

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Aspectos físicos e químicos do caldo de cana de açúcar que afetam a  
capacidade fermentativa das células de levedura**

JOÃO ASSIS SCAVUZZI MENEZES

RECIFE – PE  
Fevereiro de 2012

JOÃO ASSIS SCAVUZZI MENEZES

**Aspectos físicos e químicos do caldo de cana que afetam a  
capacidade fermentativa das células de levedura**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCOS ANTÔNIO DE MORAIS JUNIOR

RECIFE – PE

Fevereiro de 2012

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

S288a Menezes, João Assis Scavuzzi

Aspectos físicos e químicos do caldo de cana que afetam a capacidade fermentativa das células de levedura / João Assis Scavuzzi Menezes. – Recife: O Autor, 2012.

55 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Marcos Antônio de Moraes Júnior

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2012.**

Inclui bibliografia e anexos

**1. Fermentação 2. Cana-de-açúcar - derivados I. Moraes Júnior, Marcos Antônio (orientador) II. Título.**

664.024

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-153

**Aspectos físicos e químicos do caldo de cana que afetam a  
capacidade fermentativa das células de levedura**

**João Assis Scavuzzi Menezes**

**Banca Examinadora:**

---

**Prof. Dr. Marcos Antônio de Moraes Junior (Depto. de Genética / UFPE)**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia (Depto. Bioquímica/ UFPE)**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Cristina Maria de Souza Motta (Depto. Micologia/ UFPE)**

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos Antônio de Moraes Junior, pela competência em transmitir, com sabedoria, os conhecimentos que fundamentaram essa dissertação, pelo estímulo e confiança depositados em mim e, principalmente, pela amizade.

A instituição, CETENE/MCT pela estrutura oferecida para o desenvolvimento das pesquisas.

Ao Sr. Celso Caldas, diretor da Central Analítica em Maceió-AL, pela cordialidade nas análises realizadas.

Ao Prof<sup>o</sup> Irapuan, por ter permitido a utilização da estrutura do seu laboratório e do equipamento HPLC.

Ao Sr. Gustavo Caldas, por acreditar nos resultados deste trabalho como instrumento de melhoria ao setor sucroalcooleiro, contribuir no fornecimento de amostras da Destilaria Santa Teresa – PE, utilizadas neste estudo.

Ao Sr. Dorian Brito, por disponibilizar a estrutura agrícola da Itapecuru - Bioenergia para a coleta das amostras.

Ao Sr. Rogério, pelo fornecimento das amostras da Destilaria TABU, por acreditar neste estudo.

Aos amigos do CETENE/MCT pelo companheirismo e troca de conhecimento durante a execução dos experimentos, principalmente a amiga Raquel que se manteve auxiliando durante os momentos de maior volume de trabalho.

A todos os companheiros de pesquisa do Grupo de Energia Metabólica – NEM, pelo companheirismo durante todo o trajeto deste trabalho.

Aos amigos do mestrado, Allan Chernichiarro, Marek Ekert e Rafael Lira.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo incentivo financeiro.

A Coordenação do Centro de Ciências Biológicas, na figura da Prof<sup>a</sup> Tereza Correia e Adenilda que auxiliaram quanto aos trâmites necessários para o andamento tranquilo de nossas atividades em sala de aula e de pesquisa.

Dedico este trabalho aos meus pais, João Assis e Gercila Scavuzzi, à minha irmã, esposa e filho, por tudo que representam na minha vida.

Dedico a todos crédulos na biotecnologia, como uma área das ciências biológicas voltada à solução de alguma problemática, tornando possível a aplicação de resultados acadêmicos em cenários produtivos.

## RESUMO

Mesmo o Brasil detendo o que se entende por mais moderno na produção de etanol, existem muitos questionamentos em relação à influência da matéria-prima no processo de fermentação alcoólica, pois o caldo de cana de açúcar é uma matéria prima passiva de grandes oscilações quanto a sua composição, aspectos físicos e químicos. Estas oscilações estão relacionadas com variáveis ambientais, agrícolas, manejo e principalmente quanto à variedade de cana de açúcar utilizada. O presente trabalho teve como objetivo contribuir para elucidar como os aspectos físicos e químicos do caldo de cana de açúcar afetam a bioprodutividade das células de leveduras, durante a fermentação alcoólica. O estudo utilizou o caldo de cana obtido de três variedades de cana de açúcar a RB 867515, a RB 92579 e a RB 863129, coletadas em campos agrícolas de destilarias localizadas nos estados de Pernambuco, Paraíba e Maranhão. As canas de açúcar foram interpretadas quanto ao seu ponto útil de industrialização (P.U.I.) garantindo a todas o mesmo índice de maturação fisiológica. O caldo extraído foi dividido em duas partes. A primeira foi enviada ao laboratório da Central Analítica em Maceió-AL para o conhecimento da composição nutricional (cálcio, cobre, ferro, magnésio, manganês, zinco, nitrogênio total, fósforo e potássio). A segunda submetida a ensaios fermentativos no laboratório do CETENE/MCT, onde os parâmetros celulares e de bioprodutividade foram conhecidos. Desta forma conclui-se que para cada região amostrada IT, TB e ST, houve uma variedade de cana de açúcar com maior ganho nutricional e entre estas a variedade RB 867515 demonstrou melhores resultados nutricionais nas regiões litorâneas TB e ST em contraste com a região interiorana IT. Os minerais analisados separadamente não apresentaram relação direta com os parâmetros fermentativos. Ao avaliarmos as oscilações na capacidade fermentescível do mosto de alimentação na Destilaria Japungú, concluímos que a capacidade fermentativa da biomassa de leveduras está mais sujeita a qualidade do mosto de alimentação que o tipo de leveduras utilizadas, haja vista que as linhagens comerciais de *S. cerevisiae* possuem eficiência máxima de conversão do substrato em bioetanol.

**Palavra chave:** Variedades, cana de açúcar, fermentação, rendimento

## ABSTRACT

Even Brazil holding what is understood by most modern in ethanol production, there are many questions regarding the influence of raw material in the process of fermentation, because the sugar cane juice is a passive raw material as the large oscillations their composition, physical and chemical aspects. These oscillations are related to environmental variables, agricultural, handling and especially about the variety of sugar cane used. This study aimed to contribute to elucidate how the physical and chemical properties of sugar cane juice affect bioproductivity of yeast cells during alcoholic fermentation. The study used the juice obtained from three varieties of sugarcane to RB 867515 the RB 92579 and RB 863129 collected in agricultural fields of distilleries in the states of Pernambuco, Paraíba and Maranhão. The sugar cane was interpreted as to its useful point of industrialization (PUI) enabling all the same index of physiological maturation. The extracted juice was divided into two parts. The first was sent to the Central Analytical Laboratory in Maceió-AL to the knowledge of the nutritional composition (calcium, copper, iron, magnesium, manganese, zinc, total nitrogen, phosphorus and potassium). The second subjected to fermentation in laboratory tests CETENE / MCT, where the parameters cellular bioproductivity and have been known. Thus it is concluded that for each sample region IT, TS and TB, there was a variety of sugar cane nutritional higher gain and the range between the RB 867 515 demonstrated better results in coastal regions nutritional TB and ST in contrast to the hinterland IT. The minerals analyzed separately showed no relationship with fermentative parameters. In evaluating the changes in the capacity of the fermentable mash feed in Japungú Distillery, we conclude that the fermentative capacity of yeast biomass is more likely the quality of the must supply the type of yeast used, considering that the commercial strains of *S. cerevisiae* have maximum efficiency of conversion of substrate to ethanol

**Keyword:** Variety, cane sugar, fermentation yield

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Fluxograma de diferenciação do processamento da cana de açúcar entre destilarias do tipo anexa e autônoma de fabricação do bioetanol. Adaptado de Walker (2011).....4

**Figura 2:** Imagem de um canavial com o ponto maturação ultrapassado em A e imagem de uma floração da cana de açúcar em B.....6

### Capítulo 1

**Figura 1:** Parâmetros fisiológicos dos experimentos de fermentação com caldo das três variedades de cana coletadas nas três regiões de avaliação utilizando a linhagem industrial *Saccharomyces cerevisiae* JP1.....33

**Figura 2:** Incremento de peso (g) da biomassa e variação de pH da levedura JP1.....35

**Figura 3:** Valores de glicerol e acetato em g/L ao término dos ensaios fermentativos da JP1.....36

**Figura 4:** Parâmetros fisiológicos dos experimentos de fermentação com caldo das três variedades de cana coletadas nas três regiões de avaliação utilizando a linhagem industrial *Saccharomyces cerevisiae* PE-02.....38

**Figura 5:** Incremento de peso (g) da biomassa e variação de pH da levedura PE2.....38

**Figura 6:** Valores de glicerol e acetato em g/L ao término dos ensaios fermentativos da PE-02.....39

**Figura 7:** Influência do mosto de alimentação, na capacidade fermentativa da biomassa de leveduras na Destilaria Japungú durante a safra 2011/2012 nos gráficos A e B.....41

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Intervalo dos valores do índice de maturação e sua interpretação agrícola.....5

### Capítulo 1

**Tabela 1:** Composição mineral dos caldos de canas das diferentes variedades RB coletadas nas fazendas das destilarias Itapecuru (IT), Tabu (TB) e Santa Teresa (ST).....32

**Tabela 2:** Média dos valores de minerais dos caldos de cana em relação a variável regional (local de coleta) e variedade de cana .....33

## LISTA DE ABREVIACÕES

<b>A<sub>f</sub></b>	Açúcar redutor final
<b>A<sub>i</sub></b>	Açúcar redutor inicial
<b>ART</b>	Açúcares Redutores Totais.
<b>Brix</b>	Concentração de sólidos solúveis em uma solução.
<b>DO</b>	Densidade ótica
<b>DNSA</b>	2,4-dinitrosalicylic acid.
<b>HPLC</b>	High Performance ( pressure) Liquid Chromatography
<b>I.M.</b>	Índice de Maturação.
<b>IT</b>	Itapecuru – Bioenergia.
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico.
<b>P.U.I.</b>	Ponto útil de Industrialização.
<b>RB</b>	República Brasileira.
<b>RIDESA</b>	Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do setor Sucroenergético.
<b>ST</b>	Usina Santa Teresa.
<b>TB</b>	Destilaria Tabu.
<b>v<sub>c</sub></b>	Variação da viabilidade celular.
<b>V<sub>f</sub></b>	Viabilidade final
<b>V<sub>i</sub></b>	Viabilidade inicial
<b>X<sub>i</sub></b>	Amplitude média

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Revisão Bibliográfica.....</b>	<b>2</b>
2.1. A cana de açúcar.....	2
2.2. A indústria do bioetanol.....	2
2.3. Tecnologia da <i>Saccharum officinarum</i> .....	4
2.4. Variedades de cana de açúcar.....	6
2.4.1. Variedade RB 867515.....	6
2.4.2. Variedade RB 92579.....	7
2.4.3. Variedade RB 863129.....	8
2.5. Composição química do caldo da cana de açúcar.....	8
2.6. Composição nutricional da cana de açúcar.....	9
2.7. Fermentação alcoólica.....	11
2.8. Considerações.....	13
<b>3. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>14</b>
<b>4. Objetivos.....</b>	<b>19</b>
4.1. Objetivos Gerais.....	19
4.2. Objetivos Específicos.....	19
<b>5. Capítulo 1.....</b>	<b>20</b>

## 1. INTRODUÇÃO.

A intensa expansão da atividade industrial relacionada à produção de etanol combustível, tem impulsionado o aperfeiçoamento de novas variedades de cana de açúcar, o que faz com que o Brasil conte atualmente com aproximadamente 78 variedades genômicas próprias. Apesar de grandes avanços quanto às características agrônômicas de cada variedade, pouco é conhecido quanto ao seu potencial de industrialização e impactação no processo fermentativo industrial sobre as células de leveduras na fabricação de etanol. Esta informação torna-se de grande importância ao fato da eficiência de uma fábrica de álcool dar-se pelo conjunto da eficiência do gerenciamento agrícola somado ao industrial.

Após a cana de açúcar ser recebida na fábrica, o caldo é processado e grande parte de suas impurezas físicas e microbiológicas são eliminadas. Em seguida, este mosto de alimentação é utilizado juntamente com as células de leveduras para a fermentação alcoólica. Este processo é contínuo ao longo de toda a safra e caracteriza-se pelo reciclo da biomassa celular. Durante o processo de industrialização do caldo de cana, as células de leveduras são submetidas a grandes oscilações deste meio, devido a inconstância na composição nutricional. Além deste, alterações físicas e químicas do caldo de cana, durante a metabolização do açúcar em álcool ocorrem em consequência da variação inicial e final da osmolaridade, pH, temperatura, disponibilidade nutricional, densidade e aumento gradativo da concentração de etanol, incidindo diretamente no rendimento fermentativo industrial. Portanto havendo a necessidade de utilização de linhagens com grande capacidade adaptativa.

Utilizando diferentes variedades de cana de açúcar e relacionando a matéria prima com os ensaios fermentativos, este trabalho contribui como ferramenta ao entendimento das divergências qualitativas de mesma variedade de cana de açúcar plantada em locais distintos, convergência qualitativas de diferentes variedades de cana plantada no mesmo ambiente e sua influência na capacidade fermentativa de diferentes leveduras. Os resultados obtidos poderão auxiliar no gerenciamento de unidades produtoras de etanol.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.**

### **2.1. A Cana de açúcar**

A cana de açúcar, *Saccharum officinarum*, é uma gramínea (Payne, 1989), monocotiledônea composta de folhas, colmos, raízes e eventualmente flores, (Fernandes, 2003), sendo a matéria prima principal da indústria sucroalcooleira no Brasil, África do Sul, Austrália, Caribe e sul da Ásia. Esta cultura desenvolve-se em todos os estados brasileiros. Entretanto, no Brasil as regiões de grande produção estão concentradas em apenas alguns estados do Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste, sendo o Estado de São Paulo o maior produtor nacional (UNICA, 2011).

### **2.2. A indústria do bioetanol.**

O bioetanol é produzido por indústrias através do processo de fermentação desde o início do século XX. Atualmente, 432 usinas e destilarias esmagam cerca de 625 milhões de toneladas de cana por safra, produzindo cerca de 27 bilhões de litros de etanol e 38,7 milhões de toneladas de açúcar. Nos últimos 30 anos, várias inovações foram introduzidas nas destilarias de álcool no Brasil, resultando em melhoria de eficiência da planta industrial e competitividade econômica (Amorim *et al*, 2011).

O bioetanol é o combustível líquido predominante (Walker, 2011), sendo um combustível produzido principalmente a partir da fermentação de hidratos de carbono, derivados de matéria prima agrícola pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Argueso *et al*, 2009), havendo o Brasil se destacando como o maior produtor de bioetanol do mundo (Carvalho, *et al* 2008 e Basso *et al* 2008), tendo cada vez mais um papel de destaque na substituição do petróleo (Yo *et al*, 2010). O Brasil tem sido impulsionado pela crescente procura por veículos com abastecimento Flex-fuel. O licenciamento de veículos teve um aumento de 16% no mês de junho de 2011 quando comparado com o mês de junho de 2010, representando um incremento de 286,9 mil unidades, das quais 83% são de veículos Flex-fuel. Para atender tal demanda na safra 2011/2012, até meado de junho, foram produzidos

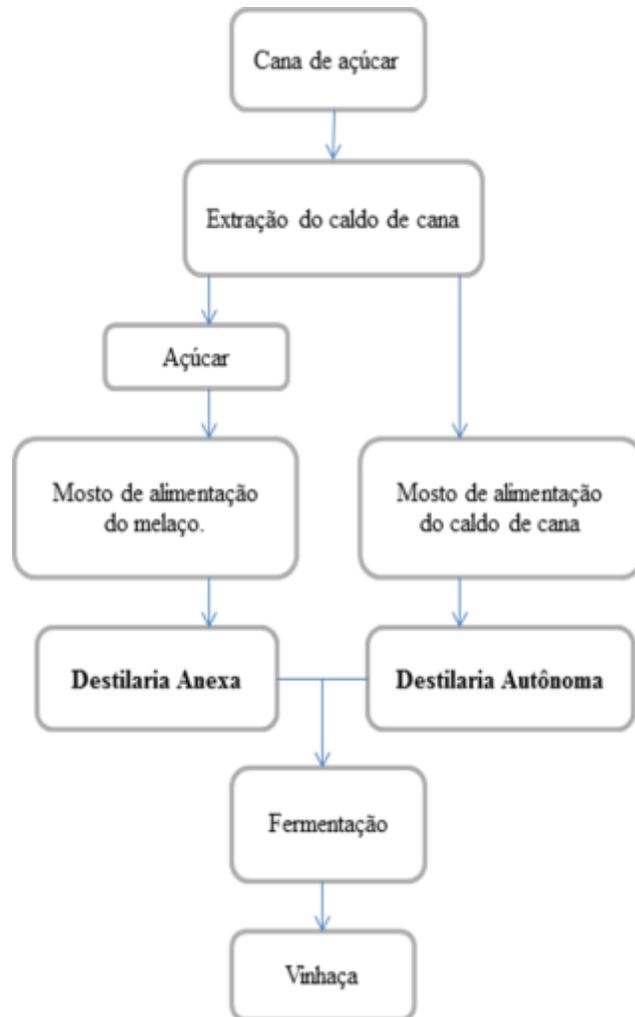
2,45 milhões de m<sup>3</sup> de álcool anidro, um incremento de 13,5% em relação à safra anterior. (Boletim Mensal de Combustíveis Renováveis, 2011).

No Brasil, a matéria-prima da cana de açúcar para a produção de etanol não se restringe somente ao caldo da cana-de-açúcar. O mel final ou melaço é um subproduto da produção do açúcar e também é utilizado associado ao caldo da cana-de-açúcar ou simplesmente diluído como substrato do processo fermentativo. Desta forma, diminuindo o custo com a matéria-prima, em particular a fonte orgânica de carbono diretamente da cana, a qual pode ter uma incidência de 38 a 73% do custo total do produto final, deste modo exigindo a utilização de células de leveduras com elevada conversão do substrato em produto (Schmidell, 2005).

Desde longa data o controle da matéria prima nas fábricas de açúcar e álcool vem sendo motivo de muita atenção para a qualidade no manejo em campo e indústria (Caldas, 1998). A demanda crescente pelo etanol e o entendimento da necessidade de maiores conhecimentos quanto à matéria prima não é recente, Tossetto (2008), já relatava sobre a presença e a influência de possíveis inibidores da fermentação alcoólica em substratos para a fabricação do bioetanol a partir do caldo de cana e melaço, chamando a atenção para que, mesmo o Brasil detendo o que se entende por mais moderno na produção de etanol, existem muitos questionamentos em relação à influência da matéria-prima no processo de fermentação alcoólica.

Para a fabricação do etanol existem dois tipos de fábricas no Brasil (Figura 1), divididas de acordo com a disponibilidade da matéria-prima (Campos, 1980). Uma destas é a destilaria autônoma, onde a disponibilidade de matéria-prima no processo fermentativo é basicamente o caldo de cana, também denominado mosto de alimentação, que podem ou não receber tratamento térmico antes da utilização. Nestas, o rendimento industrial é calculado como o índice obtido pela quantidade de álcool produzido pela quantidade de toneladas de cana moída. O outro tipo de destilaria é dependente e anexa à fabricação de açúcar. Nesta, a matéria-prima é o mel ou melaço que é diluído para 16 a 18° brix, próximo ao do caldo, servindo de mosto de alimentação para o processo fermentativo. O rendimento deste segundo tipo de fábrica é mais complexo, pois inclui as variáveis de composição ponderada da quantidade de mel consumido, sua pureza em açúcares, a utilização de alguma fração de caldo de cana, diluições e a quantidade de bioetanol produzido (Fernandes, 2003). A

sacarose é o dissacarídeo mais importante nos caldos de cana de açúcar do melaço. (Lima *et al*, 2001)



**Figura 1:** Fluxograma de diferenciação do processamento da cana de açúcar entre destilarias do tipo anexa e autônoma de fabricação do bioetanol. Adaptado de Walker (2011).

### 2.3. Tecnologia agrícola da *Saccharum officinarum*.

A cana de açúcar tem um crescimento relativamente lento na parte final do seu desenvolvimento, sendo este um fator negativo, principalmente, para a finalidade de industrialização (Allison, 2007). Quanto ao seu desenvolvimento, o amadurecimento da

planta para fins industriais, requer a interrupção do seu ciclo biológico no momento onde existe a maior produção de sacarose para a sua industrialização. O açúcar redutor total, produzido nos internódios pode ser determinado através da medição do brix. Este é acumulado e distribuído uniformemente, da base para o meio e ápice, evoluindo até o mais próximo equilíbrio entre a base, o meio e o ápice (Glassop *et al* , 2007). O momento ideal de corte da planta pode ser determinado através índice obtido pela divisão do brix do ápice pelo brix da base, expresso em índice de maturação (I.M.).

Quando a cana de açúcar atinge o estágio do seu desenvolvimento, com IM de 0,9 a 1,0 (Tabela 1) em condições ambientais favoráveis, a planta está no limite de transição para a fase de indução floral. O florescimento deve ser considerado como o fim do período maturativo, havendo a parada do crescimento e logo um período de pós-maturação. A fase de pós-maturação é uma característica negativa para a produção de etanol, pois é considerado o fim do período de ganho em açúcares e início do período de inversão dos açúcares. Com isso a seiva elaborada será utilizada no desenvolvimento da fluorescência, invertendo e metabolizando os açúcares disponíveis, findando com a emissão da flecha ou seta (Figura 2). A cana de açúcar entra em decadência e as gemas laterais desenvolvem-se em detrimento das reservas de sacarose no colmo (McCormick, 2009).

**Tabela 1:** Intervalo dos valores do índice de maturação e sua interpretação agrícola.

I.M. <sup>a</sup>	Interpretação
> 0,70	Imatura
0,71 – 0,80	Maturação Baixa
0,81 – 0,90	Maturação Média
0,91 – 1,00	Madura
> 1,00	Maturação Ultrapassada

<sup>a</sup> Índice de Maturação (I.M.) = Brix do ápice/ Brix da base

A floração é uma característica positiva apenas quando existe a intenção de produção de sementes para programas de melhoramento genético de espécies na geração de variedades (Cesnik e Miocque, 2004).



**Figura 2:** Imagem de um canavial com o ponto maturação ultrapassado em A e imagem de uma floração da cana de açúcar em B.

#### **2.4. Variedades de cana de açúcar.**

A obtenção de novas variedades representa um dos fatores mais contribuintes para o aumento da produtividade de etanol, tanto pelo maior conteúdo de sacarose quanto pela maior adaptação aos diversos ambientes agroecológicos do Brasil. Neste contexto, a RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético) tem contribuído significativamente com o desenvolvimento das variedades Republica Brasileira com genótipos relacionados com resistência a seca, maior crescimento e resistência à doenças. Até o momento já foram liberadas 78 variedades da cana de açúcar do tipo RB. A adoção de novas variedades também tem contribuído para o avanço sustentável do setor, pois ao considerar as melhorias produtivas ocorridas com a cana de açúcar nos últimos 40 anos, verifica-se um incremento superior a 30% na produtividade, melhoria na qualidade da matéria prima, e redução dos custos de produção. Como resultado, as variedades RB veem sendo cada vez mais adotadas pelos agricultores canavieiros no Brasil e no mundo, representando 58% das variedades cultivadas no Brasil.

##### 2.4.1. Variedade RB 867515.

A variedade RB 867515 possui crescimento ereto e rápido, com despalha fácil. Os colmos possuem entrenós cilíndricos, de cor verde-arroxeados sob a palha, e roxo intenso

quando exposto ao sol. Apresenta pouca rachadura, sendo de aspecto liso e com pouca cerra. A zona radicular é de largura média, sem raizamento aéreo. As gemas são de tamanho médio do tipo pentagonal, pouco proeminente ultrapassando o anel de crescimento e com poro germinativo apical. As folhas são de largura média, arqueadas, com curvas e bordos de serrilhamento pouco agressivo. A bainha é de comprimento longo com quantidade de cera regular e caduco. Esta variedade tem apresentado boa capacidade de brotação mesmo em plantio tardio sob baixas temperaturas. Em cana planta, ou seja, no primeiro plantio, de ano e meio, pode ocorrer tombamento ao final do ciclo devido a crescimento vigoroso. Pode ocorrer florescimento, vindo a não comprometer a produção em função do crescimento expressivo. De acordo com a curva de maturação, recomenda-se o corte de junho a agosto. É uma ótima opção em áreas de vinhaça com aplicação de maturadores. O teor de fibra é relativamente alto com média de 13%. Recomenda-se plantar em ambientes de média fertilidade natural e colher em meados de julho até setembro. Destaca-se pelo alto teor de sacarose e alta produtividade agrícola. É responsiva a maturador podendo ser cortada em início de safra, com excelente desenvolvimento e com boa brotação na planta e socas. Excelente desempenho em solos de textura arenosa (RIDESA, 2010).

#### 2.4.2. Variedade RB 92579.

A variedade RB 92579 tem crescimento ereto, arquitetura foliar com pontas curvas, copa de volume regular e tonalidade intermediária. As folhas são largas, possuindo limbo largo e pouco serrilhado. Seu entrenó possui despalha difícil e gema pouco saliente, cilíndricos de comprimento e diâmetro médios de cor roxa ao sol e amarelo verde sob a palha e gema do tipo triangular. O desenvolvimento é lento, com colmo, inicialmente, de aspecto manchado, pouca cera, cor roxa ao sol e amarelo verde sob a palha. Recomenda-se o plantio em áreas de tabuleiro, várzea, encosta e chã. É indicada para colheitas de meio de safra. Esta variedade destaca-se pelo ótimo perfilhamento e brotação de socaria, alta produtividade agrícola, elevado ART e rápida recuperação ao estresse hídrico na socaria. Após o corte, tem ótima brotação na planta e na soca com colheita manual queimada e com colheita manual crua. Preenche bem as entrelinhas do plantio. Alta produtividade agrícola nas quatro primeiras folhas de crescimento. É de pouca fluorescência e possui maturação média

(outubro a janeiro), sem restrições a ambientes para produção. Também apresenta tolerância à seca e a herbicidas. Difícil despalha no período vegetativo e fácil na colheita. Resistente a ferrugem marrom e ao carvão. Tolerante à cigarrinha da folha. Resistência intermediária à escaldadura das folhas causada pela infestação bacteriana e a podridão vermelha causada pela infestação fúngica. Ausência de amarelinho causado também pela infestação fúngica (RIDESA, 2010).

#### 2.4.3. Variedade RB 863129.

crescimento regular, tombamento raro, hábito de crescimento semi-decumbente e florescimento eventual. Sua maturação é de precoce a média com despalha fácil. Resistente a escaldadura causada pela infestação fúngica. Possui rápido e bom fechamento de entrelinhas, sendo de perfilhamento médio. Suas bainhas são verdes e levemente arroxeadas, quando expostas, e quantidade de folhas regular. Recomenda-se plantar em ambientes de médio e baixo potencial e colher no início e meio de safra. Destaca-se por ter médio teor de sacarose e alta produtividade agrícola, sendo tolerante ao estresse hídrico, apresentando excelente sanidade e boa brotação em cana planta e em soqueiras (RIDESA, 2010).

### **2.5. Composição química do caldo da cana de açúcar.**

A qualidade da cana de açúcar como matéria prima industrial pode ser definida através de uma série de características intrínsecas da própria planta, alterada pelo manejo agrícola e industrial, os quais definem seu potencial para produção de bioetanol e açúcar. Sob o aspecto tecnológico, os colmos são constituídos de caldo e os sólidos insolúveis em água, dando origem à primeira fórmula básica da tecnologia açucareira (cana = sólidos insolúveis + caldo). Os sólidos insolúveis em água são representados pela fibra da cana. O caldo contém a água, ou seja, a umidade da cana, e os sólidos solúveis totais, que correspondem aos açúcares e não açúcares. Os sólidos solúveis são classificados em açúcares, sendo esses a sacarose, a glicose e a frutose, compostos orgânicos e materiais inorgânicos. A natureza dos compostos não-açúcares pode explicar as diferenças de

comportamento durante o processamento de uma matéria prima em relação à outra similar na composição nutricional. A medida dos sólidos solúveis é denominada °Brix. De forma quantitativa, a composição média do caldo de cana de açúcar, dar-se por 71,1% de umidade, 10,9% de fibra, 15,5% de sacarose, 2% de não açúcares, e 0,5% dos açúcares glicose mais frutose.

O principal componente da cana é a água. Esta, sob condições normais, pode chegar a 78% do peso dos colmos no início do desenvolvimento vegetativo, decrescendo para cerca de 68% quando a cana atinge seu ponto máximo de maturação. A cana pode apresentar altos teores de sacarose, atingindo, por exemplo, 17,5%, com análises dos colmos inteiros, limpos e bem despontados. Algumas das novas variedades beneficiadas nos programas de melhoramento podem ultrapassar esse valor no pico da maturação, dependendo da região onde são cultivadas (Fernandes, 2003).

## **2.6. Composição nutricional da cana de açúcar.**

Além da fonte de carbono (glicose, frutose e sacarose) também estão presente no caldo de cana compostos orgânicos, tais como vitaminas (A, B1 e B6), aminoácidos e ácidos orgânicos. O teor de nitrogênio, aminoácidos e proteínas, pode ser encontrado no caldo de cana de açúcar entre 0,01 a 0,43%. O caldo de cana contém vários aminoácidos, como os ácidos aspártico e glutâmico. Por hidrólise das proteínas são formados vários aminoácidos, tais como alanina, leucina, glicina, lisina, tiroxina, *etc.* O aminoácido arginina, quando adicionado ao mosto de alimentação incrementa a produção de CO<sub>2</sub>, logo induz um maior vigor fermentativo nas células de leveduras (Butzke e Seung, 2011). Os ácidos orgânicos presentes no caldo de cana como o acético, cis-acronpítico, fórmico, fumárico, itacônico, láctico, maleico, oxálico, trans-aconítico, succínico, shikimico, são responsáveis pelo pH do caldo. Na cana madura e fresca, o pH do caldo oscila entre 5,2 e 5,8. Os ácidos acéticos e lácticos são resultantes do processo de deterioração da cana pós-corte.

Os compostos inorgânicos encontrados são fósforo, enxofre, cálcio, magnésio, potássio, zinco, manganês, cobre, ferro, cobalto, iodo e outros elementos em quantidades diminutas, sendo todos necessários para suprir as necessidades nutricionais das leveduras durante o processo de fermentação alcoólica industrial, influenciando na multiplicação e

crescimento celular e na eficiência de transformação de açúcar em álcool (Santos, 2008). O zinco é um elemento essencial para o crescimento normal, metabolismo e fisiologia da célula de levedura, além de atuar como um co-fator para muitas proteínas, principalmente do grupo “zinc-finger” (Zhao, 2011).

As cinzas provenientes da queimada para despalhe da cana de açúcar, presentes no caldo de cana, podem ter efeitos benéficos até certos limites, uma vez que representam em sua grande parte, nutrientes para o processo fermentativo, pois seu principal componente é o potássio, devido à aplicação de altas doses da vinhaça (fertirrigação), processo que pode dobrar ou até triplicar a quantidade de cinzas no caldo de cana. Os metais são utilizados como elementos traços e agem como co-fatores e co-enzimas em processos celulares (Li *et al*, 2009). Praticamente todos os seres vivos na terra precisam de metais para sobreviver, O ferro e o cobre são particularmente importantes, pois participam das reações que necessitam a transferência de elétrons, havendo profundo efeito do crescimento e metabolismo celular, todavia sua concentração pode ser letal a célula, quando estes dois elementos deixam de ser essenciais para tóxicos, em concentrações excessivas (De Freitas, 2003). O Cádmio em concentrações entre 0,05 e 0,5mM é tóxico às células de *Saccharomyces*, como a linhagem industrial PE-2 (Mariano da Silva e Basso, 2004). Todavia esta toxicidade depende das características químicas do meio, pH e concentração da fonte de carbono (Mariano da Silva *et al*, 2009). O cálcio e o magnésio presente no caldo estão relacionados com a capacidade de tolerância ao estresse causado pela desidratação e hidratação (Trofimova et al, 2010), sendo importante para a estabilização das membranas das células de leveduras além de serem um íon protetor na em altas concentrações de etanol, principalmente quando submetidas a grandes variações do meio, como a pressão osmótica (Courchesne *et al*, 2011). Estes nutrientes são de fundamental importância em processos industriais que centrifugam a biomassa celular, havendo assim a perda de umidade. Os íons de fósforo e magnésio acumulados nas células de leveduras são importantes para a fermentação alcoólica (Villen *et al*, 2009). Desta forma, a composição do caldo sofre variabilidade quantitativa e qualitativa, tanto entre locais de cultivo como entre variedades (Fernandes, 2003)

## 2.7. Fermentação Alcoólica.

O metabolismo das células de leveduras *S. cerevisiae* é muito eficiente. O processo mantém mais de 90% do trabalho máximo que poderia ser extraído do meio de crescimento, todavia outros produtos, além do bioetanol são formados o que reduz a eficiência de conversão da glicose em bioetanol para, em muitas vezes, menos de 75%, sendo esta taxa de redução relacionada com o consumo específico de ATP para o crescimento celular, ou seja, produção de biomassa (Teh e Lutz, 2010). Desta forma, os metabolismos centrais do carbono em *S. cerevisiae*, têm sido amplamente investigados, sendo utilizado para a determinação dos sub-produtos do tipo C1 (CO<sub>2</sub>), C2, (etanol e acetato), C3 (piruvato e glicerol) e C4 (ácidos orgânicos, abrangendo fumárico, ácido málico e succínico) (Otero *et al.*, 2007).

A fermentação acontece na ausência de oxigênio ou em sua presença quando a respiração é inibida por altas concentrações de glicose, como ocorre em *S. cerevisiae* (Espósito e Azevedo, 2004). Altas concentrações de glicose são encontradas no mosto de alimentação, sendo este um meio no qual as células de *S. cerevisiae* sobrevivem com poucas reservas energéticas, dado o baixo rendimento em ATP obtido com a expressão da via fermentativa. No processo de fermentação alcoólica a levedura *S. cerevisiae* produz principalmente etanol, biomassa, glicerol e CO<sub>2</sub>. Em teoria, durante fermentação anaeróbia, para cada grama de glicose que entra na via glicolítica ocorre produção máxima de 0,51 g de etanol e 0,49 g de CO<sub>2</sub>. Devido à produção de biomassa e de glicerol, os valores de 0,46 g de etanol (correspondente a 90% do máximo teórico) e 0,44 g de CO<sub>2</sub> são mais aceitáveis. No processo de produção de álcool combustível no Brasil, o caldo de cana cru ou o melaço são fermentados por *S. cerevisiae* ao longo de toda a safra. Após cada batelada de fermentação, ou durante o processo de fermentação contínua, as células de levedura são separadas do meio fermentado por centrifugação e reutilizadas no processo, após serem tratadas com ácido sulfúrico para redução da contaminação bacteriana. A elevada concentração de açúcar no meio de fermentação, temperatura entre 33°C e 35°C e o ambiente anaeróbio contribuem para a maior eficiência na produção de etanol. O curto tempo de fermentação de 6 h a 10 h nas fermentações em batelada permite a reutilização das leveduras até três vezes por dia, num período de aproximadamente 200 dias de atividade fermentativa (Wheals *et al.* 1999).

Em uma revisão sobre a ecologia de microrganismos industriais, Handelsman e Lawrence (2002) comentam o quanto a microbiologia industrial explora as adaptações de comunicações e sobrevivência desenvolvidas pelos microrganismos nos diversos ambientes. O estudo destas explorações é a união da microbiologia industrial com a microbiologia ecológica, havendo várias hipóteses sugeridas para ilustrar como a vitalidade e a variedade da comunidade microbiológica e suas interações com o ambiente químico e físico possibilitam usos industriais tão diversos. Algumas características são desejáveis aos microrganismos utilizados industrialmente, tais como: apresentar elevada eficiência na conversão do substrato em produto; permitir o acúmulo do produto no meio de forma a se ter elevada concentração do produto no caldo fermentado; não produzir substâncias incompatíveis com o produto; apresentar constância quanto ao comportamento fisiológico; não ser patogênico, não exigir condições de processo muito complexas; não exigir meios de culturas dispendiosos; e, permitir a rápida liberação do produto para o meio (Schmidell, 2005). Silva (2008) também ressaltou que os avanços das mudanças ocorridas, desde os incentivos do Proálcool na área de produção industrial, aumentaram o rendimento e a produtividade da fermentação alcoólica, diminuindo desta forma os custos de produção pela inserção de novas variedades de cepas de leveduras, mais resistentes a elevados teores alcoólicos e intempéries diversas provocados durante os processos industriais de fermentação.

Durante o processo de fermentação as células de *S. cerevisiae* devem responder rapidamente a uma grande quantidade de tensões externas, a fim de sobreviver num ambiente de constantes mudanças (Junmei, 2010). Diferentes tipos de estresses ambientais e fisiológicos desafiam constantemente a vida dos microrganismos, principalmente em processos produtivos industriais, fazendo com que as células desenvolvam respostas rápidas a nível molecular para a reparação e proteção quanto a futuras exposições do mesmo e a outros tipos de estresse. Induz-se assim, nas células de levedura a necessidade de ajustes regulatórios às condições adversas, denominadas Resposta ao Estresse ambiental (Environmental Stress Response, ou ESR). Estas respostas são comuns sob diferentes tipos de estresses e envolvem mudanças em aproximadamente 900 genes, sendo cerca de 300 genes induzidos e 600 genes reprimidos, proteínas e fatores celulares (Cardona *et al*, 2007); (Estruch , 2000).

Todavia o controle adaptativo é de grande importância para aperfeiçoamento do processo de fermentação (Vogel, 1996). Durante o processo industrial, as células de levedura nunca encontram a fisiologia ambiental ótima, e são certamente expostas a excessivas e simultâneas condições de estresses, tais como a oxidação, estresse hiperosmótico, estresse iônico, elevadas temperaturas, ácidos orgânicos, alcoólico e limitações e escassez de nutrientes, afetando a viabilidade e a eficiência da fermentação, além de favorecer a presença de microrganismos competidores. Ainda não está bem definida a relação dos diferentes tipos de estresse testados (oxidativo, osmótico e ao etanol) em diferentes linhagens de *S. cerevisiae*, mesmo assim é possível a classificação de três diferentes grupos de acordo com o seu comportamento fermentativo sob condição de estresse: 1) linhagens que completam a fermentação; 2) linhagens que não completam a fermentação e deixam açúcar residual no meio; 3) linhagens que não completam a fermentação, mas que consomem todo o açúcar do meio (Aurora *et al*, 2004), (Cardona *et al*, 2007).

## **2.8. Considerações**

Desde os incentivos do Proálcool, Programa Nacional do Álcool, no ano de 1970, vários avanços tecnológicos, frutos da pesquisa científica, alavancaram a bioprodutividade da industrial sucroalcooleira no Brasil. Logo, no cenário agrícola, novas variedades de cana foram conseguidas melhorando as condições cultivares e com maiores rendimentos em produção de toneladas de açúcar por hectare. No cenário industrial, além de tecnologias mecânicas de processamento e tratamento do caldo de cana em mosto de alimentação, o processo fermentativo, foi amplamente sofisticado.

Ainda que os avanços produtivos tenham acontecido, a integração destes ainda é pouco coesa. Desta forma, questionamentos levam, freqüentemente ao surgimento de indagações, tais como, Qual a variedade de cana de açúcar tem melhor aproveitamento nutricional à produção de etanol?; Existe a cana de açúcar melhor, para cada região à fabricação de etanol?; Qual a interferência do mosto de alimentação de diferentes variedades nas células de leveduras? e por fim, quais os parâmetros relevantes para a resposta destas perguntas na vivência industrial?. Portanto, este trabalho busca contribuir nestas elucidações.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allison, J.C.S., Pammenter, N.W., Haslam, R.J. Why does sugarcane (*Saccharum* sp. hybrid) grow slowly?. *South African Journal of Botany*. vol 73. pp 546–551. 2007.

Amorim, H. V. *et al.* Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Appl Microbiol Biotechnol*. vol 9. pp 1267–1275. 2011.

Argueso, J. L. *et al.* Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. *Genome Research*. By Cold Spring Harbor Laboratory Press Vol 19:2258–2270. 2009.

Aurora, Z., Marcel, L. D. O. Analyses of stress resistance under laboratory conditions constitute a suitable criterion for wine yeast selection. *Antonie van Leeuwenhoek*. p.271-280, 2004.

Basso, L. C., Amorim, H. V., Oliveira, A. J. de., Lopes, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Res*. 8:1155–116. 2008.

Boletim Mensal dos Combustíveis Renováveis. Ministério de Minas e Energia. Secretaria de Petróleo, Gás Natural e Combustíveis Renováveis. Departamento de Combustíveis Renováveis, N°42, 2011.

Butzke, C. E., Seung, K. P.. Impact of Fermentation Rate Changes on Potential Hydrogen Sulfide Concentrations in Wine. *J. Microbiol. Biotechnol*. 21: 519–524. 2011.

Caldas, C. Manual de análises selecionadas: para indústrias sucroalcooleiras. Sindicato da Indústria do Açúcar e Alcool no Estado de Alagoas. p. 424, 1998.

Campos, M. P. Produção de etanol a partir de matérias-primas sacarinas. In: Furtado, J. S. Fermentações Industriais & Transformações Microbianas. Sociedade Brasileira de Microbiologia. São Paulo. P 92 – 98. 1980.

Cardona, F. *et al.* A novel approach for the improvement of stress resistance in wine yeast. *International Journal of Food Microbiology*. v.114, p. 83-91, 2007.

Carvalho, Lessandro. Açúcar e Álcool – Agrobusiness, São Paulo Ano 64, nº 720 pg. 32 novembro 2008.

Courchesne, W. E. *et al.* Ethanol induces calcium influx via the Cch1-Mid1 transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol*. 193:323-34. 2011.

Cesnik. R., Jacques, Y. J. Melhoramento da cana-de-açúcar. Embrapa. 1ª ed. p.307. ISBN: 85-7383-282-7. 2004.

Esposito, E., Azevedo, J. L. Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Coleção Biotecnologia. EDUCS. Caxias do Sul. p. 510, 2004.

Estruch, F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *Microbiology Reviews*. v.24, p.468-486, 2000.

Fernandes, A. C. Cálculo na agroindústria da cana de açúcar. 2ªed. Piracicaba. STAB. p.240, 2003.

Glassop, D., Roessner, U., Bacic, A., Bonnett, G. D. Changes in the Sugarcane Metabolome with Stem Development. Are They Related to Sucrose Accumulation?. *Plant Cell Physiol*. 48(4): 573–584. 2007.

Handelsman, J., Lawrence, P. W. Microbial diversity – sustaining the Earth and industry.

Ecology and industrial microbiology. Editorial overview. *Current Opinion in Microbiology*. v.5, p.237–239, 2002.

Junmei, D., Xiaowei, H., Na, Z., Feng, Gao, Q. L., Ke-Qin, Z.. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to Ethanol Stress Involves Actions of Protein Asr1p. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 1630–1636. 2010.

Li, Y *et al.* Influence of metal addition on ethanol production with *Pichia stipitis* ATCC 58784. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 36:491–497. 2009.

McCormick, A. J., Watt, D. A., Cramer, M. D. Supply and demand: sink regulation of sugar accumulation in sugarcane. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 60, No. 2, pp. 357–364, 2009.

Mariano da Silva, S. Basso, L. C. Efeito do cádmio sobre o crescimento das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e *Saccharomyces cerevisiae* IZ-1904, e a capacidade da vinhaça em atenuar a toxicidade. *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas.* 24(1): 016-022. 2004.

Mariano da Silva, S. *et al.* Effect of pH, dextrose and yeast extract on cadmium toxicity on *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas.* 29(2): 295-299. 2009.

Otero, J. M., Olsson, L., Nielsen J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* microbial cell factories for succinic acid production. *Journal of Biotechnology.* pp. 196–S210. 2007.

Payne, J. H.. *Operações unitárias na produção de açúcar de cana.* São Paulo: Nobel: STAB, 1989.

RIDESA (Rede Interuniversitária para o desenvolvimento do setor Sucoenergético). *Catálogo Nacional de Variedades “RB” de cana de açúcar.* Curitiba. p.136, 2010.

Santos, A.M. Estudo da influência da complementação de nutrientes no mosto sobre o processo de fermentação alcoólica em batelada. Dissertação. UFAL. Centro de ciências exatas, p. 77, 2008.

Schmidell, W. Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. Edgar Blucher. v. 2, p. 541, 2005.

Shou, W., Ram, S., Vilar, J. M. G. Synthetic cooperation in engineered yeast populations. PNAS. Feb. Vol. 104. No. 6. pp.1877–1882. 2007

Silva, F. L. H. Modelagem, simulação e controle de fermentação alcoólica contínua extrativa. Campinas: UNICAMP. 162p. Tese. 1998.

The, K.Y., Lutz, A E.. Thermodynamic analysis of fermentation and anaerobic growth of baker's yeast for ethanol production. Journal of Biotechnology. vol 147. pp 80–87. 2010.

Tosetto, G. M. Comportamento de linhagens industriais de *Saccharomyces* frente a compostos inibitórios presente no melaço de cana-de-açúcar na produção de bioetanol. Campinas. Tese. UNICAMP. Programa de pós-graduação em Engenharia química. p.255, 2008.

Trofimova Y., Walker, G., Rapoport, A. Anhydrobiosis in yeast: influence of calcium and magnesium ions on yeast resistance to dehydration–rehydration. FEMS Microbiology Letters. Volume 308. Issue 1. Page 55-61. July 2010.

ÚNICA, União das Indústrias de cana de açúcar. Disponível em: <http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica/>. Acessado em 15/12/2011.

Villen, R. A. *et al.* Influence of the Accumulation of Phosphate and Magnesium Ions in the Yeast Cells on the Ethanol Productivity in Batch Ethanol Fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. Vol. 52, n. 1: pp. 153-155. 2009.

Vogel, H.C., Todaro, C.L. *Fermentation and biochemical engineering handbook: principles, process design and equipment*. Second edition. Noyes Publications. 1996.

Walker, G. M. Fuel Alcohol: Current Production and Future Challenges. *J. Inst. Brew.* 117(1), 3–22, 2011

Wheals, E. A, Basso, LC. Alves, D. M. G. Amorim, H. V. Fuel ethanol after 25 years. *Trends Biotechnol.* vol 17:482-487.1999.

Zhao, X.Q., Xue, C., Ge, X.M., Yuan, W.J., Wang, J.Y., Bai, F.W. Impact of zinc supplementation on the improvement of ethanol tolerance and yield of self-flocculating yeast in continuous ethanol fermentation. *Journal of Biotechnology.* vol 139. Pp 55–60. 2009.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo Geral.**

- Avaliar a influência de composição nutricional do caldo de diferentes variedades de cana de açúcar na produção de etanol.

### **4.2. Objetivos Específicos.**

- Analisar a influência de compostos nutricionais presentes no caldo de cana de açúcar no rendimento e eficiência fermentativa.
- Identificar os diferentes componentes do caldo das mesmas variedades de cana de açúcar cultivadas em diferentes Estados da região Nordeste.
- Correlacionar fatores físicos e químicos do caldo de cana de açúcar nos indicadores da vitalidade celular durante o processo fermentativo.
- Verificar a interferência do mosto de alimentação de caldo de cana de açúcar na eficiência fermentativa da biomassa de leveduras no processo industrial.

## **5. CAPÍTULO 1.**

**TÍTULO:** Physical and chemical aspects of the sugar cane juice that affect fermentative ability of yeast cells.

**AUTORES:** João Assis Scavuzzi Menezes, Marcos Antônio de Moraes Júnior.

**REVISTA:** Journal of Agricultural and Food Chemistry

**IMPACT FACTOR:** 2.816

**Physical and chemical aspects of the sugar cane juice (*Saccharum officinarum*) that affects fermentative ability of yeast cells.**

João Assis Scavuzzi Menezes<sup>1\*</sup>, Marcos Antônio de Moraes Junior<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Interdepartmental Research Group in Metabolic Engineering – NEM/UFPE.

<sup>2</sup> Department of Genetics<sup>3</sup> - Federal University of Pernambuco – Recife – PE, Brasil.

**\* Corresponding:**

Graduation Program in Biological Sciences

Biological Sciences Center, Federal University of Pernambuco (UFPE)

Av. Moraes Rego, 1235

50670-901, Recife - PE - Brasil

Phone: + 55 81 2126 7811

e-mail: [joaoasm@hotmail.com](mailto:joaoasm@hotmail.com)

## **Resumo**

Há muitas perguntas sobre a influência ou matéria-prima no processo de fermentação. Este estudo visa elucidar como as propriedades físicas e químicas do caldo de cana afeta a bioprodutividade durante a fermentação alcoólica. As amostras de variedades de cana de açúcar RB867515, RB 92579 e RB 863129 foram coletadas em campos agrícolas de três destilarias nos estados de Pernambuco, Paraíba e Maranhão. Eles foram esmagados separadamente e o caldo foi submetido a uma fermentação química após análise prévia, que foram realizados com duas estirpes industriais de *Saccharomyces cerevisiae*. O consumo de açúcar, a produção de metabólitos, bem como a viabilidade celular e variação de pH foram avaliados. Os resultados mostraram que o tipo de solo nas áreas agrícolas, em vez de variedade de cana afetada mais a viabilidade da célula das estirpes de leveduras. Este efeito não foi relacionado ao perfil mineral dos sucos. Além disso, os resultados da produção de etanol são sugestivos de que o sumo a partir da variedade RB 92.579 foi mais apropriado para a produção de etanol, independentemente do tipo de campo de culturas.

**Palavras-chave:** cana de açúcar, composição mineral, fermentação alcoólica, *Saccharum officinarum*, *Saccharomyces cerevisiae*, variedade genética

## **INTRODUÇÃO**

A forte expansão da atividade industrial relacionado à produção de etanol combustível tem impulsionado o desenvolvimento de novas variedades de cana, o que significa que o Brasil conta atualmente com cerca de 78 próprias variedades genômicas. Apesar dos grandes avanços para as características de cada variedade, pouco se sabe sobre seu potencial para a industrialização e impactação na fermentação industrial sobre as células de levedura na produção de etanol. Esta informação torna-se de grande importância para o facto de que a eficiência de uma planta de etanol a ser definido pela eficiência de gestão agrícola acoplado com a indústria. Depois de cana de açúcar é recebida na fábrica, o caldo é processado e muito das suas impurezas físicas e microbiológicas são eliminados. Em seguida, este deve fornecer é utilizado em conjunto com as células de levedura para a fermentação. Este processo é contínua ao longo de todo o rendimento época de colheita e é caracterizada por reciclagem da biomassa celular. Durante o processo de industrialização de sumo de cana de açúcar, as células de levedura são submetidos a grandes flutuações do meio, devido à variabilidade na composição de nutrientes. Em adição a isto, as mudanças físicas e químicas do caldo de cana durante o metabolismo do açúcar ao álcool ocorrem como um resultado da variação da osmolaridade inicial e final, pH, temperatura, a disponibilidade de nutrientes, densidade e aumento gradual da concentração de etanol, caindo directamente na fermentação rendimento industrial. Por conseguinte, existe uma necessidade de utilizar estirpes com a capacidade de adaptação elevada. Usando diferentes variedades de cana-de-açúcar e relacionando os testes de fermentação de matérias-primas, este estudo visa contribuir para a compreensão do efeito da sugarcane variedade e da região de produção como uma ferramenta de diferenças qualitativas da mesma variedade de cana plantada em lugares diferentes, convergência qualitativa de diferentes variedades de cana plantada no mesmo ambiente e sua influência sobre a capacidade de fermentação de leveduras industrialdifferent. Os resultados podem auxiliar na gestão de instalações de produção de etanol.

## **MATERIAIS E MÉTODOS.**

### **Amostras de cana de açúcar**

Neste estudo foram selecionadas e coletadas amostras de caldo de cana de três variedades de cana de açúcar, por serem as de maior prevalência de cultivo nos canaviais da região nordeste do Brasil. As variedades RB 867515, a RB 92579 e a RB 863129 foram todas coletadas nos campos agrícolas da usina Itapecuru Bioenergia, localizada no estado do Maranhão (região IT) no município de Aldeias Altas, Destilaria TABU, localizada no estado da Paraíba (região TB) no município de Caaporã e da Usina Santa Teresa, localizada no estado de Pernambuco (região ST) localizada na cidade de Goiana. As coletas foram realizadas em canas de açúcar do tipo “planta”, ou seja, canaviais plantados submetidos aos primeiros cortes. As amostras foram obtidas no período diurno, no horário entre as 10 h e 12 h da manhã, no mês de agosto no início da safra 2011/2012, em acordo com o modelo experimental de amostragens utilizado por Cesnik e Jacques (2004), no qual, em cada Estado, foram escolhidos três talhões de cada variedade, sendo estes amostrados em três pontos (touceiras) equidistantes, retirando de cada ponto três canas de açúcar por touceiras, formando uma amostra de composição mista com 27 canas de açúcar para cada variedade testada, e organizando-as em feixes com a respectiva identificação (Figura 4). Para as três variedades, em todos os Estado, totalizaram-se 81 canas de açúcar coletadas em todos os campos agrícolas.

Apenas foram coletadas as plantas fisiologicamente consideradas maduras (IM entre 0,91 e 1,0), e sem a utilização de qualquer maturador químico. Foram extraídos previamente ao corte os caldos de canas dos colmos da base, meio e ápice, furados com o amostrador do tipo havaiano, produzido na própria indústria, e logo em seguida, aferidos os valores de brix, com a utilização do refratômetro portátil do modelo IPS 10T-Impac, com correção da leitura automática. Em seguida, foram procedidos os cálculos dos índices de maturação. As amostras de cana foram conduzidas até o laboratório de sacarose das respectivas fábricas, onde foram processadas para a extração do caldo. Os equipamentos utilizados foram higienizados previamente utilizando o biocida quaternário de amônio e água em ebulição.

Os feixes de cada talhão foram processados em forrageira para a exposição das fibras e logo em seguida foram esmagadas em prensa mecânica para a obtenção dos caldos das canas. A partir deste momento passamos a agrupá-los em acordo com cada variedade, separadamente para obtenção de uma única amostra de composição mista para cada variedade, totalizando 3 amostras com volume de 4 litros, armazenadas em saco do tipo

NASCO<sup>®</sup> esterilizados e congelados em freezer a -20°C, para posterior utilização de 2 litros na experimentação fermentativa no laboratório do CETENE/MCT e 2 litros no laboratório da Empresa Central Analítica, em Maceió-AL, para determinação da composição nutricional de cada variedade e região. As amostras foram submetidas à digestão nítrica-perclórica para posterior aferição da concentração dos elementos nitrogênio total, fósforo, sódio, cálcio, magnésio, potássio, ferro, ferro zinco, cobre e manganês através do método de absorção atômica.

Os caldos de cana coletados, sem diluição, foram centrifugados durante 3 minutos a 3.000 g em tubos do tipo Falcon de 15 ml com objetivo de eliminar impurezas. O sobrenadante foi transferido para frascos do tipo Erlenmeyers de 250 ml, esterilizados por autoclavagem a 121°C por 15 minutos e esfriados em temperatura ambiente. Um volume de 100 ml foi utilizado em cada frasco para o experimento de fermentação.

### **Linhagens de levedura**

As linhagens industriais de *S. cerevisiae* JP1 (Silva-Filho *et al*, 2005) e PE-2 (Basso *et al*, 2008) foram utilizadas por serem as linhagens de maior utilização em fermentações industriais na região nordeste (Argueso *et al*, 2010) e terem sido isoladas em caldo de cana de destilarias do Brasil, na sua forma comercial liofilizadas fornecidas pelas empresas AEB Bioquímica Latino Americana (São José dos Pinhais, PR) e LNF (Caxias do Sul, RS). O procedimento de obtenção de inóculo foi adaptado de Campos *et al*, (2010). Para cada batelada foram preparados inóculos, pela suspensão de seis gramas do fermento liofilizado em 60 ml de água destilada esterilizada, sob agitação durante 30 minutos a 30°C em estufa microbiológica, com a finalidade de hidratar e ativar as células do fermento. Após a hidratação, a biomassa celular foi centrifugada em tubos do tipo Falcon de 15 ml, durante 3 minutos a 3.000 g e o sobrenadante descartado. A biomassa celular foi pesada e coletado o equivalente a 10 g da levedura úmida para adição aos 100 ml do mosto de fermentação. A fermentação foi conduzida a 32°C sem agitação e sem controle de pH por oito horas. Cada batelada foi realizada em triplicata.

### **Ensaio fermentativos com amostras industriais**

Durante a safra 2011/2012, na Destilaria Japungú, localizada na Paraíba, foram coletadas amostras, duas vezes por semana de Mosto de alimentação, na entrada das dornas de fermentação e do fermento centrifugado, após serem tratados em pré-fermentadores, sob diluição em água tratada até a concentração de aproximadamente 60% (p/v), após a adição de ácido sulfúrico até pH entre 2,5 e 2,8 e temperatura entre 30 a 35°C. As amostras foram transportadas em saco do tipo NASCO® a temperatura de 22°C.

Os procedimentos de obtenção do mosto de alimentação, preparação do inóculo, condições fermentativas e determinação dos parâmetros fermentativos foram os mesmos utilizados com as amostras de caldos das três variedades RB. Neste experimento, como inóculo, foi utilizado o fermento JP1, o mesmo fermento utilizado durante a safra da Destilaria Japungú, fornecido pela empresa AEB Bioquímica Latino Americana (São José dos Pinhais, PR). Desta forma estabelecendo a capacidade fermentescível do mosto de alimentação.

As biomassas coletadas foram centrifugadas três vezes, descartando o sobrenadante, a 3.000 g durante 5 minutos, em tubos do tipo Falcon de 15 ml. A biomassa celular foi pesada e coletada ao equivalente a 10 g da massa centrifugada úmida para adição aos 100 ml de meio YED modificado de Mariano da Silva e Basso (2004), quanto à fonte de carbono, sendo composto por extrato de levedura 1%, peptona 1% e sacarose 2%, autoclavado a 121°C por 20 minutos. As condições fermentativas e determinação dos parâmetros fermentativos foram os mesmos utilizados com as amostras de caldos das três variedades RB.

### **Parâmetros fermentativos.**

Os parâmetros avaliativos foram realizados no momento da adição do inóculo ao mosto. Após breve agitação, as amostras foram coletadas e submetidas à centrifugação para separar as células do mosto (amostra-referência). Depois da fermentação as amostras foram coletadas como acima para as análises. O sobrenadante foi utilizado para as análises químicas e as células foram utilizadas para determinação da viabilidade celular e da formação de biomassa de acordo com o fluxograma.

O °Brix foi determinado em temperatura ambiente, coletando-se 1 ml do sobrenadante com o auxílio da Pipeta de Pasteur descartável esterilizada e fazendo a leitura

no refratômetro digital Modelo RTD 45 com ajuste de campo automático e com correção automática de temperatura, expressando o valor final a 20°C (Junior, 2010).

A concentração de açúcar foi realizada pelo método espectrofotométrico com o ácido dinitrosalissílico (DNSA) (Ferreira *et al*, 2010). Foi preparada uma curva de calibração com glicose nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 g/l. O volume de 1 ml tanto das soluções de glicose como dos mostos fermentados foi misturado com 100 µl de HCl 1M. Quando necessário, as amostras de fermentação foram diluídas com água destilada. Para referência foi utilizado 1 ml de água destilada. Após a agitação, as amostras foram aquecidas a 100°C por 10 minutos para hidrólise da sacarose e em seguida neutralizadas por adição de 100 µl de NaOH a 1M. Para determinação da concentração dos açúcares foi adicionado 1 ml do reativo de DNSA e as amostras diluídas para o volume final de 10 ml com água destilada. Após o resfriamento, a densidade óptica (DO) das amostras foi determinada no comprimento de onda de 540 nm. O valor de açúcar em g/l foi obtido multiplicando-se o valor da leitura da DO pela diluição e pelo fator de calibração determinado pela curva de calibração utilizando glicose. O açúcar consumido foi determinado pela subtração da concentração inicial ( $A_i$ ) da concentração ao final da fermentação ( $A_f$ ) (Li e Ci, 1995)

A determinação do potencial hidrogeniônico foi realizada em temperatura ambiente, através da submersão do eletrodo do potenciômetro, após sua sanitização com álcool concentrado a 70%, diretamente nos frascos Erlenmeyers.

O percentual de células vivas foi determinado conforme Pereira *et al* (2011), utilizando o corante azul de metileno preparado na concentração de 0,1 g/l em água destilada autoclavada. Foi utilizada a câmara de Neubauer em microscópio com objetiva de 60x e ocular de 1,5. O valor da Variação da viabilidade celular ( $V_c$ ) foi encontrado pela subtração do valor da viabilidade final ( $V_f$ ) pelo valor da viabilidade inicial ( $V_i$ ), multiplicando o produto por 100, obtendo o resultado em percentual.

As amostras de fermentação foram coletadas com seringas esterilizadas, filtradas em filtros Millipore de 0,22 µm (Hanh e Kim, 2004) e diluídas 1:10 com água filtrada e destilada. O teor alcoólico, de acetato (ácido acético) e de glicerol foram determinados por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) em equipamento Agilent Technologies 1200 Series com a coluna da marca HPX87H em fase móvel de ácido sulfúrico a 5 mM, a 45°C. A detecção foi realizada com detector de índice de refração. A identificação dos metabólitos foi

feita por comparação dos tempos de retenção com soluções-padrão e a concentração de cada metabólito foi determinada por integração dos picos do cromatograma e relação da área de cada pico com o fator de calibração de cada solução-padrão, através da metodologia adaptada de Zhao *et al* (2009).

O rendimento etanólico foi determinado pela razão entre a concentração de etanol e o açúcar consumido, e expresso como gramas de etanol produzido por gramas de açúcar consumido (g/g). A eficiência da fermentação foi determinada para cada sistema de batelada como o percentual do rendimento obtido em relação ao rendimento teórico máximo que é de 0,511 g/g.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Caracterização nutricional dos caldos de cana.**

A análise da composição mineral dos diferentes caldos de cana revelou que houve uma grande variação para todos os minerais, acima de 10% do valor médio, para todas as amostras testadas em variedades e regiões (Tabela 1). Esta variação quantitativa está relacionada com a disponibilidade nutricional do caldo e tem influência sobre a bioprodutividade celular. Petti *et al* (2011) realizaram um trabalho no qual relacionaram fatores fisiológicos com a expressão genética quando vários nutrientes foram esgotados no meio. Esse estudo mostrou que a resposta à limitação nutricional está correlacionada com a expressão de genes que codificam o estresse oxidativo, e que, em geral, a taxa de mortalidade das células de leveduras é baixa, ou seja, a viabilidade celular é baixa quando relacionada com a falta de nutrientes específicos como as fontes de carbono, nitrogênio, fósforo ou sulfatos. O esgotamento de aminoácidos ou outros metabólitos estão relacionados com a alta e rápida perda da viabilidade celular.

De forma notória para os dados apresentados na Tabela 1, os valores de cobre e de zinco apresentaram variações acima de 100%, enquanto magnésio e fósforo ficaram muito próximos desse valor. Por outro lado, o cálcio apresentou a menor variação dentre os minerais. Em função dessa grande variabilidade, os valores médios foram agrupados dentro de uma determinada região de coleta ou em relação à variedade da cana de açúcar (Tabela 2). De modo geral, os valores médios da cana na região ST foram maiores do que nas outras

regiões, com exceção do potássio que foi menor em 15% da média geral. Por outro lado, os valores minerais da cana coletada na região TB apresentaram-se menos de 15% dos valores médios, com exceção do magnésio e fósforo. Já em relação à variedade da cana, no geral a RB 867515 apresentou as maiores concentrações de minerais, com destaque para a alta concentração de zinco no caldo desta variedade coletado na região ST. Por outro lado, a variedade RB 92579 apresentou as menores concentrações de minerais, com destaque para os déficits de zinco e fósforo (Tabela 2).

Existem outros elementos traços presente no caldo de cana e que não foram passíveis de avaliação neste estudo, entre estes, destaca-se o alumínio. Sendo um dos metais encontrados com maior frequência, inibe a produtividade de várias culturas por afetar o metabolismo microbiano. Segundo Poschenrieder e Jerzy (2008), o alumínio também é extremamente citotóxico às plantas, afetando os tecidos da raiz, logo prejudicando o crescimento. Oliveira *et al* (2009), ao estudarem a utilização da vinhaça da cana de açúcar para atenuar os efeitos adversos do alumínio no crescimento celular, viabilidade e brotamento, conseguiram atenuar a diminuição da viabilidade celular e brotamento do início para o término da fermentação, deixando claro que este metal tem efeito negativo quando presente em concentrações elevadas e validando a vinhaça como alternativa mitigadora. O alumínio, segundo Kinraide (2003) é mais abundante em solos com pH mais baixos, como em florestas. Além destes, também possuem concentrações de íons de hidrogênio, cálcio e magnésio. Estas informações, corroboram com nossos resultados, quando verificado a média dos valores de minerais dos caldos de cana em relação a região (Tabela 3), onde foi precebiável que as regiões litorâneas, TB e ST, possuem maiores concentrações de cálcio (105,60 ppm e 108,37 ppm, respectivamente), magnésio (976,67 ppm e 1.396,67, respectivamente). Por conseguinte aos nossos resultados e os obtidos por Kinraide (2003), vários outros elementos traços, presente no caldo de cana em diferentes concentrações em formas disponíveis, podem ter influenciado os ensaios fermentativos, porém não foram quantificados na caracterização nutricional dos caldos de cana.

**Tabela 1:** Composições minerais dos caldos de canas das diferentes variedades RB coletadas nas fazendas das destilarias Itapecuru (IT), Tabu (TB) e Santa Teresa (ST).

ppm (mg/l)	IT			TB			ST			Média ( $\pm$ dp)
	RB867515	RB92579	RB863129	RB867515	RB92579	RB863129	RB867515	RB92579	RB863129	
<b>Cálcio</b>	97,2	87,9	86	102,3	135,4	79,1	102,1	103	120	101,44 $\pm$ 17,5
<b>Cobre</b>	1,1	3,5	1,6	0,8	0,8	0,6	12,8	2,4	2,1	2,86 $\pm$ 3,8
<b>Ferro</b>	46,5	32,9	32,5	25	26	20,7	32,5	28,7	66,9	34,63 $\pm$ 14
<b>Magnésio</b>	110,1	120	120	1470	95	1365	1435	1370	1385	830,01 $\pm$ 682,7
<b>Manganês</b>	4,6	8,4	6,2	3,0	4,7	4,2	6,4	3,8	3,9	5,02 $\pm$ 1,7
<b>Zinco</b>	10,8	20,8	13,9	9,2	13,9	6,5	291,9	10	6,9	42,66 $\pm$ 93,6
<b>Nitrogênio Total</b>	224	420	294	294	294	210	504	434	322	332,89 $\pm$ 99,2
<b>Fósforo</b>	190,8	160,3	108,5	671,9	108,5	492,1	404	163,1	696,2	312,91 $\pm$ 247,3
<b>Potássio</b>	930	942	990	654	990	690	552	498	900	794,00 $\pm$ 195,3

**Tabela 2:** Média dos valores de minerais dos caldos de cana em relação a variável regional (local de coleta) e variedade de cana.

Ppm (mg/l)	Média							C.M.R. <sup>c</sup>
	Geral	Região <sup>a</sup>			Variedade <sup>b</sup>			
		IT	TB	ST	RB867515	RB92579	RB863129	
<b>Cálcio</b>	101,44	90,37	105,60	108,37	100,53	108,77	95,03	120
<b>Cobre</b>	2,86	2,07	0,73	5,77	4,90	2,23	1,43	0,1
<b>Ferro</b>	34,63	37,30	23,90	42,70	34,67	29,20	40,03	0,1
<b>Magnésio</b>	830,01	116,70	976,67	1.396,67	1.005,03	528,33	956,67	72
<b>Manganês</b>	5,02	6,40	3,97	4,70	4,67	5,63	4,77	0,16
<b>Zinco</b>	42,66	15,17	9,87	102,93	103,97	14,90	9,10	0,39
<b>Nitrogênio</b>	332,89	312,67	266,00	420,00	340,67	382,67	275,33	>1.000
<b>Total</b>								
<b>Fósforo</b>	312,91	153,20	390,20	421,10	422,23	143,97	402,35	>1.000
<b>Potássio</b>	794,00	954,00	778,00	650,00	712,00	810,00	860,00	117

<sup>a</sup> média dos valores minerais das três variedades de cana em uma determinada região de coleta.

<sup>b</sup> média dos valores minerais de uma determinada variedade de cana nas três regiões de coleta.

<sup>c</sup> Concentração Mínima Requerida para fermentação em cerveja usada como referência (Walker, 1998)

Em acordo com a Tabela 2, o valor médio de nitrogênio total nos caldos de cana teve pouca variância regional e para as três variedades de cana utilizada, desta forma tendo os seus valores bem próximo a da média global (332,89 ppm). Esta informação é de grande relevância, pois Aranda *et al* (2004), conseguiram que a célula de levedura de *S. cerevisiae* acumulasse cerca de 13% de seu peso em matéria seca de trealose, principal fonte de reserva energética das leveduras, com a alimentação com fontes de carbono e sem a presença de nitrogênio em sistemas de fermentação em batelada. Em indústria de bioetanol, pelo fato das leveduras utilizarem a trealose como forma de manter sua viabilidade celular, sob condições de estresses ambientais (Pataro, 2002) este elemento é sempre adicionado para a sua manutenção em nível basal, durante todo o processo fermentativo agregando custos ao produto final.

O enxofre é um mineral de grande relevância analítica em caldos de cana de açúcar, devido ao fato de seu metabolismo ser bastante conhecido nas células de leveduras. Estudos recentes de expressão gênica mostraram que diferentes linhagens de *S. cerevisiae* apresentam variações específicas quanto à expressão de seus genes em resposta à adição de nitrogênio assimilável no meio (Ferreira *et al.* 2010; Butzke e Seung, 2011). Esta informação é importante, pois durante o processo de fermentação industrial, as leveduras são submetidas, inicialmente, em dornas de fermentação ao mosto de alimentação, onde a fonte nitrogênio está em concentrações disponíveis (Tabela 2) e após 8 horas de fermentação, o nitrogênio é esgotado no meio. Ao término da fermentação as células são tratadas com ácido sulfúrico, onde tem à disposição o enxofre sem a disponibilidade da fonte de nitrogênio.

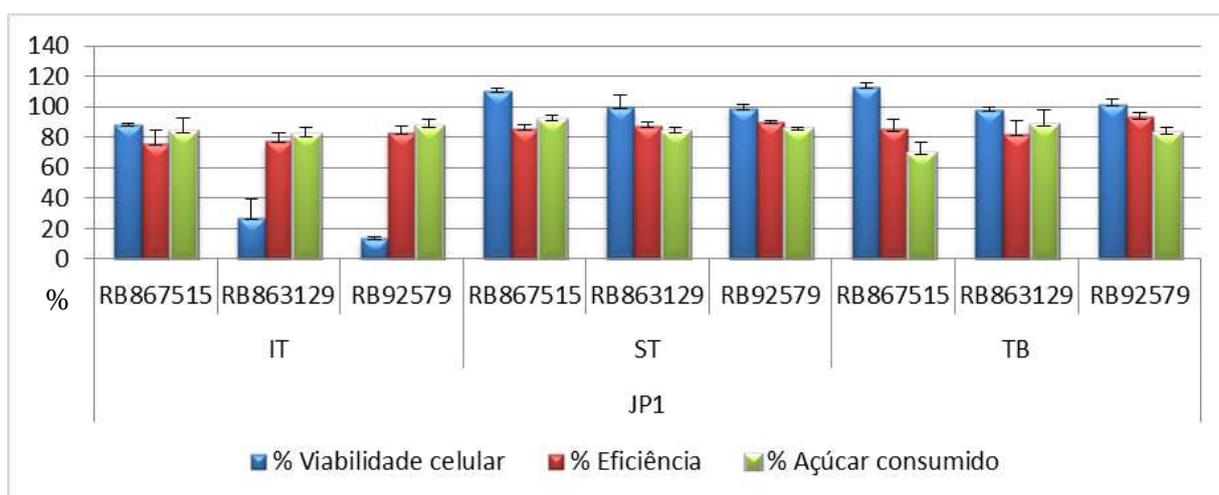
Além dos metais provenientes do mosto de alimentação, as células de leveduras estão sujeitas a metais liberados durante a atividade industrial. O níquel e o cádmio são liberados no meio e são capazes de interferir na bioprodutividade por inibir o metabolismo microbiano, interferindo no crescimento celular, viabilidade celular, taxa de brotamento e acúmulo de trealose (Oliveira, 2011).

### **Parâmetros fermentativos com a *S. cerevisiae* JP1**

Os experimentos de fermentações utilizando a linhagem JP1 mostraram que não houve diferenças no consumo do ART em função da variedade da cana ou do local de coleta (Figura 1). Apenas para o caldo da variedade RB 867515, coletada na região TB houve uma pequena redução no consumo do ART. Para este tipo de fermentação incompleta, Santos *et al.* (2008) propuseram a reinoculação com células de *S. cerevisiae* em fase estacionária de crescimento para redução das perdas econômica industriais. Neste mesmo trabalho, os autores questionam a confiança do uso da viabilidade celular como uma ferramenta a ser utilizada na seleção de leveduras para refazer o segundo inóculo, pois o mais preciso seria os critérios de tolerância a etanol e o transporte de açúcares (glicose, frutose e sacarose). Desta forma, possibilitando a inserção de estratégias inovadoras no cenário industrial. Observa-se na Figura 1 que não houve variação na viabilidade da população de leveduras nas canas das regiões ST e TB. Já na região IT o caldo extraído das variedades RB 863129 e RB 92579 provocaram decréscimo de mais de 50% na viabilidade da população de leveduras. Para a primeira variedade observa-se a combinação das maiores concentrações de cobre, manganês,

zinco e nitrogênio total; já para a segunda variedade não foi possível se estabelecer relação com a composição mineral do caldo (Tabela 1).

Apesar de não ser bem estudado, o zinco está relacionado com a resposta ao estresse durante a produção de bioetanol (Qing, 2011). Em nossos resultados, ao analisarmos a Figura 9, percebe-se que as viabilidades celulares das variedades RB 863129 e RB 92579, na região IT tiveram quedas significativas em seu percentual. Ao fato, devemos considerar que nestes caldos de cana a dosagem de zinco foi praticamente o dobro quando comparamos a mesmas variedades nas regiões ST e TB. O acúmulo de zinco na biomassa de leveduras pode ser aumentado em 63% com a aplicação nas culturas celulares de campos elétricos pulsados (Pankiewicz e Jamroz, 2011). Este fato é relevante, pois no cenário industrial, várias são as fontes de campos elétricos formados por soldas constantes nos biorreatores de fermentação, muitas vezes, durante a continuidade do processo. A grande quantidade desses m minerais no mosto fermentado poderia também afetar a condutividade do mosto de alimentação, estimulando a maior assimilação dos metais pelas células. Informações empíricas do cotidiano industrial traduzem esta possível situação, quando, durante o processo de multiplicação do inóculo inicial da fermentação, normalmente com fermento liofilizado, a viabilidade celular é drasticamente reduzida quando existem soldas sendo feitas nos bioreatores, possivelmente induzindo a citotoxicidade pelo zinco (informações técnicas proveniente do pessoal das destilarias). Sem dúvida que este efeito merece ser melhor estudado.



**Figura 1.** Parâmetros fisiológicos dos experimentos de fermentação com caldo das três variedades de cana coletadas nas três regiões de avaliação utilizando a linhagem industrial *Saccharomyces cerevisiae* JP1.

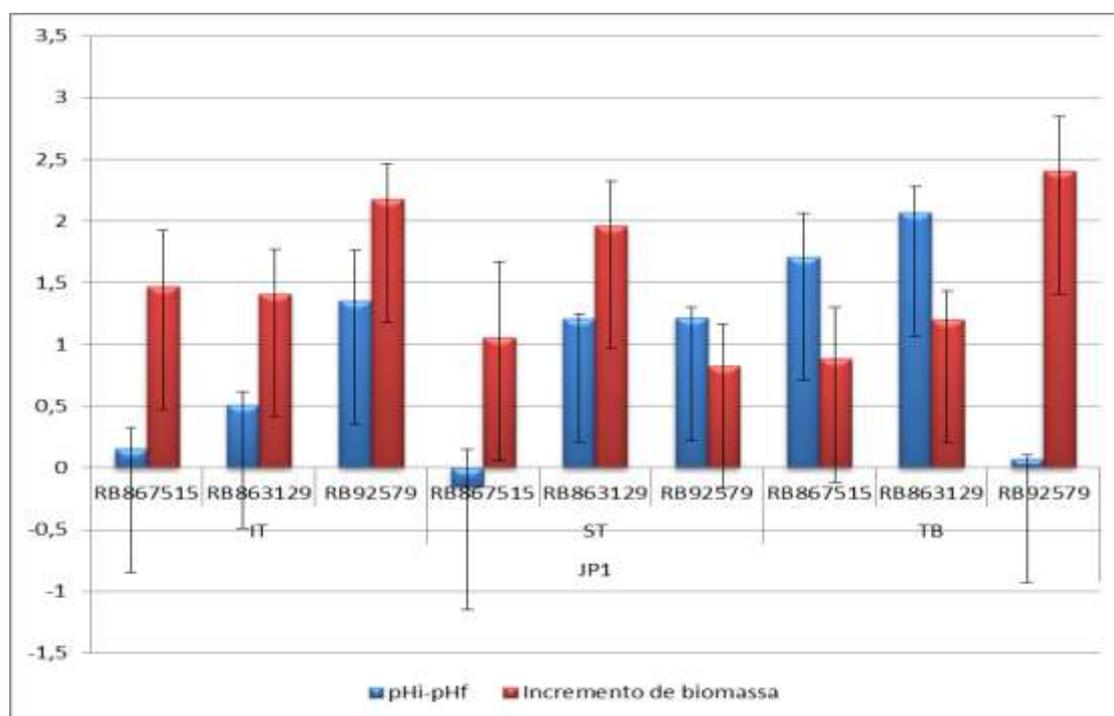
Zhao (2009) utilizou a suplementação do meio com diferentes concentrações de zinco para estudar seu efeito na tolerância celular ao etanol e na produção de autofloculação por células de *S. cerevisiae*. Em todas estas dosagens houve incremento da resistência a alta temperatura e a alta concentração de etanol, com aumento do conteúdo de ergosterol na membrana celular e de trealose no interior das células. A adição de sulfato de zinco para 50 ppm elevou a produção de etanol em 9,6% em relação ao meio controle. A produção de glicerol foi reduzida com a suplementação de sulfato de zinco, com o menor nível em 3,21 g/l. Em todos os ensaios o autor observou estreita relação entre a viabilidade celular e o zinco suplementado, resultando em maior produção e tolerância a etanol. As mudanças na concentração de etanol no meio fermentativo é uma das mais importantes reações de estresse da levedura *S. cerevisiae*, sendo esta levedura sensível a teores alcoólicos acima de 8% (Junmei *et al*, 2010).

Em relação à eficiência de fermentação, os caldos da região IT atingiram média de 80% (rendimento médio de 0,41 g/g), mesmo naqueles casos em que a viabilidade celular foi bastante afetada. Para as regiões TB e ST a eficiência média foi de 85% (0,43 g/g) (Figura 1). Novamente, não houve relação significativa destes dados fisiológicos com a composição mineral do caldo.

A variedade RB867515 teve o maior percentual de viabilidade celular das fermentações com a levedura JP1 para as regiões ST (114,42%) e TB (116,15%). Estas duas regiões estão em áreas litorâneas, em solo arenoso, em contraste com a região IT que apresentou a viabilidade celular de 88,46% e localiza-se em região com solo argiloso. Nos caldos desta variedade foram encontrados para as regiões TB e ST as maiores concentrações de magnésio e nitrogênio total. Este resultado corrobora com os obtidos por Novo *et al* (2005), em fermentações para a fabricação de vinho, onde foi possível identificar que a fonte de nitrogênio disponível no meio é útil para diminuir os estresses causados nas células de leveduras durante o processo fermentativo. Walker e Maynard (1997) demonstram que o consumo de glicose e o etanol produzido estão relacionados com a concentração do íon magnésio ( $Mg^{2+}$ ).

Ainda foi possível verificar que a variedade RB 867515 teve na região ST a maior concentração de cobre encontrada (12,8 ppm) e segunda maior concentração de ferro (32,5 ppm) em relação as outras duas variedades estudadas. Em sua revisão

Jamieson *et al* (1998) esclareceram que os íons de diferentes metais atuam de forma oxidante, principalmente o  $\text{Cu}^+$  e o  $\text{Fe}^+$ , podendo chegar a níveis celulares tóxicos, havendo a produção de metaloproteínas para um mecanismo de homeostase. Esta informação está relacionada com os dados obtidos na Figura 2, na qual se observa que o mosto fermentado do caldo da variedade RB 857515 proveniente da região ST apresentou pH final mais baixo, sugerindo maior liberação no meio de ion  $\text{H}^+$  pelas células da linhagem JP1. Tem sido relatada que esta maior acidificação do meio leva ao decréscimo na viabilidade celular, principalmente quando em associação com outras formas de estresse, como o aumento da temperatura de fermentação (De Melo *et al.*, 2010). Entretanto, nossos resultados mostram que a maior queda na viabilidade foi observada para culturas com pouca variação do pH do meio (Figuras 1 e 2).

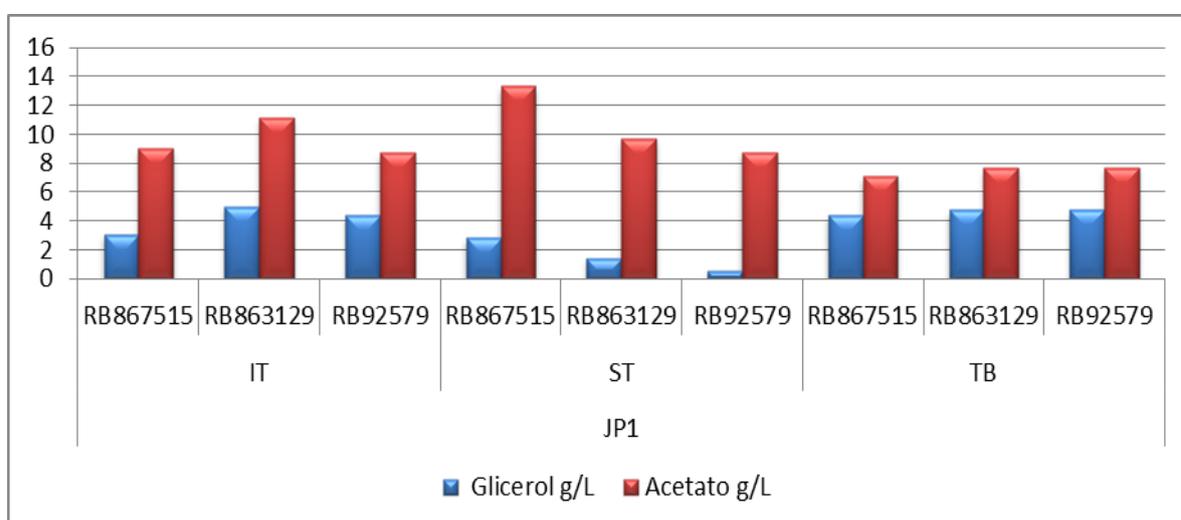


**Figura 2.** Incremento de peso (g) da biomassa e variação de pH da levedura JP1.

Observando as Figuras 1 e 2, as transformações químicas e físicas do mosto de caldo de cana durante a fermentação não foram o suficiente para correlacionar-se diretamente, de forma negativa ou positiva, com os parâmetros de incremento da biomassa, viabilidade celular, eficiência e rendimento, glicerol e acetato. Como também demonstrado por Belloc *et al* (2007) concluíram que não houve influência do pH do meio na eficiência fermentativa de linhagens de *Saccharomyces sp.*

Ao término dos ensaios fermentativos da levedura JP1, a produção de acetato apresentou variação na faixa de 6,84 a 14,10 g/L (Figura 3), sem haver qualquer relacionamento direto com o aumento ou redução da eficiência fermentativa de produção de etanol. Estes resultados contrastam com os observados em estudo anterior no qual acetato é acumulado no início da fermentação para valores próximos a 1 g/L, prejudicando diretamente o rendimento fermentativo da levedura (Heux *et al*, 2006). Neste mesmo estudo a redução da concentração de oxigênio no meio recuperou o desempenho do crescimento celular e o rendimento fermentativo. Por outro lado, estudos recentes mostraram que a presença de acetato no meio está relacionada com a diminuição na viabilidade celular quando associada à presença de lactato (Pereira *et al* 2011).

O glicerol é considerado o principal sub-produto da fermentação alcoólica e sua síntese está diretamente relacionada com o aumento da biomassa durante a fermentação (Cronwright *et al*, 2002). No presente trabalho não foi verificada correlação direta entre a produção de glicerol e as variáveis da bioprodutividade, tais como rendimento e eficiência. Entretanto, pode-se perceber que na fermentação do caldo da variedade RB 867515, que possui o maior valor dos nutrientes fósforo (422,23 ppm), cobre (4,90 ppm), ferro (34,67 ppm), magnésio (1.396,67 ppm) e zinco (103,97 ppm), houve a maior média de produção de glicerol. Esta informação condiz com os resultados obtidos por Gardner *et al* (1993) que relataram a maior produção de glicerol em torno de 6,8 g/l quando o mosto de uva foi suplementado com sulfito na concentração de 300 ppm de sais de sulfitos.



**Figura 3.** Valores de glicerol e acetato em g/L ao término dos ensaios fermentativos da JP1.

Remize *et al* (1998) em seus trabalhos, superexpressou o gene GPD, o qual codifica a desidrogenase glicerol-3-fosfato, resultando num aumento da concentração de glicerol entre 1,5 a 2,5 vezes (12 a 18 g/l) quando comparado ao valor de uma linhagem normal. Em todas as linhagens superexpressadas houve uma pequena diminuição da produção de etanol e a produção maior de succinato e acetato. Segundo Yu *et al* (2010), através da engenharia metabólica, é possível utilizar glicerol como substrato e redirecionar o fluxo de carbono, convertendo o glicerol a etanol, desta forma havendo a proteção da eficiência de produção de etanol quando as células forem submetidas a estresses osmóticos.

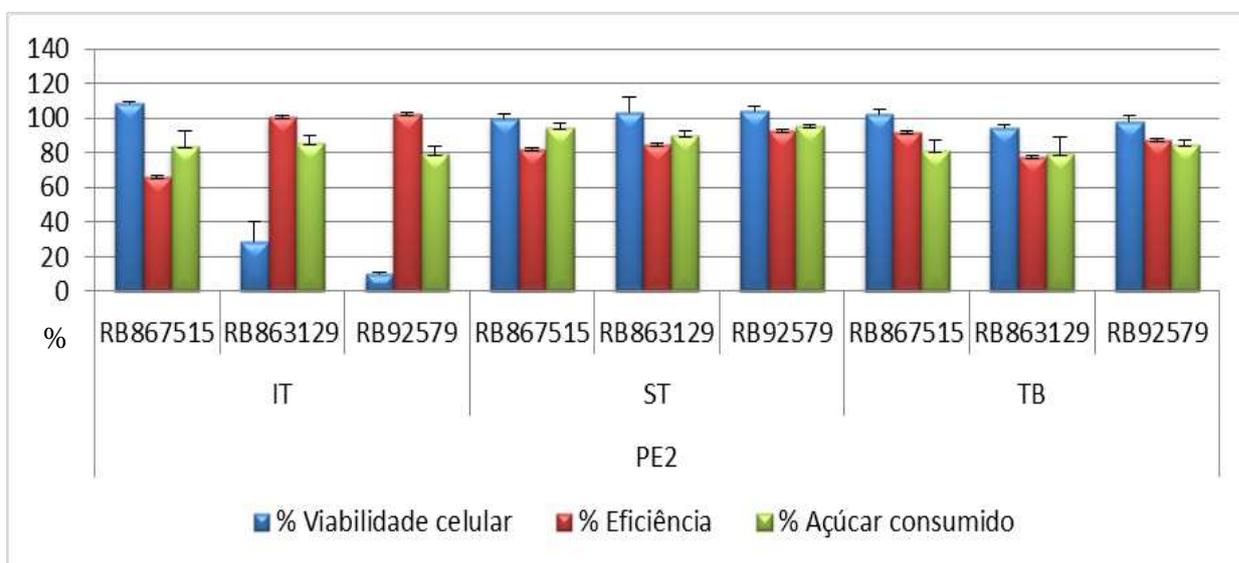
Ainda não é totalmente conhecida a cinética de produção de subprodutos durante o processo fermentativo, porém o equilíbrio da concentração de glicerol e acetato é de fundamental importância para o entendimento dos mecanismos de produção de etanol.

Medina *et al* (2010) ressaltam que em culturas de leveduras do tipo *S. cerevisiae*, a produção de glicerol é essencial para a reoxidação do NADH produzido durante o processo fermentativo industrial. O seu estudo teve como propósito investigar a possibilidade de eliminar a produção de glicerol por *S. cerevisiae* através da reoxidação completa do glicerol por redução do acetato em etanol com o mecanismo de reoxidação do NADH. Desta forma aumentando a produção de etanol, eliminando a produção de glicerol que será parcialmente convertido a acetato.

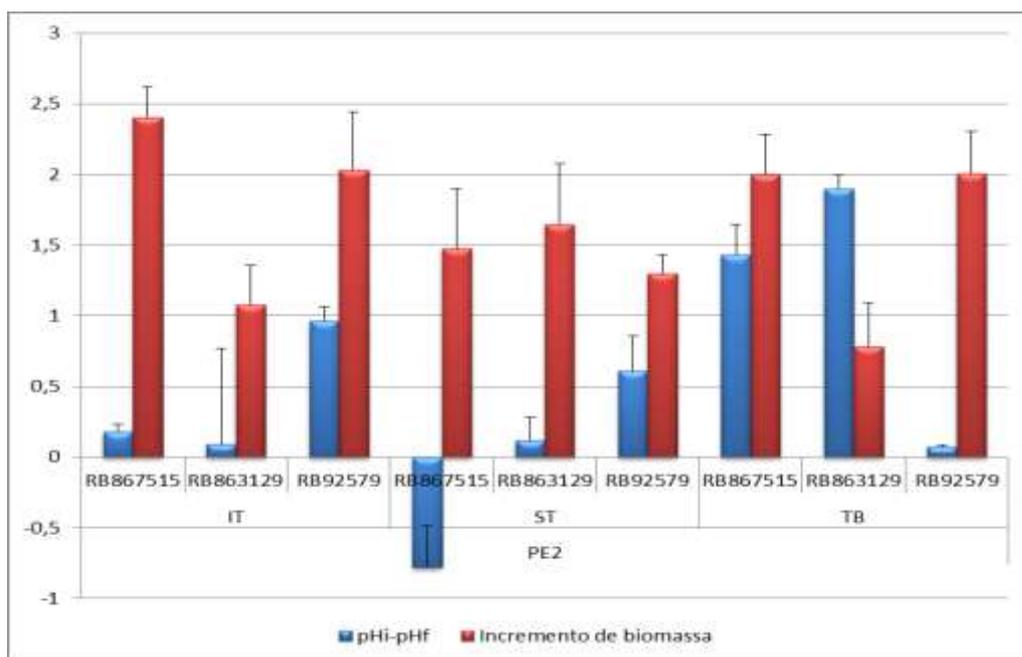
### **Parâmetros fermentativos com a *S. cerevisiae* PE-2.**

Como observado nas Figuras 4, 5 e 6, as fermentações com a levedura PE-2 apresentaram resultados muito semelhantes àquelas com a linhagem JP1. A viabilidade celular foi drasticamente afetada nos ensaios com caldo de cana das variedades RB 863129 e RB 92579 coletadas na região IT, embora para esses caldos tenham sido observados os maiores valores de eficiência de fermentação no experimento. Por outro lado, o caldo da variedade RB 867515 apresentou a menor eficiência de fermentação de 65% (0,31 g/g). Novamente não houve relação direta com a composição mineral dos caldos de cana.

A PE-2 é uma das leveduras mais amplamente utilizada no Brasil em processos fermentativos a partir da cana de açúcar, sendo um diplóide heterotático, naturalmente bem adaptado as condições de processos industriais. Argueso *et al* (2010) realizaram modificações genéticas nesta linhagem a partir do retrocruzamento de seus esporos e conseguiram isolar linhagens exibindo fenótipos de resistência a alto teor alcoólico e altas temperaturas, grande produção de biomassa e tolerância a estresse oxidativo. Este fato mostra que a capacidade genética desta levedura pode explicar porque esta levedura teve os maiores rendimentos fermentativos em nossos ensaios fermentativos. Tal capacidade, segundo os autores, ainda poderia permitir a criação de uma nova geração de organismos industriais ideais para o uso em indústrias de alta tecnologia de Bioenergia, no futuro.



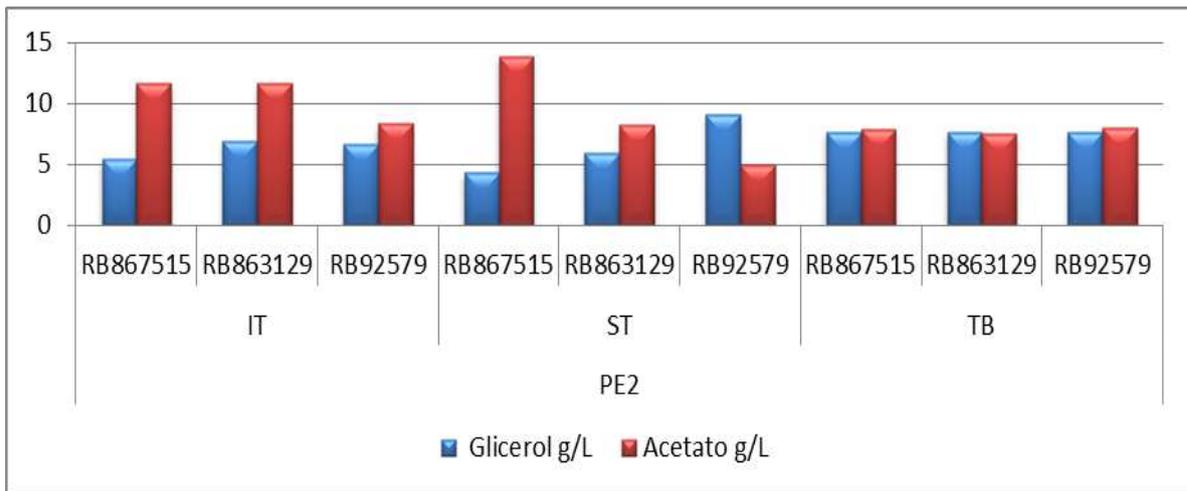
**Figura 4.** Parâmetros fisiológicos dos experimentos de fermentação com caldo das três variedades de cana coletadas nas três regiões de avaliação utilizando a linhagem industrial *Saccharomyces cerevisiae* PE-2.



**Figura 4.** Incremento de peso (g) da biomassa e variação de pH da levedura PE2.

Apesar de não ter sido possível a sua quantificação em nosso trabalho, o cádmio em concentrações entre 0,05 mM e 0,5 mM é tóxico à levedura PE-2 (Mariano da Silva e Basso, 2004) e de forma geral, o pH do meio e a concentração de fonte de carbono, juntos podem vir a ampliar a toxicidade de alguns outros nutrientes encontrados no caldo de cana (Mariano da Silva, 2009). A redução de pH no processo fermentativo pode estar relacionado com a produção de compostos secundários, como o ácido succinico (Otero, 2007), desta forma efetivando o desvio da produção de bioetanol para esta síntese ou proteção ao estresse nutricional.

De forma sinérgica, outros elementos, tais como o cálcio e magnésio, relacionados com a capacidade de tolerância ao estresse causado pela desidratação e hidratação (Trofimova *et al.*, 2010). Estes compostos são importantes para a reestabilização da membrana das células das leveduras, haja vista que para iniciar o processo industrial, as células de leveduras são inicialmente adquiridas em formulações industriais liofilizadas, submetidas a hidratação com garapa (caldo de cana ou mel diluídos a 3 °Brix), e logo em seguida submetidos a choque osmótico sob concentrações de sacarose entre 10 a 18 g de sacarose por 100ml. Ao término da fermentação estas células são separadas do meio, através de centrífugas concentrando a biomassa até 60% de umidade e nesta condição, novamente são reintroduzidas no mosto de alimentação (El-mansi, 2011).



**Figura 6.** Valores de glicerol e acetato em g/L ao término dos ensaios fermentativos da PE2.

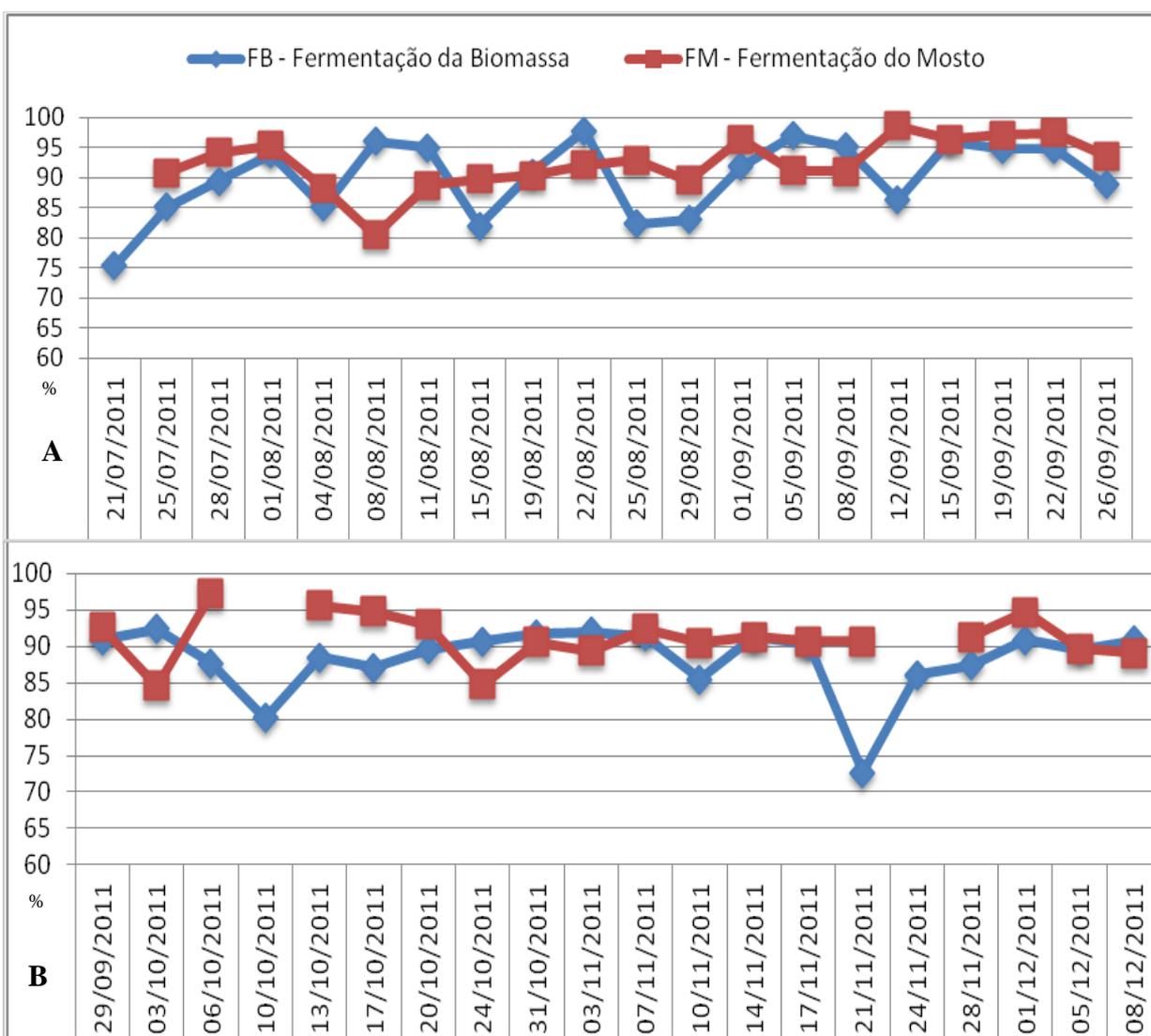
Ao observar os valores de produção de acetato ao término dos ensaios fermentativos, tanto para a levedura JP1 quanto PE-2 (Figuras 11 e 14), verifica-se que o caldo da variedade de cana de açúcar RB 867515 proporcionou a maior produção deste metabólito. Esta variedade foi a que apresentou maior concentração de zinco (291,9 ppm). A menor produção de acetato para a levedura PE-2 foi observado que foi utilizado o caldo da variedade RB 92579 proveniente da região ST, justamente a que apresentou menor concentração de potássio (498 ppm). A menor produção de acetato para a levedura JP1 foi na região TB, com a variedade RB 867515, que apresentou a maior concentração de magnésio (1470 ppm). Desta forma, estes resultados mostram estas linhagens possuem necessidades nutricionais e metabólicas distintas.

### **Interferência do mosto de alimentação na eficiência fermentativa da biomassa industrial.**

O acompanhamento da eficiência fermentativa da biomassa na Destilaria Japungú ao longo da safra 2011/2012 mostrou a influência exercida pelo mosto de alimentação durante o processo de fermentação industrial na biomassa de leveduras (Figura 7). A diminuição da capacidade fermentativa da biomassa foi quase que concomitante com a diminuição da qualidade fermentativa do mosto de alimentação, havendo necessidade de medidas, como a injeção de células de leveduras ao processo fermentativo, para restaurar a eficiência fermentativa, como pode ser verificada nas datas 04/08/2011, 15/08/2011, 29/08/2011 e 10/11/2011 (Figura 7a). Estes dados reforçam a necessidade do maior entendimento a cerca das variáveis bioquímicas,

biológicas e da engenharia do processo para a melhoria do processo industrial (Astudillo e Alzate, 2010). Em momentos de maior queda de eficiência de biomassa, foi preferível parar a alimentação de caldo das dornas, eliminar todo o fermento do processo e reiniciar a fermentação com novo inóculo, como verificado nas datas 10/10/2011 e 21/11/2011 (Figura 7b). Essa queda foi observada mesmo na ausência de episódios de contaminação por bactérias e leveduras, o que sugere deficiência do mosto de alimentação.

Por conseguinte, pelo fato do processo de fermentação industrial ser asséptico, além da população de leveduras utilizadas como inóculo no início da safra, várias outras populações são inseridas no processo por diferentes vias, sendo o caldo de cana e as impurezas vegetais e minerais nele contidas, a fonte com maior diversidade de populações, tais como a presença de várias espécies de bactérias lácticas (Lucena et al 2010).



**Figura 7.** Influência do mosto de alimentação, na eficiência fermentativa da biomassa de leveduras na Destilaria Japungú durante a safra 2011/2012 nos gráficos A e B.

Ao analisar esta população com marcadores moleculares e fisiológicos Zarzoso *et al* (2001), concluíram que as leveduras nativas são mais bem adaptadas às condições de fermentação industrial que propriamente as linhagens comerciais, desta forma, existindo no ambiente formada pelo mosto de alimentação e biomassa, dentro de dornas de fermentação, vários tipos de correlação populacional, tal como descrito por Shou *et al* (2007), no qual deixa claro que as relações cooperativas vão desde as ralações de multicelularidade ao mutualismo. Tsai *et al* (2008) promoveram um conjunto de modificações genéticas em populações de leveduras *S. cerevisiae* que normalmente não interagem entre si, criando um sistema de ralação obrigatória, ou seja, cooperação sintética e mutuamente obrigatória, no qual cada célula fornece um metabólito essencial para a outra, havendo conclusivamente um aumento na capacidade de sobrevivência e aumento da densidade populacional. Em acordo com os resultados obtidos por estes autores, os dados industriais mostram que não apenas a qualidade nutricional quantitativa e qualitativa do mosto de alimentação está relacionada com o aumento ou diminuição da eficiência. Esta também dar-se pela complexidade dos microrganismos presente, estando estes, ainda passivos de recombinações de seus cromosomos aumentando as populações genômicas (Tsai *et al*, 2008 e Goddard *et al*, 2001).

Desde o início do projeto genoma da *S. cerevisiae*, foi possível perceber a duplicação de sequências genômicas específicas. Conjuntos de indivíduos de uma mesma população, estão correlacionados com as informações sobre o ambiente a qual foram isolados e que estes genes estão relacionados com a adaptação evolutiva, originando diferenças fenotípicas (Ames *et al*, 2010), por ser uma característica intrínseca do gênero *Saccharomyces* sp. é bem provável que tal adaptação possa ser observada em leveduras comerciais, submetidas às mesmas condições ambientais das leveduras nativas. Esta adaptação é conhecida como evolução adaptativa, e este conhecimento sobre as células de *S. cerevisiae* fez com que, nos últimos 3 anos o Brasil alcançasse maiores eficiências na produção do bioetanol pela seleção de diversas leveduras, tal como a linhagem JP1 em 2005 (Silva-Filho *et al* 2005) e a linhagem PE-2 em 2008 (Basso, 2008).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allison, J.C.S., Pammenter, N.W., Haslam, R.J. Why does sugarcane (*Saccharum* sp. hybrid) grow slowly?. *South African Journal of Botany*. vol 73. pp 546–551. 2007.
- Ames, R. M., *et al.* Gene Duplication and Environmental Adaptation within Yeast Populations. *Genome Biol. Evol.* July. pp 591–601. doi: , 2010.
- Amorim, H. V. *et al.* Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Appl Microbiol Biotechnol.* vol 9. pp 1267–1275. 2011.
- Aranda, J. S., Salgado, E., Taillandier, P. Trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* cells: experimental data and structured modelling. *Biochem Eng J.* 17:129–140. 2004.
- Argueso, J. L. *et al.* Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. *Genome Research*. By Cold Spring Harbor Laboratory Press Vol 19:2258–2270. 2009.
- Astudillo, I. C. P., Alzate, C. A. C. Importance of stability study of continuous systems for ethanol production. *Journal of Biotechnology*. vol 151. pp 43–55. 2011.
- Aurora, Z., Marcel, L. D. O. Analyses of stress resistance under laboratory conditions constitute a suitable criterion for wine yeast selection. *Antonie van Leeuwenhoek*. p.271-280, 2004.
- Basso, L. C., Amorim, H. V., Oliveira, A. J. de., Lopes, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Res.* 8:1155–116. 2008.
- Belloch, C., Orlic, S., Barrio E. , Querol A. Fermentative stress adaptation of hybrids within the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Int J Food Microbiol* 122: 188-195. 2008.

Boletim Mensal dos Combustíveis Renováveis. Ministério de Minas e Energia. Secretaria de Petróleo, Gás Natural e Combustíveis Renováveis. Departamento de Combustíveis Renováveis, N°42, 2011.

Butzke, C. E., Seung, K. P.. Impact of Fermentation Rate Changes on Potential Hydrogen Sulfide Concentrations in Wine. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 519–524. 2011.

Caldas, C. Manual de análises selecionadas: para indústrias sucroalcooleiras. Sindicato da Indústria do Açúcar e Alcool no Estado de Alagoas. p. 424, 1998.

Campos, C.R., Silva, C.F., Dias, D.R., Basso L.C., Amorim, H.V., Chwan, R.F. S. Features of *Saccharomyces cerevisiae* as a culture starter for the production of the distilled sugar cane beverage, cachaça in Brazil. *Journal of Applied Microbiology.* vol 108. pp 1871–1879. 2010.

Campos, M. P. Produção de etanol a partir de matérias-primas sacarinas. In: Furtado, J. S. Fermentações Industriais & Transformações Microbianas. Sociedade Brasileira de Microbiologia. São Paulo. P 92 – 98. 1980.

Cardona, F. *et al.* A novel approach for the improvement of stress resistance in wine yeast. *International Journal of Food Microbiology.* v.114, p. 83-91, 2007.

Carvalho, Lessandro. Açúcar e Alcool – Agrobusiness, São Paulo Ano 64, n° 720 pg. 32 novembro 2008.

Courchesne, W. E. *et al.* Ethanol induces calcium influx via the Cch1-Mid1 transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol.* 193:323-34. 2011.

Cronwrigth, G. R., Rohwer, J. M., Prior1, B. A.. Metabolic Control Analysis of Glycerol Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Enviromental Microbiology*, Sept. p. 4448–4456. 2002.

Cesnik, R., Jacques, Y. J. Melhoria da cana-de-açúcar. Embrapa. 1ª ed. p.307. ISBN: 85-7383-282-7. 2004.

De-Freitas, J., Wintz, H. J., Kim, H., Poynton, H., Fox, T., Vulpe, C. Yeast, a model organism for iron and copper metabolism studies. *BioMetals* 16: 185–197, 2003.

De-Melo, H.F. ; Bonini, B.M. ; Thevelein, J. ; Simões, D. A. ; Morais-Junior, M. A. . Physiological and molecular analysis of the stress response of *Saccharomyces cerevisiae* imposed by strong inorganic acid with implication to industrial fermentations. *Journal of Applied Microbiology*, v. 109, p. 116-127, 2010.

El-Mansi, E. M. T., Bryce, C. F. A., Demain, A. L., Allman, A.R. *Fermentation Microbiology and Biotechnology*. CRC press. Third Edition. 2011.

Esposito, E., Azevedo, J. L. Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Coleção Biotecnologia. EDUCS. Caxias do Sul. p. 510, 2004.

Estruch, F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *Microbiology Reviews*. v.24, p.468-486, 2000.

Fernandes, A. C. Cálculo na agroindústria da cana de açúcar. 2ªed. Piracicaba. STAB. p.240, 2003.

Ferreira, A. M., Barbosa, C., Jiménez-Martí, E., Olmo, M. Del, Faial, A. Mendes. The wine yeast strains-dependent expression of genes implicated in sulfide production in Response to Nitrogen Availability. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20:1314–1321. 2010.

Gardner, N., Rodrigue, N., Champagne, C. P. Combined Effects of Sulfites, Temperature, and Agitation Time on Production of Glycerol in Grape Juice by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*. July, p. 2022–2028. 1993

Glassop, D., Roessner, U., Bacic, A., Bonnett, G. D. Changes in the Sugarcane Metabolome with Stem Development. Are They Related to Sucrose Accumulation?. *Plant Cell Physiol.* 48(4): 573–584. 2007.

Goddard, M. R., Greig, Duncan., Burt, A. Outcrossed sex allows a selfish gene to invade yeast populations. *The Royal Society.* June. No 268, pp 2537-2542. 2001.

Handelsman, J., Lawrence, P. W. Microbial diversity – sustaining the Earth and industry.

Ecology and industrial microbiology. Editorial overview. *Current Opinion in Microbiology.* v.5, p.237–239, 2002.

Heux, S., Sablayrolles, J. M., Cachon, R., Dequin, S. Engineering a *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeast That Exhibits Reduced Ethanol Production during Fermentation under Controlled Microoxygenation Conditions. *Applied and Environmental Microbiology.* v72. p. 5822–5828. 2006b.

Jamieson, D. J. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14. 1511-1527. 1998.

Junmei, D., Xiaowei, H., Na, Z., Feng, Gao, Q. L., Ke-Qin, Z.. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to Ethanol Stress Involves Actions of Protein Asr1p. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 1630–1636. 2010.

S. M Junior, R. J. dos. Obtenção de álcool etílico hidratado, com graduação alcoólica para uso automotivo: validação de um processo em batelada. UFST. Dissertação. 2010.

Kinraide, T. B. Toxicity factors in acidic forest soils: attempts to evaluate separately the toxic effects of excessive  $\text{Al}^{3+}$  and  $\text{H}^+$  and insufficient  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  upon root elongation. *Eur J Soil. Sci* 54:323–333.2003.

Lima, Urgel de Almeida. Biotecnologia industrial – Processos fermentativos e enzimáticos/Urgel de Almeida Lima – outros coordenadores: Eugênio Aquarone, Walter Borzani, Willibaldo Schmidell – São Paulo: Blucher, 2001.

Li, H., Ci, Y. A new rapid fluorimetric method for the determination of carbonic anhydrase. *Analytica Chimica Acta*. nº317:353-357. 1995.

Li, Y *et al.* Influence of metal addition on ethanol production with *Pichia stipitis* ATCC 58784. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 36:491–497. 2009.

Lucena, B. T. L. *et al.* . Diversity of Lactic Acid Bacteria of the bioethanol process. *BMC Microbiology*., v. 10, p. 298, 2010.

McCormick, A. J., Watt, D. A., Cramer, M. D. Supply and demand: sink regulation of sugar accumulation in sugarcane. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 60, No. 2, pp. 357–364, 2009.

Mariano da Silva, S. Basso, L. C. Efeito do cádmio sobre o crescimento das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e *Saccharomyces cerevisiae* IZ-1904, e a capacidade da vinhaça em atenuar a toxicidade. *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas*. 24(1): 016-022. 2004.

Mariano da Silva, S. *et al.* Effect of pH, dextrose and yeast extract on cadmium toxicity on *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas*. 29(2): 295-299.2009.

Medina, V. G. *et al.* Elimination of glycerol production in anaerobic cultures of a *Saccharomyces cerevisiae* strains engineered to use acetic acid as an electron acceptor. *Applied and Environmental Microbiology*. Jan. p190-195. 2010.

Novo, M. T., Beltran G, Rozès., N, Guillamón J. M, Mas, A. Effect of nitrogen limitation and surplus upon trehalose metabolism in wine yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*. Feb;66(5):560-6. 2005.

Oliveira, R. P. de S., Rivas, B. T., Zilli, M., Marques, D. A. V., Basso, L. C., Converti, A. Use of Sugar Cane Vinasse to Mitigate Aluminum Toxicity to *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Environ Contam Toxicol.* 57:488–494. 2009.

Oliveira, R. P. de S., Basso, L. C., Junior, A. P., Penna, T. C. V., Borghi M. D., Converti, A. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to Cadmium and Nickel Stress: The use of the Sugar Cane Vinasse as a Potential Mitigator. *Biol Trace Elem Res.* 2011.

Otero, J. M., Olsson, L., Nielsen J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* microbial cell factories for succinic acid production. *Journal of Biotechnology.* pp. 196–S210. 2007.

Pankiewicz, U., Jerzy, J. Effect of Pulsed Electric Fields upon Accumulation of Zinc in *Saccharomyces Cerevisiae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21:646–651. 2011.

Pataro, C.; Guerra, J. B., Gomes, F. C. O., Neves, M. J., Pimentel, P. F., Rosa, C. A. Trehalose accumulation, invertase activity and physiological characteristics of yeast isolated from 24 H fermentative cycles during the productions of artisanal brazilian cachaça. *Brazilian Journal of Microbiology.* July 26, 2002.

Payne, J. H.. Operações unitárias na produção de açúcar de cana. São Paulo: Nobel: STAB, 1989.

Pereira, F B. *et al.* Cell recycling during repeated very high gravity bio-ethanol fermentations using the industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain PE-2. *Springer. Biotechnol Lett.* 34:45–53. 2011.

Pereira, L. F.; Costa, C. R.; Brasileiro, B. T. R. ; de Moraes, M. A. . *Lachancea mirantina* sp. nov., an ascomycetous yeast isolated from the cachaca fermentation process. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* v. 61, p. 989-992, 2010.

Petti A. A., Crutchfield C. A., Rabinowitz J. D., Botstein D. Survival of starving yeast is correlated with oxidative stress response and nonrespiratory mitochondrial Function. Edited by Jasper Rine, University of California, Berkeley. 2011.

Poschenrieder, C., Gunsé, B., Corrales, I., Barceló, J. A glance into aluminum toxicity and resistance in plants. *Sci Total Environ.* 400:356–368. 2008.

Remize, F. *et al.* Glycerol overproduction by engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains leads to substantial changes in by-product formation and to a stimulation of fermentation rate in stationary phase. *Applied and Environmental Microbiology.* Jan. p 143-149. 1998.

RIDESA (Rede Interuniversitária para o desenvolvimento do setor Sucroenergético). Catálogo Nacional de Variedades “RB” de cana de açúcar. Curitiba. p.136, 2010.

Santos, A.M. Estudo da influência da complementação de nutrientes no mosto sobre o processo de fermentação alcoólica em batelada. Dissertação. UFAL. Centro de ciências exatas, p. 77, 2008.

Santos, J., Sousa, M. J., Cardoso, H., Inácio, J., Silva, S., Spencer-Martins I., Leão, C. Ethanol tolerance of sugar transport, and the rectification of stuck wine fermentations. *Microbiology.* Feb. vol. 154. Page 422-430. 2008

Schmidell. W. *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica.* Edgar Blucher. v. 2, p. 541, 2005.

Shou, W., Ram, S., Vilar, J. M. G. Synthetic cooperation in engineered yeast populations. *PNAS.* Feb. Vol. 104. No. 6. pp.1877–1882. 2007

Silva, F. L. H. Modelagem, simulação e controle de fermentação alcoólica contínua extrativa. Campinas: UNICAMP. 162p. Tese. 1998.

Silva-Filho, E. A. da. et al. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie van Leeuwenhoek* .88:13–23. 2005.

The, K.Y., Lutz, A E.. Thermodynamic analysis of fermentation and anaerobic growth of baker's yeast for ethanol production. *Journal of Biotechnology*. vol 147. pp 80–87. 2010.

Tosetto, G. M. Comportamento de linhagens industriais de *Saccharomyces* frente a compostos inibitórios presente no melaço de cana-de-açúcar na produção de bioetanol. Campinas. Tese. UNICAMP. Programa de pós-graduação em Engenharia química. p.255, 2008.

Trofimova Y., Walker, G., Rapoport, A. Anhydrobiosis in yeast: influence of calcium and magnesium ions on yeast resistance to dehydration–rehydration. *FEMS Microbiology Letters*. Volume 308. Issue 1. Page 55-61. July 2010.

Tsai, I. J., Bensasson, D., Burt A., Koufopanou, V. Population genomics of the wild yeast *Saccharomyces paradoxus*: Quantifying the life cycle. *PNAS*. March 25. Vol. 105. no. 1. pp 4957–4962. 2008.

ÚNICA, União das Indústrias de cana de açúcar. Disponível em: <http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica/>. Acessado em 15/12/2011.

Villen, R. A. *et al.* Influence of the Accumulation of Phosphate and Magnesium Ions in the Yeast Cells on the Ethanol Productivity in Batch Ethanol Fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. Vol. 52, n. 1: pp. 153-155. 2009.

Vogel, H.C., Todaro, C.L. *Fermentation and biochemical engineering handbook: principles, process design and equipment*. Second edition. Noyes Publications. 1996.

Vu, V. H., Keun, K. High-Cell-Density Fed-Batch Culture of *Saccharomyces cerevisiae* KV-25 Using Molasses and Corn Steep Liquor. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 1603–1611. 2009.

Walker, G. M. Fuel Alcohol: Current Production and Future Challenges. *J. Inst. Brew.* 117(1), 3–22, 2011

Walker, G. M. *Yeast physiology and biotechnology*. British Library. ISBN0-471-96446-8. 1998.

Walker, G. M., Maynard, A. I. Accumulation of magnesium ions during fermentative metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 18, 1–3, 1993.

Wheals, E. A, Basso, LC. Alves, D. M. G. Amorim, H. V. Fuel ethanol after 25 years. *Trends Biotechnol.* vol 17:482-487.1999.

Yua, K.O., Kimb, S. W., Hana, S. O. Reduction of glycerol production to improve ethanol yield in an engineered *Saccharomyces cerevisiae* using glycerol as a substrate. *Journal of Biotechnology*. vol 150. pp 209–214. 2010.

Zarzoso, B. E., Torán, M. J. P., Maiquez E. G., Uruburu, F., Querol, A. Yeast Population Dynamics during the Fermentation and Biological Aging of Sherry Wines. *Appl. Environ. Microbiol.* May. vol. 67. no. 5 2056-2061. 2001.

Zhao, X.Q., Xue, C., Ge, X.M., Yuan, W.J., Wang, J.Y., Bai, F.W. Impact of zinc supplementation on the improvement of ethanol tolerance and yield of self-flocculating yeast in continuous ethanol fermentation. *Journal of Biotechnology*. vol 139. Pp 55–60. 2009.

Zhao, X.-Q., Bai, F.-w., Zinc and yeast stress tolerance: Micronutrient plays a big role. *J. Biotechnol.* (2011), doi:10.1016/j.jbiotec.2011.06.038. 2011.

## CONCLUSÕES

A proposta de avaliar os aspectos físicos e químicos do caldo de cana de açúcar que afetam a capacidade fermentativa das células de levedura foi satisfatoriamente realizada através dos métodos utilizados. Esta prática demonstrou grande relevância a evitar perdas industriais pela impactação da qualidade do mosto de alimentação na bioprodutividade das células de leveduras, assim como medida mitigadora em casos de perdas produtivas já instaladas.

Ao utilizar diferentes variedades de cana de açúcar de uma mesma região, foi possível, pela fermentação do seu mosto de alimentação, o conhecimento da complexidade nutricional, quantitativa e qualitativa do caldo de cana em variedades distintas e saber, para fins de nutrição de leveduras, qual a variedade RB que possui melhor ganho nutricional em cada região amostrada. Ao utilizar a mesma variedade de cana de açúcar de regiões distintas, obtivemos informações a respeito da cana de açúcar melhor indicada quanto à produção do bioetanol nas três regiões amostradas.

Desta forma, ao avaliarmos os quesitos de composição nutricional, região e variedade de cana, conclui-se que para a região IT a variedade que apresenta melhor composição nutricional é a RB 92579; para a região TB a variedade que apresenta melhor composição nutricional é a RB 867515; e para a região ST a variedade que apresentou melhor composição mineral foi a RB 867515. De forma geral, a variedade RB 867515 demonstrou melhores resultados nutricionais na área litorânea localizadas nos municípios de Caaporã/PB (Destilaria TABU) e Goiana/PE (Usina Santa Teresa) e as variedades RB 92679 e RB 863129 para a região interiorana do município de Aldeias Altas/MA (Itapecuru Bioenergia).

Durante os ensaios fermentativos pode ser observado que os parâmetros de viabilidade celular, eficiência fermentativa, pH, incremento da biomassa e consumo de açúcar, não estão relacionados diretamente com a concentração de minerais encontrados isoladamente. Estes parecem ter, quando em conjunto, uma ação sinérgica, interferindo nos parâmetros celulares das células de *S. cerevisiae*. Em acordo com os nossos resultados, ainda podemos concluir que o zinco parece ser um elemento que está relacionado com indução da tolerância ao estresse, desta forma induzindo o desvio de fonte de carbono ao metabolismo de resistência ao estresse, logo impactando na bioprodutividade.

Ao verificar a interferência do mosto de alimentação do caldo de cana de açúcar na eficiência fermentativa da biomassa de leveduras no processo industrial, durante a safra 2011/2012 na destilaria Japungú, concluímos que os experimentos fermentativos foram eficazes em identificar as oscilações qualitativas da capacidade fermentescível do mosto de alimentação e seu impacto na capacidade fermentativa da biomassa. Desta forma a queda de eficiência da capacidade fermentativa das células de leveduras está mais sujeita a qualidade do mosto de alimentação que é inserido na fermentação do que a biomassa contida no biorreator, haja vista que as linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas no processo já foram isoladas por conseguirem eficiências máximas em produção de bioetanol.

## **SUGESTÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Como perspectiva futura, aperfeiçoaremos o estudo da interferência dos aspectos físicos e químicos na capacidade fermentativa das células de leveduras, com a utilização de ensaios fermentativos com ciclos do inóculo, utilizados no mesmo mosto de alimentação amostrado, conforme a metodologia utilizada neste trabalho, pois desta forma, compreenderemos o efeito acumulativo durante a fermentação alcoólica. Dada a limitada literatura científica relacionada com o tema deste trabalho, há a necessidade de incremento de novos parâmetros, tais como oxigênio dissolvido, DQO e DBO antes e após cada ciclo fermentativo no mosto de alimentação e mosto fermentado, além de parâmetros intracelulares como a concentração de trealose e nível de expressão gênica.

Daremos ênfase ao entendimento sinérgico do conjunto formado pela composição nutricional, através da aferição da condutividade do meio ao longo de todo processo fermentativo. A inclusão destas aferições durante a rotina do processo fermentativo industrial será de fundamental importância para corroborar os resultados acadêmicos com os obtidos em planta industrial e esperamos desta forma estar contribuindo ainda mais com o desenvolvimento do setor sucroalcooleiro.

## ANEXOS



Localização geográfica dos locais de coleta (em vermelho) das amostras das variedades de cana RB 867515, RB 92579 e RB 863129 nos estados do Maranhão, Paraíba e Pernambuco.

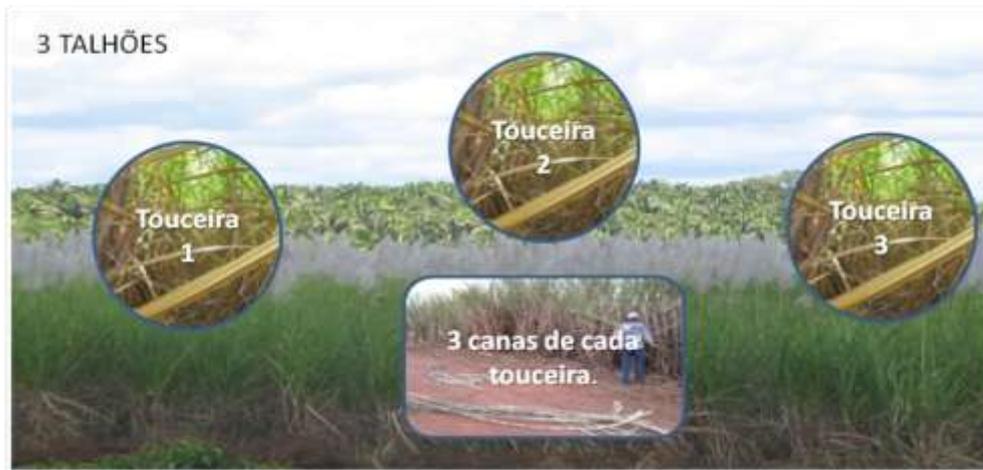


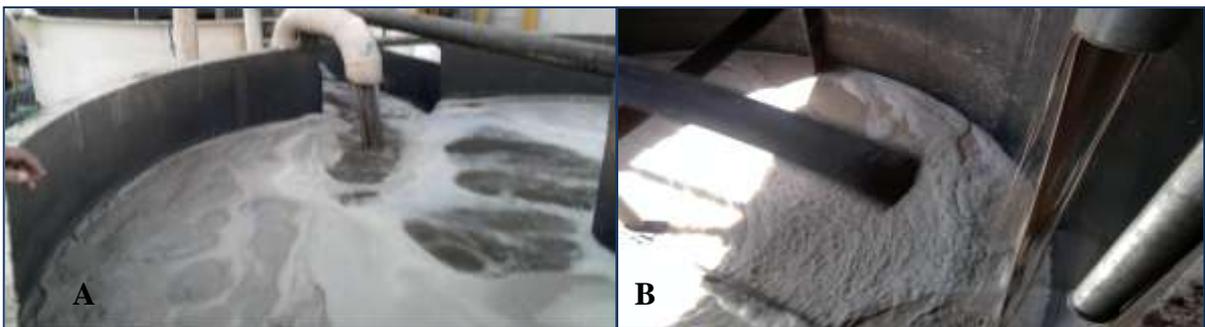
Ilustração da amostragem da cana de açúcar segundo Cesnik (2004). Em cada campo agrícola, para cada variedade, 3 talhões foram escolhidos, amostradas 3 touceiras e destas, 3 canas coletadas, totalizando 27 canas amostradas que formaram uma amostra mista de 4 litros.



Aferição da amostragem do brix da base em A, do ápice em B e do colmo em C. Amostrador do tipo havaiano em D.



Organização dos feixes de cana em A e processamento na forrageira em B.



Local das coletas da amostra de mosto de alimentação em A e local de coleta do fermento centrifugado tratado em B, ambos na Destilaria Japungú.



Fluxograma das etapas analíticas e as informações obtidas.

