al.* **Yeasts in sustainable bioethanol production: A review.** Elsevier B.V., 2017.

MUELLER, Larissa Pires *et al.* **Evaluation of Metabolites and Amino Acids Assimilation by Yeast FT-858 in Saccharine Substrates for the Production of Bioethanol.** *Orbital-The Electronic Journal of Chemistry*, Av Senador Filinto Muller 1555, CAMPO GRANDE, MS 79074-460, BRAZIL, v. 11, n. 4, SI, p. 233–238, 2019.

OLIVEIRA, E. S. *et al.* **Fermentation characteristics as criteria for selection of cachaça yeast.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 20, p. 19–24, 2004.

OLIVEIRA, Ricardo Augusto; BARBOSA, Veríssimo de Souza; DAROS, Edelclaiton. **50 Anos de Variedades RB de cana-de-açúcar**. 2021.

PARAPOULI, Maria *et al.* ***Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications**. AIMS Press, 2020.

PASCHOALINI, Glauce. **Estudo do Processo Fermentativo de Usina Sucroalcooleira e Proposta para sua Otimização**. 2009.

PASTEUR, L. **Mémoire sur la fermentation alcoolique**. *In*: Annales de Chimie et de Physique. Paris: Ann Chim Phys. 1860. v. 58, p. 323–426. Disponível em: <http://www.archive.org/details/mmoiresurlaferOOpast>.

PELCZAR. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**. 2. ed. 1996. v. 1

PETROVIC, G.; ALEIXANDRE-TUDO, J. L.; BUICA, A. **Grape must profiling and cultivar discrimination based on amino acid composition and general discriminant analysis with best subset**. South African Journal of Enology and Viticulture, v. 40, n. 2, p. 1–13, 2019.

QUIMESP QUÍMICA. **Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos - Etanol**. 2021.

RABY, Hasan Shahriar *et al.* **Bioethanol production from sugarcane molasses with supplemented nutrients by industrial yeast**. Biofuels, 2023.

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. **Annual Ethanol Production**. 2022. Disponível em: <https://ethanolrfa.org/markets-and-statistics/annual-ethanol-production>. Acesso em: 5 jul. 2022.

RIDESA. **50 Anos de Variedades RB de cana-de-açúcar**. 2015.

RIDESA. **Catálogo Nacional de Variedades “RB” de Cana-de-Açúcar**. 2010.

RIDESA BRASIL. **Liberação Nacional de Variedades RB de Cana-de-Açúcar**. 2015.

RIDESA: **Site Oficial**. 2022. Disponível em: <https://www.ridesa.com.br/>. Acesso em: 10 jul. 2022.

ROCCHI, Rebecca *et al.* **Strain diversity in *Saccharomyces cerevisiae* thiamine production capacity**. Yeast, v. 40, n. 12, p. 628–639, 2023.

ROLLER, Stéphanie *et al.* **A comparison of the nitrogen metabolic networks of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*.** Environmental Microbiology, v. 21, n. 11, p. 4076–4091, 2019.

RONQUILLO BLAU, Claudia *et al.* **Production Process and Physicochemical Characterization of the Guatemalan Artisanal Fermented Beverages Boj and Suchiles.** Journal of the American Society of Brewing Chemists, 2023.

RUIZ, Leonardo. **RB867515 segue como a variedade mais cultivada no Centro-Sul, seguida de perto pela RB966928** | Cana Online. 2020. Disponível em: <http://www.canaonline.com.br/conteudo/rb867515-segue-como-a-variedade-mais-cultivada-no-centro-sul-seguida-de-perto-pela-rb966928.html>. Acesso em: 10 jul. 2022.

SANTOS, Camila Oliveira dos. **Diagnóstico e Avaliação da Influência de Contaminantes Selvagens Durante Etapas do Processo Produtivo do Etanol.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2021.

SANTOS, Mayara Vieira *et al.* **Population dynamics of *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 and CAT-1 in CO-culture for the production of ethanol.** Acta Scientiarum - Technology, v. 42, p. 1–7, 2020.

SCHMIDELL, Willibaldo. **Biotecnologia Industrial - Engenharia Bioquímica.** 1. ed. Blucher, 2001. v. 2

SHARIFI-RAD, Javad *et al.* **Revisiting the nutraceutical profile, chemical composition, and health benefits of jaggery: Updates from recent decade.** John Wiley and Sons Inc, 2023.

SHULER, Michael L. **Bioprocess Engineering: Basic Concepts.** Seconded. Pearson, 2018.

SILVA, Dayane Lilian Gallani *et al.* **Cana-de-açúcar: Aspectos econômicos, sociais, ambientais, subprodutos e sustentabilidade.** Research, Society and Development, v. 10, n. 7, p. e44410714163, 2021.

SILVA, Carla *et al.* **Sustainability of sugarcane for energy purposes.** In: SUGARCANE BIOREFINERY, TECHNOLOGY AND PERSPECTIVES. Elsevier, 2019. p. 89–102.

SILVEIRA, Larissa Gabriele Silva. **Avaliação da composição mineral do mosto de cana de açúcar no desempenho fermentativo com cultura mista de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* diagnóstico e solução de problemas relacionados a produção industrial de etanol.** Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2022.

SOARES-COSTA, Andrea *et al.* **Industrial PE-2 strain of *Saccharomyces cerevisiae*: From alcoholic fermentation to the production of recombinant proteins.** *New Biotechnology*, v. 31, n. 1, p. 90–97, 2014.

STAMBUK, Boris U. *et al.* **Industrial fuel ethanol yeasts contain adaptive copy number changes in genes involved in vitamin B1 and B6 biosynthesis.** *Genome Research*, v. 19, n. 12, p. 2271–2278, 2009.

TORRES-GUARDADO, Rafael *et al.* **Succinic acid production by wine yeasts and the influence of GABA and glutamic acid.** *International Microbiology*, 2023.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia.** 12. ed. 2017. Disponível em: <https://www.amazon.com.br/Microbiologia-Gerard-J-Tortora-ebook/dp/B01LXDXM99>. Acesso em: 17 jan. 2023.

TSE, Timothy J.; WIENS, Daniel J.; REANEY, Martin J.T. **Production of bioethanol - a review of factors affecting ethanol yield.** MDPI, 2021.

UNFCCC. **UNITED NATIONS FRAMEWORK CONVENTION ON CLIMATE CHANGE.** 1992.

VANDENBERGHE, L.P.S. *et al.* **Beyond sugar and ethanol: The future of sugarcane biorefineries in Brazil.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 167, p. 112721, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032122006104>. Acesso em: 29 jun. 2022.

VARAEE, Mona *et al.* **Supercritical fluid extraction of free amino acids from sugar beet and sugar cane molasses.** *Journal of Supercritical Fluids*, v. 144, p. 48–55, 2019.

VIANA, Jessica Lima *et al.* **Estimating Sugarcane Yield in a Subtropical Climate Using Climatic Variables and Soil Water Storage.** *Sustainability (Switzerland)*, v. 15, n. 5, 2023.

VITAL, Andréia. **Variedades: ao gosto dos clientes**. 2016. Disponível em: <https://www.revistacanaieiros.com.br/variedades-ao-gosto-dos-clientes>. Acesso em: 27 out. 2022.

WALKER, Graeme M.; STEWART, Graham G. ***Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages**. MDPI AG, 2016.

WALKER, Graeme M.; WALKER, Roy S.K. **Enhancing Yeast Alcoholic Fermentations**. *Advances in Applied Microbiology*, v. 105, p. 87–129, 2018.

WALVEKAR, Adhish S.; LAXMAN, Sunil. **Methionine at the Heart of Anabolism and Signaling: Perspectives from Budding Yeast**. *Frontiers Media S.A.*, 2019.

WANG, Ya Qin *et al.* **Rapid HPLC analysis of amino acids and biogenic amines in wines during fermentation and evaluation of matrix effect**. *Food Chemistry*, v. 163, p. 6–15, 2014.

ZHOU, Mengyu *et al.* **One-Step Biosynthesis of Vitamin C in *Saccharomyces cerevisiae***. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, 2021.