

Hidrólise enzimática do amido do caldo da cana-de-açúcar na fermentação etanólica

Enzymatic hydrolysis of the starch of sugar cane juice in ethanolic fermentation

Clóvis Parazzi^{1*}, Larissa Papin², André Eduardo de Souza Belluco¹

¹ Centro de Ciências Agrárias – CCA, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, Araras, SP, Brasil. Autor para correspondência: parazzi@ufscar.br

² Usina Guarani, Unidade Industrial Tanabi, Tanabi, SP, Brasil.

RESUMO

A cana-de-açúcar é uma das matérias-primas mais utilizada para produção de etanol. Apesar da grande variedade de matérias-primas para essa finalidade, tem-se buscado alternativas para incrementar as produções atuais. O caldo de cana-de-açúcar contém teores de amido, que variam de acordo com as características das variedades e das condições físicas, químicas e climáticas as quais essa planta foi exposta. O teor de amido do caldo da cana-de-açúcar pode também estar associado às impurezas vegetais, as infestações de pragas e aos tratamentos culturais empregados na lavoura. Na produção de etanol do caldo da cana-de-açúcar seu amido pode resultar em aumento da eficiência fermentativa, quando hidrolisado em açúcares simples. Este trabalho teve como objetivo verificar a possibilidade do aproveitamento do amido presente no caldo da cana-de-açúcar para a produção de etanol. As fermentações foram realizadas com caldo clarificado de alimentação das dornas, na concentração de 15° Brix, em sistema descontínuo. Foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* FT858, na concentração de 10⁸ cél. mL⁻¹. Foram realizadas análises físico-químicas de pH, teor alcoólico, açúcares redutores totais (ART), concentração de amido, glicose, frutose e análises microbiológicas de viabilidade celular, brotamento e contaminação bacteriana. As enzimas α -amilases e glicamilases foram inoculadas no mosto, após aquecimento até 105° C e posterior resfriamento. Os valores obtidos de eficiência fermentativa foram iguais a 68,91% e 71,50%, respectivamente, para os caldos com adição e sem adição de enzimas. A viabilidade celular da linhagem de levedura utilizada foi significativamente menor para o caldo onde não se adicionou enzimas.

Palavras-chave: produção de etanol, enzimas amilolíticas, leveduras.

ABSTRACT

Sugarcane is one of the most commonly used raw materials for ethanol production. Despite the large variety of raw materials for this purpose, alternatives are sought to increase current productions. The sugarcane juice contains starch contents, which vary according to the varieties characteristics and the physical, chemical and climatic conditions to which this plant was exposed. Starch in sugarcane juice may also be associated with plant impurities, pest infestations and cultural practices employed in the crop. During ethanol production from sugarcane juice, this starch can result in increased fermentative efficiency, when hydrolyzed into simple sugars. The objective of this work was to verify the influence of starch present in the sugarcane juice on ethanol production. The fermentation tanks were fed with clarified juice, in the concentration of 15° Brix, in a discontinuous system. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* FT858 was used at the concentration of 10⁸ cells. mL⁻¹. Physicochemical analyzes of pH, alcohol content, total reducing sugars, starch concentration, glucose, fructose and microbiological analyzes of cell viability, budding and bacterial contamination



were performed. The alpha-amylase and glucoamilase enzymes were inoculated into the wort after heating to 105 °C and subsequent cooling. The fermentative efficiency values were equal to 68.91% and 71.50% respectively, for juices with and without addition of enzymes. The cell viability of the yeast strain used was significantly lower for the juice where no enzymes were added.

Keywords: ethanol production, amylolytic enzymes, yeasts.

INTRODUÇÃO

O caldo de cana-de-açúcar utilizado na produção de etanol pode conter teores de amido, que variam de acordo com a planta que lhe deu origem. Apesar de ser pouco solúvel em água, em temperaturas superiores a 70 °C o amido se torna solúvel e se incorpora ao caldo, em sua forma coloidal. No tratamento do caldo visando a produção de açúcar e etanol a temperatura atinge valores superiores a 95 °C e uma pequena parte desse amido é removido, permanecendo no caldo a sua grande maioria.

Os teores de amido nas diversas variedades de cana-de-açúcar plantadas no Brasil variam entre 150 e 600 ppm, podendo aparecer no produto final em diferentes concentrações, prejudicando a sua qualidade (Oliveira et al., 2007). Figueira et al. (2011) relatam que as variedades de cana-de-açúcar RB86-7515 e SP83-2847 apresentaram um índice médio superior e médio inferior iguais a 2581 mg/kg%Brix e 1658 mg/kg%Brix, respectivamente, entre todas as variedades de cana-de-açúcar estudadas.

Segundo Stupiello (2000), as pontas das canas apresentam composição variável em função do estágio de maturação, com pureza variando de 35 a 70%, enquanto o colmo apresenta pureza de 83 a 90%. Neste caso, as pontas, em condição de baixa maturação, apresentam elevados teores de açúcares redutores, aminoácidos, amido, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e polissacarídeos totais, além de menores teores de sacarose. O teor de amido é maior na cana-de-açúcar imatura do que na cana-de-açúcar madura.

Uma das preocupações da indústria sucroenergética está relacionada à presença desses polissacarídeos no caldo de cana, pois eles são responsáveis pela redução da recuperação e cristalização do açúcar, pelo aumento da viscosidade dos méis, além de causarem queda no rendimento da fermentação etanólica (Magro, 2005).

O aumento de amido no caldo pode estar associado às elevadas quantidades de impurezas vegetais (folhas,

palmito e bainhas) que são processadas juntamente com o colmo da cana-de-açúcar (Rein, 2005), e atualmente essas impurezas são ainda maiores com a proibição da queima e o avanço da colheita mecanizada da cana-de-açúcar.

A infestação de pragas em canaviais pode reduzir o teor de sacarose, a pureza, pH do caldo e elevar a quantidade de biomoléculas não favoráveis ao processo fermentativo de produção do etanol e da qualidade de açúcar como os compostos fenólicos e o amido (Madaleno et al., 2008). Interrupções de vasos do floema causadas por insetos resultam em excesso de fotoassimilados nas folhas que inibem o transporte da sacarose para o restante da planta. Esse acúmulo de sacarose pode resultar na conversão dos açúcares em amido a serem armazenados nas folhas das plantas (Pirone et al., 2005).

Por outro lado, o aumento da quantidade de amido no caldo da cana pode resultar em aumento na eficiência fermentativa e na produção de etanol, uma vez que disponibiliza açúcares fermentescíveis às leveduras e diminui a quantidade de compostos não assimiláveis a esses micro-organismos, desde que o amido presente seja hidrolisado em açúcares simples. A hidrólise do amido recomendada é feita através da via enzimática.

As principais enzimas utilizadas na hidrólise do amido em processos industriais são as alfa-amilase e a glicoamilase. A alfa-amilase é uma enzima que catalisa e quebra aleatoriamente as ligações α -1,4, não atuando sobre as ligações α -1,6. Essa quebra resulta em uma produção de 70 a 90% de maltose, oligossacarídeos e dextrinas, além de pequenas quantidades de D-glicose (Apar e Özbek, 2004). As amiloglicosidases, comercialmente disponíveis, são produzidas por linhagens de *Aspergillus* e *Rhizopus* e atuam na quebra das ligações α -1,6 do amido. Essas enzimas apresentam atividade de trabalho ótima em torno de 50°C, porém perdem estabilidade acima desta faixa de temperatura e são inativadas em temperaturas superiores a 65°C (Gupta et al., 2003). A glucoamilase,

também conhecida como amiloglicosidase, hidrolisa as ligações glicosídicas α -1,4, α -1,6 e α -1,3 do amido, liberando a glicose. A glucoamilase é utilizada no estágio de sacarificação de amido liquefeito e na produção de glicose (Ríaz et al., 2007).

O uso de enzimas com vista à hidrólise do amido na indústria do açúcar e do álcool é relativamente recente e as bibliografias ou trabalhos científicos sobre o assunto são escassos. A maioria dos trabalhos existentes são relacionados ao uso de enzimas na degradação do amido do caldo de sorgo sacarino. Silva et al. (2016) observaram que as enzimas α -amilase e glicoamilase foram eficientes na quebra e conversão do amido do caldo do sorgo sacarino em açúcares, incrementando a produção de etanol. Costa et al. (2012) verificaram a eficiência da clarificação do caldo do sorgo na remoção de compostos fenólicos e em contrapartida este não foi eficaz para reduzir os teores de amido do mesmo, essa biomolécula só foi removida após a inserção de enzimas.

Moraes et al. (2013) estudando a hidrólise de amido em caldo de sorgo sacarino observaram que os valores de açúcares redutores totais (ART) do caldo tratado com enzimas foram maiores que os obtidos no tratamento sem adição de enzimas, devido a hidrólise do amido. O caldo com adição de enzimas apresentou redução nos valores de pH, acidez mais elevada e menor eficiência fermentativa quando comparado ao caldo sem enzimas.

Puglia (2006) estudou o desempenho de leveduras com atividade amilolítica na degradação do amido presente no mosto do caldo de cana, quando em processo industrial, tendo em vista viabilizar o incremento da eficiência fermentativa na produção do etanol. Os testes foram feitos com três linhagens de leveduras amilolíticas, J07, J32 e *Saccharomyces diastaticus*, em combinação com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (CAT-01) em mosto preparado com caldo de cana da variedade SP81-3250, que apresentava elevado teor de amido. Os resultados revelaram que a combinação da CAT-01 com a linhagem J07 incrementou a produção de etanol. As leveduras selvagens J32 e J07 não proporcionaram resultados favoráveis na fermentação alcoólica.

Buscando a melhoria contínua e visando o incremento na produção de etanol este trabalho teve como objetivo verificar a influência da hidrólise do amido na fermentação

alcoólica pela adição de enzimas amilolíticas no caldo da cana-de-açúcar, avaliando as eficiências fermentativas no processo de produção de etanol.

MATERIAL E MÉTODOS

Multiplificação do Fermento

A multiplicação do fermento foi feita em meio de caldo de cana clarificado, retirado direto do decantador da Usina Guarani, Unidade Industrial Tanabi, diluído a 4° Brix e enriquecido com os seguintes nutrientes: Glicose (30 g.L⁻¹); Sulfato de amônio (10 g.L⁻¹); Fosfato monobásico de potássio (4 g.L⁻¹); Fosfato bibásico de amônio (1,5 g.L⁻¹) e pH 5,6. Utilizou-se para este experimento a levedura *Saccharomyces cerevisiae* FT858 selecionada, a mesma levedura que vem sendo utilizada na Usina Guarani desde a safra 2014/2015. Utilizou-se 5g de levedura desidratada para cada 200 mL de caldo de cana clarificado, os quais foram colocados em Erlenmeyer de 500 mL. Fez-se a incubação dos frascos com as leveduras, em estufa, por um período de 24 horas à temperatura de 28 °C.

Tratamento do Mosto

Para este experimento utilizou-se o mosto do processo industrial de alimentação das dornas da destilaria de etanol da Usina Tanabi. O mosto constituiu-se em uma mistura de caldo e mel final, na concentração de 15° Brix. Neste material foram retiradas as alíquotas para as determinações analíticas. Em seguida, procedeu-se o tratamento de uma das partes do mosto com as enzimas. Inicialmente foi feita a correção do pH para 6,0 com hidróxido de sódio (NaOH). A enzima α -amilase foi inoculada no mosto, após aquecimento até 105 °C, na dosagem de 250 ppm. Em seguida o mosto foi colocado em repouso até atingir a temperatura de 60 °C, momento no qual foi inoculada a enzima glicoamilase, na dosagem de 500 ppm. A outra parte do mosto foi utilizada como testemunha, ou seja, não foram adicionadas as enzimas, porém reproduziu-se o mesmo cenário das amostras anteriores, ou seja, o mosto foi aquecido a 105 °C e deixado resfriar até alcançar a temperatura de fermentação, eliminando assim possíveis interferências de alguns compostos indesejáveis, que provavelmente se formam com o aquecimento e resfriamento, além de controlar e prevenir possíveis contaminações microbiológicas.

A caracterização do mosto foi feita antes e após a adição das enzimas através das determinações analíticas em duplicata dos seguintes parâmetros: Brix, pH, amido, glicose, frutose, açúcares redutores totais (ART), ácido láctico, ácido acético e glicerol.

Procedimentos da Fermentação

A massa celular obtida da multiplicação inicial do fermento foi separada por centrifugação à rotação de 1500G durante 10 minutos em condições assépticas. O sobrenadante do meio usado para multiplicação foi descartado e as células lavadas com água destilada e centrifugadas novamente. Em seguida foi transferido 10g da massa úmida de células de leveduras para os Erlenmeyers de 250 mL contendo 150 mL do mosto preparado anteriormente, na concentração de 15° Brix. Os Erlenmeyers foram mantidos incubados à temperatura de 30 °C, por 18 horas. O ensaio foi realizado em triplicata para ambos os tratamentos (com enzimas e testemunha). Logo após o término da fermentação foram realizadas as análises químicas e físico-químicas no vinho.

Determinações Analíticas

O teor alcoólico (T.A) foi determinado através de densímetro digital Anton Paar (DMA-4500), após destilação das misturas hidroalcoólicas em microdestilador Tecnal (TE-012) (Amorim et al., 1996). A determinação do pH foi realizada com o auxílio de potenciômetro digital Digimed (DM-22). Na determinação dos açúcares redutores residuais totais (ARRT) utilizou-se a metodologia proposta por Eynon e Lane (Amorim et al., 1996). A viabilidade celular foi determinada através de contagem de células ao microscópio ótico, em câmara de Neubauer (Lee et al., 1981). A contagem de brotos das células de leveduras foi feita em microscópio ótico, em câmara de Neubauer (Lee et al., 1981), utilizando solução de azul de metileno à 0,1% como corante, enquanto que a contagem do número de bastonete presente no meio de fermentação foi feita de acordo com metodologia proposta por Amorim et al. (1996), utilizando solução de azul de metileno e azul de Nilo. O teor de amido presente no caldo da cana-de-açúcar foi avaliado conforme metodologia citada pelo Centro de Tecnologia Canavieira (2011). Os teores de glicose e frutose foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência, em cromatográfico da marca Waters,

com coluna CarboPac PA 1, fluxo 1,4mL/min, fase móvel 0,1 mol/L de hidróxido de sódio, temperatura da coluna de 35°.

Os valores de açúcares redutores totais (ART%) no mosto foram obtidos somando-se os valores encontrados de glicose e frutose. As eficiências dos processos fermentativos (E.F.%) foram calculadas a partir do teor alcoólico final do vinho e da concentração inicial de açúcares redutores totais (ART) do mosto, baseando-se na estequiometria das fermentações, onde 01(uma) grama de ART produz 0,64755 mL de álcool etílico a 20 °C.

Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%), utilizando-se o programa ASSISTAT, versão 7.6 beta (Silva e Azevedo, 2009).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tratamento do Mosto

O mosto foi analisado antes de quaisquer tratamentos e também após a adição das enzimas α -amilase e glicoamilase, tendo em vista a sua composição, o que permitiu a avaliação do desempenho das enzimas na degradação do amido em moléculas mais simples. Os resultados obtidos nas determinações analíticas encontram-se na Tabela 1.

Pelos resultados obtidos observa-se um aumento de 24,29% na concentração do Brix no mosto de caldo de cana e ao mesmo tempo observa-se uma redução de 36,60% na concentração do amido presente no caldo da cana-de-açúcar.

Tabela 1. Composição média do mosto do caldo da cana-de-açúcar antes e após a adição das enzimas α -amilase e glicoamilase.

Determinações	Sem enzimas	Com enzimas
Brix (%)	21,0	26,1
pH	4,97	5,95
Amido (mg. L ⁻¹)	123	78
Glicose (%p/v)	9,24	11,22
Frutose (%p/v)	9,76	11,80
Açúcares Redutores Totais (ART %)	19,00	23,00
Ácido Láctico (%p/v)	0,127	0,093
Glicerol (%p/v)	0,036	0,026
Ácido Acético (%p/v)	0,095	0,124

Obs: p/v = porcentagem em peso sobre o volume.

O acréscimo observado nos valores de sólido solúveis (Brix) no caldo pode ser explicado, em parte, pela conversão do amido e, conseqüentemente, pelo aumento dos açúcares dissolvidos no meio. Considera-se também o efeito da adição de hidróxido de sódio (NaOH) ao meio, cuja finalidade foi elevar o pH do caldo até 6,0 com vista a favorecer a atuação das leveduras na fermentação. Os valores dos açúcares redutores totais (ART) tiveram um acréscimo de 21,05%, em proporções semelhantes ao acréscimo obtidos individualmente para os açúcares simples. Após o tratamento com enzimas houve um aumento da concentração da glicose em 21,43% e da frutose em 20,90%.

Através dos resultados da Tabela 1 é possível verificar que o mosto utilizado, sem a adição de enzimas, já se apresentava contaminado por bactérias, fato observado pelas concentrações de ácido láctico e ácido acético presentes, o que causou a redução do pH inicial a valores inferiores a 5,0. Pela concentração de glicerol sugere-se que já havia também uma contaminação inicial do mosto por leveduras nativas. Esses resultados são considerados aceitáveis, uma vez que as fermentações industriais do caldo da cana-de-açúcar para produção de etanol são operacionalizadas em condições não assépticas.

Com o uso das enzimas no tratamento do caldo observou-se uma redução na concentração do amido e, conseqüentemente, um acréscimo das concentrações da glicose e da frutose no meio, embora não se tenha observado o incremento esperado, pois presume-se que a hidrólise do amido foi parcial e que ainda podem existir no meio açúcares ou moléculas que não foram totalmente degradadas, permanecendo no meio como maltose ou dextrinas-limites. A concentração de amido presente no caldo utilizado na fermentação foi igual a 123 mg.L⁻¹, ou seja, inferior ao encontrado por Oliveira et al. (2007), em variedades de cana comercializadas no país. Nesse caso o caldo já passou pelo processo de aquecimento e clarificação com remoção de parte do amido presente.

Produção do Inóculo

Os valores obtidos pelas análises microbiológicas após a etapa de multiplicação das leveduras encontram-se na Tabela 2. Observa-se valores de viabilidade e brotamento celular em concentrações equivalentes as condições normais de fermentação industrial.

Tabela 2. Resultados médios das análises microbiológicas no fermento após a multiplicação em substrato de caldo de cana-de-açúcar.

Determinações	Valores
Viabilidade celular (%)	80,61
Número de células (cel.mL ⁻¹)	5,7 x 10 ⁸
Brotamento celular (%)	8

Considerando-se o número de células por mililitro a população de leveduras se encontra em estágio ideal para início da fermentação. Em apenas 24 horas de multiplicação foi possível atingir a população de células de leveduras consideradas ideal e suficiente para dar início aos testes fermentativos. O inóculo apresentou viabilidade celular superior a 80% e brotamento igual a 8%.

Produção de Etanol

Os valores médios obtidos das concentrações de açúcares redutores totais residuais (ARRT), pH, etanol produzido no vinho (T.A), tempo de fermentação em horas e as eficiências fermentativas encontram-se na Tabela 3 e na Tabela 4 encontram-se os resultados médios das determinações microbiológicas, ou seja, a porcentagem de fermento, número de células (cel.mL⁻¹), número de bastonetes (bast.mL⁻¹) e a porcentagem de células viáveis, após o final do ciclo de fermentação, com as respectivas diferenças significativas e os coeficientes de variações.

Os dados obtidos foram submetidos às análises estatísticas que revelaram diferenças significativas ($p < 0,05$) para todos os parâmetros analisados com exceção da concentração de células e da porcentagem de fermento. Foi possível verificar que o tratamento com adição de enzimas proporcionou uma fermentação com maior residual de açúcares redutores e um teor alcoólico no vinho menor, o que resultou em menor eficiência fermentativa, quando foi comparado com o tratamento sem enzimas.

Em relação ao pH final do mosto, após a fermentação, o tratamento do caldo sem enzimas apresentou um valor menor que o do tratamento com enzimas. Esses resultados corroboram com os apresentados por Moraes et al. (2013). Este fato pode ser explicado pela contaminação microbiana observada através dos resultados de contagem de bastonetes, que se apresentaram em maior número para o tratamento sem enzimas. O crescimento de

Tabela 3. Resultados médios das determinações química e tempo de fermentação obtidos no vinho para os tratamentos com e sem adição de enzimas.

Tratamentos	Determinações				
	pH	T.A (GL)	ARRT	E.F. (%)	Tempo (h)
Sem enzimas	4,19 a	6,26 a	0,05 a	71,50 a	12
Com enzimas	4,61 b	5,64 b	0,15 b	68,91 b	14
DMS (5%)	0,18	0,29	0,05	0,74	-
C.V	0,80	2,64	13,40	2,39	-

Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. DMS: diferença mínima significativa. C.V: coeficiente de variação.

Tabela 4. Resultados médios das determinações microbiológicas obtidos no vinho após fermentação para os tratamentos com e sem adição de enzimas.

Tratamentos	Determinações			
	Fermento (%)	Cél./mL	Bast./mL	Viab. Cel. (%)
Sem enzimas	12 a	8,3x10 ⁸ a	1,9x10 ⁷ a	73,65 a
Com enzimas	12 a	7,8x10 ⁸ a	3,7x10 ⁶ b	80,10 b
DMS (5%)	0.001	1,34	2,68	2,92
C.V.	0.02	18,85	23,76	1,73

Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. DMS: diferença mínima significativa. C.V: coeficiente de variação.

contaminantes microbiano na fermentação do caldo foi favorecido em meio sem a adição de enzimas. Segundo Ribeiro Filho et al. (2008), a acidificação do meio ocorre por contaminação de bactérias ou pelas próprias leveduras através da formação natural de ácido acético a partir do etanol.

A porcentagem de fermento no mosto para os tratamentos com e sem enzimas foram iguais e a concentração final de células de leveduras na fermentação foram semelhantes. Através do teste de comparações múltiplas (Tukey 5%) esses resultados não apresentaram diferenças significativas quando comparados os tratamentos. Isso mostra que ambos os tratamentos apresentaram a mesma capacidade fermentativa, principalmente em relação ao desenvolvimento e à adaptação das células ao meio e as condições ambientais expostas à fermentação.

A porcentagem de viabilidade celular do tratamento sem adição de enzimas foi menor que a do tratamento com enzimas, no entanto, o número de células totais manteve-se sempre em patamares semelhantes. Notou-se uma quantidade maior de espumas formadas no tratamento sem adição de enzimas, e com isso foi necessário proceder uma constante agitação nos frascos, que provocou uma liberação mais rápida do CO₂ produzido na fermentação e, conseqüentemente, uma fermentação mais rápida, ou seja em menor tempo. A partir dessas observações pode inferir-se que a viabilidade celular reduzida do tratamento

sem enzimas foi ocasionada devido a antecipação do tempo de fermentação em 2 (duas) horas. As leveduras do tratamento sem enzimas foram perdendo viabilidade pelo tempo que permaneceram em contato com o álcool produzido, após o final da fermentação, uma vez que já não havia mais açúcar presente no vinho. Fato também que pode explicar a intensidade maior de contaminação bacteriana do vinho nesse tratamento. De alguma forma a ausência de enzimas resultou em menor tempo de fermentação afetando os parâmetros de avaliação do processo de produção de etanol.

Os valores de teor alcoólico obtidos no vinho apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos do caldo na análise de variância a 5% de probabilidade. A concentração de etanol no vinho foi maior no tratamento sem a adição de enzimas e, por conseqüência, resultou em maior eficiência fermentativa, como pode ser observado pela média dos resultados da Tabela 3.

A análise comparativa das médias pelo teste de Tukey revelou existir diferenças entre os tratamentos para os valores de eficiência fermentativa. Os valores médios de eficiência fermentativa foram iguais a 68,91% e 71,50%, respectivamente para o caldo com e sem enzimas. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Moraes et al. (2013). Para Lopes et al. (2010) a eficiência fermentativa obtida em caldo de cana-de-açúcar e em sorgo sacarino foram iguais a 72,78% e 81,39%,

respectivamente. Os resultados obtidos no presente estudo foram semelhantes aos relatados na literatura, uma vez que diversos fatores influenciam na eficiência fermentativa, como qualidade da matéria-prima, temperatura, pH, estirpes de leveduras, entre outros.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos e considerando as condições em que o experimento foi conduzido pode-se concluir que a adição de enzimas no caldo da cana-de-açúcar proporcionou maiores teores de açúcares redutores totais e redução do teor de amido presente. A adição de enzimas ao caldo de cana não resultou em acréscimos ou incrementos à produção de etanol. A viabilidade celular da linhagem de levedura utilizada foi significativamente menor para o caldo onde não se adicionou enzimas.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, H., BASSO, L. C. & ALVEZ, D.M.G., 1996. *Métodos analíticos para o controle da produção de álcool e açúcar*. Piracicaba: FERMENTEC; FEALQ; ESALQ/USP. 195 p.
- APAR, D.K. & ÖZBEK, B., 2004. Alfa-Amylase inactivation during corn starch hydrolysis process. *Process Biochemistry*, vol. 39, no. 12, pp. 1877-1892. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2003.09.014>.
- CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA, 2011. *Manual de métodos de análises para açúcar*. Piracicaba: CTC.
- COSTA, G.H.G., FREITA, C.M., FREIRA, L.A., MASSON, I.S. & MUTTON, M.J.R., 2012. Efeitos de α -amilase na clarificação do caldo do sorgo sacarino em diferentes faixas de pH. *Ciência & Tecnologia*, vol. 4. Suplemento.
- FIGUEIRA, J. A., CARVALHO. P.H. & SATO, H. H., 2011. Sugarcane starch: quantitative determination and characterization. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, vol. 31, no. 3, pp. 806-815. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612011000300040>.
- GUPTA, R., MOHAPATRA, H., GOSWAMI, V.K. & CHAUHAN, B., 2003. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, vol. 38, no. 11, pp. 599-1616. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00053-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00053-0)
- LEE, S.S., ROBISON, F. F & WANG, H.Y., 1981. Rapid determination of yeast viability. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, no. 11, pp. 641-649.
- LOPES, J.J.C., PARAZZI, C. & VALSECHI, O.A., 2010. Bioethanol production from sweet sorghum and sugar cane in southeast of Brazil. In: *VIII European Symposium on Biochemical Engineering Science*, 2010, Bologna. pp. 410.
- MADALENO, L. L., RAVANELI, G. C., PRESOTTI, L. E., MUTTON, M. A., FERNANDES, O. A. M. & MUTTON, M. J. R., 2008. Influence of *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) injury on the quality of cane juice. *Neotropical Entomology*, vol. 37, no. 1, pp. 68-73. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2008000100010>.
- MAGRO, J.A., 2005. Nova maneira de colher manualmente a cana queimada visando a qualidade. In: *25º Reunião Anual Encontros Fermentec*, 2005. Águas de São Pedro: Fermentec. pp. 8.
- MORAES C.C., PARAZZI, C., LOPES, J.J.C. & VALSECHI, O. A., 2013. Avaliação de linhagens de leveduras e o efeito da hidrólise enzimática na fermentação do sorgo sacarino para a produção de etanol. In: *Anais do XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos e Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas*, 2013, Foz do Iguaçu.
- OLIVEIRA, D.T., ESQUIAVETO, M.M.M. & JUNIOR J.F.S., 2007. Impacto dos itens da especificação do açúcar na indústria alimentícia. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, vol. 27, pp. 99-102. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612007000500018>.
- PIRONE, C.L., ALEXANDER, L.C. & LAMP, W.O., 2005. Patterns of starch accumulation in alfafa subsequent to potato leafhopper (Homoptera: Cicadellidae) injury. *Environmental Entomology*, vol. 34, pp. 199-204. Disponível em: <https://doi.org/10.1603/0046-225X-34.1.199>.
- PUGLIA, A.L., 2006. *Desempenho de leveduras selvagens com potencial de produção de enzimas amilolíticas em processo fermentativo*. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 42 p. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agropecuária.

REIN, P.W., 2005. The effect of green cane harvesting on a sugar mill. In: *Anais do XXV Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists - ISSCT*, 2005. Guatemala. pp. 513-520.

RÍAZ, M., PERVEEN, R., JAVED, M.R., NADEEM, H. & RASHID, M.H., 2007. Kinetic and thermodynamic properties of novel glucoamylase from *Humicola* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 41, no. 5, pp. 558-564. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.05.010>.

RIBEIRO FILHO, N.M., FLORÊNCIO, I.M., ROCHA, A.S., DANTAS, J.P., FLORENTINO, E.R. & SILVA, F.L.H., 2008. Aproveitamento do caldo do sorgo sacarino para produção de aguardente. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, vol. 10, no. 1, pp. 9-16. <http://dx.doi.org/10.15871/1517-8595/rbpa.v10n1p9-16>.

SILVA, A. F., FERREIRA, O. E., COSTA, G. H.G., MONTIJO, N. A., MUTTON, M.A. & MUTTON, M. J. R., 2016. Technological quality of sweet sorghum processed without panicles for ethanol production. *Australian Journal of Crop Science*. vol. 10, no. 11, pp. 1578-1582. <http://dx.doi.org/10.21475/ajcs.2016.10.11.p7697>.

SILVA, F.A.S. & AZEVEDO, C.A.V., 2009. Principal components analysis in the software Assistat-Statistical attendance. In: *VII World Congress on Computers in Agriculture*, 2009. Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers. pp. 1.

STUPIELLO, J. P., 2000. Pontas de cana: problema industrial. *STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos*, vol. 18, no. 4, pp. 12.