



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
UNIDADE ACADÊMICA CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA
MESTRADO**

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA COMPLEMENTAÇÃO DE
NUTRIENTES NO MOSTO SOBRE O PROCESSO DE
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM BATELADA**

por

ALESSANDRA MARQUES DOS SANTOS

Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Federal de Alagoas para obtenção do grau de Mestre

Maceió-AL, Maio de 2008.

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA COMPLEMENTAÇÃO DE
NUTRIENTES NO MOSTO SOBRE O PROCESSO DE
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM BATELADA**

ALESSANDRA MARQUES DOS SANTOS

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO CURSO
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA COMO PARTE DOS REQUISITOS
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE
EM ENGENHARIA QUÍMICA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: DESENVOLVIMENTO E PESQUISA DE
PROCESSOS REGIONAIS

LINHA DE PESQUISA: PROCESSOS BIOQUÍMICOS

ORIENTADORA: PROFA. DRA. RENATA MARIA ROSAS GARCIA ALMEIDA

CO – ORIENTADOR: PROF. DR. JOÃO NUNES DE VASCONCELOS

MACEIÓ-AL

2008

Catlogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

S237e Santos, Alessandra Marques dos.
Estudo da influência da complementação de nutrientes no mosto sobre o processo de fermentação alcoólica em batelada / Alessandra Marques dos Santos. – Maceió, 2008.
77 f. : il. tabs., graf.

Orientadora: Renata Maria Rosas Garcia Almeida.
Co-Orientador: João Nunes de Vasconcelos.
Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Exatas. Instituto de Química. Maceió, 2008.

Bibliografia: f. 55-61.
Apêndices: f. 62-77.

1. Fermentação alcoólica. 2. Levedura. 3. Mosto. 4. Álcool – Produção.
5. Cana-de-açúcar. I. Título.

CDU: 661.722

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA COMPLEMENTAÇÃO DE
NUTRIENTES NO MOSTO SOBRE O PROCESSO DE
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM BATELADA**

por

ALESSANDRA MARQUES DOS SANTOS


Dissertação defendida e julgada em sua forma final em 14 de maio de 2008,
pela comissão examinadora, para obtenção de título de Mestre em Engenharia
Química.



Prof^a. Dr^a. Luciana Cristina Lins de Aquino – UFS



Prof. Dr. – Antonio Osimar Sousa da Silva – UFAL



Prof^a.Dr^a. Renta Maria Rosas Garcia – UFAL (Orientadora)



Prof. Dr. João Nunes de Vasconcelos – UFAL (Co-orientador)

*Qualquer sucesso exige, ao mesmo tempo, talento e sorte.
E a “sorte” tem de ser ajudada e proporcionada por alguém.
Se alguma coisa pode dar certo, faça-a dar certo.*

Emmett C. Murphy Sr.

*A minha família, por terem me ensinado
valores os quais nunca vão mudar e
sempre trarão bons frutos.
A minha querida e amada filha Annie Camille razão
do meu viver...*

Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela presença constante em minha vida e sem o qual nada seria possível.

À minha família, pelo apoio, paciência e afeto, sempre.

À Prof^ª. Dra. Renata, pela sabedoria na orientação, amizade e confiança constante ao longo do trabalho.

Ao Prof. Dr. João Nunes, pela participação e sugestões.

Ao Prof. Evandir Gonçalves, pela amizade, incentivo e pelas valiosas sugestões.

À Margarete, pelo amparo em algumas análises físico-químicas.

Aos colegas do curso Isolda, Carlos Melo e Antônio, pelas alegrias compartilhadas.

À Fundação de Amparo a pesquisa (FAPEAL), pela concessão da bolsa de estudo e pelo auxílio financeiro à execução do projeto.

Agradeço ao Eng^º. Químico Aldevan da Usina Marituba, pela utilização do densímetro digital Anton-Paar para a realização das análises de teor alcoólico.

À Usina Cachoeira pelo melaço cedido e à indústria QUIMATEC produtos químicos LTDA pelos nutrientes cedidos.

Agradeço ainda, aqueles que não foram citados, mas que de uma forma ou outra contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A transformação de açúcar (glicose) em etanol e CO₂ envolve 11 reações em seqüência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica das leveduras produtoras de etanol, como por exemplo, a *Saccharomyces cerevisiae*. Essas leveduras exigem uma fonte de carbono, que pode ser glicose ou outro açúcar, mas também exigem vitaminas e outros nutrientes tais como nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio, cálcio, zinco, manganês, cobre, ferro, cobalto, iodo e outros elementos em quantidades diminutas. As necessidades nutricionais das leveduras durante o processo de fermentação alcoólica influenciam na multiplicação, crescimento celular e eficiência de transformação do açúcar em álcool.

O presente trabalho teve por objetivo estudar a influência da complementação de nutrientes em mosto de caldo de cana a 14°Brix e mosto de melaço a 15°Brix sobre o processo de fermentação alcoólica em batelada simples, utilizando as formulações comerciais A, B e C. Essas formulações comerciais apresentaram em suas composições P₂O₅, N, MgSO₄, MnSO₄ e ZnSO₄ em doses diferentes para cada um dos três nutrientes comerciais. As fermentações foram conduzidas em Erlenmeyers e em agitador tipo “Shaker” com agitação (200 rpm) e temperatura (± 32°C) controladas, com pesagem de hora em hora dos Erlenmeyers para determinar o final da fermentação. As análises utilizadas para avaliação da eficiência do processo fermentativo foram: Açúcares Redutores Totais (ART), acidez sulfúrica, pH e teor alcoólico. As concentrações testadas dos nutrientes comerciais foram determinadas com base nas deficiências dos mostos. Para complementar o mosto de melaço, estabeleceu-se que as concentrações dos nutrientes comerciais que maximizariam a eficiência e produtividade no processo fermentativo foram: 0,20 g de A/litro de mosto, 0,50 g de B/litro de mosto e 0,30 g de C/litro de mosto. E no mosto de caldo de cana foram: 0,50 g de A/litro de mosto, 1 g de B/litro de mosto e 2 g de C/litro de mosto.

Palavras-chave: Fermentação alcoólica, nutrientes, levedura.

ABSTRACT

The transformation of sugar (glucose) into ethanol and CO₂ involves 11 reactions in orderly sequence, each catalyzed by a specific enzyme from yeast producing ethanol, for example, *Saccharomyces cerevisiae*. These yeast require a source of carbon, which can be another glucose or sugar, but also require vitamins and other nutrients such as nitrogen, phosphorus, sulfur, potassium, magnesium, calcium, zinc, manganese, copper, iron, cobalt, iodine and other elements in small quantities. The nutritional needs of yeast during alcoholic fermentation influence the proliferation and cell growth and efficiency of transformation of sugar into alcohol.

This study aimed to investigate the effect of supplementation of nutrients in grape juice from the sugar cane to 14° Brix and mash of molasses to 15° Brix on the process of alcoholic fermentation in batch simple, using the commercial formulations A, B and C. These formulations commercial showed in their compositions P₂O₅, N, MgSO₄, MnSO₄ and ZnSO₄ in different doses for each of the three nutrients trade. The fermentations were conducted in erlenmeyers and shaker type “Shaker” with agitation (200 rpm) and temperature (± 32°C) controlled with weighing of an hour in hour of erlenmeyers to determine the end of fermentation. The analyses used to evaluate the efficiency of the fermentation process were: "Reducing sugars Totals (ART), sulfuric acidity, pH and alcohol content. The concentrations of nutrients tested were determined trade based on deficiencies of musts.

To complement the mash of molasses, it was found that concentrations of nutrients that commercial maximizes the efficiency and productivity in the fermentation process were: 0.20 grams of A / litre of must, 0.50 grams of B / litre of must and 0,30 g of C / liter of juice. And in the mash of broth of cane were: 0.50 grams of A / litre of must, 1 g of B / litre of must and 2 grams of C / liter of juice.

Keywords: alcoholic fermentation, nutrients, yeast.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Bolhas de CO ₂ desprendidas durante a fermentação.....	2
Figura 2 – Seqüência de reações enzimáticas pela fermentação alcoólica.....	4
Figura 3 – Morfologia da célula de levedura.....	7
Figura 4 – Reprodução de uma célula de levedura.....	8
Figura 5 – Curva típica de crescimento celular. (A) fase “lag”; (B) fase exponencial de crescimento; (C) fase estacionária; (D) fase de morte.....	9
Figura 6 – Equipamento utilizado na titulação de ART (REDUTEC).....	21
Figura 7 – Agitador rotatório tipo “Shaker” com controle de agitação e temperatura.....	23
Figura 8 – Valores de ART residual (g/L) e Etanol produzido (g/L) para os ensaios com mosto de melão contendo diferentes concentrações de açúcares.	27
Figura 9 – Valores de ART residual (g/L) e Etanol produzido (g/L) para os ensaios com mosto de caldo de cana contendo diferentes concentrações de açúcares.	28
Figura 10 – Valores de Eficiência de fermentação $\eta_b(\%)$ e Eficiência de processo $\eta_p(\%)$ para os ensaios com mosto de melão contendo diferentes concentrações de açúcares.	29
Figura 11 – Valores de Eficiência de fermentação $\eta_b(\%)$ e Eficiência de processo $\eta_p(\%)$ para os ensaios com mosto de caldo de cana contendo diferentes concentrações de açúcares.	29
Figura 12 – Valores de Produtividade (g/L.h) para os ensaios com mosto de melão contendo diferentes concentrações de açúcares.....	30
Figura 13 – Valores de Produtividade (g/L.h) para os ensaios com mosto de caldo de cana contendo diferentes concentrações de açúcares.....	31

Figura 14 – Valores de pH e acidez sulfúrica (g/L de H ₂ SO ₄) para os ensaios com mosto de melão contendo diferentes concentrações de açúcares.	31
Figura 15 – Valores de pH e acidez sulfúrica (g/L de H ₂ SO ₄) para os ensaios com mosto de caldo de cana contendo diferentes concentrações de açúcares.	32
Figura 16 – Etanol produzido e ART residual, obtidos após a fermentação com mosto de melão em batelada simples complementado com o nutriente comercial A.	33
Figura 17 – Etanol produzido e ART residual, obtidos após a fermentação com mosto de melão em batelada simples complementado com o nutriente comercial B.	34
Figura 18 – Etanol produzido e ART residual, obtidos após a fermentação com mosto de melão em batelada simples complementado com o nutriente comercial C.	34
Figura 19 – Eficiência de fermentação $\eta_b(\%)$ e Eficiência de processo $\eta_p(\%)$, em função da complementação do nutriente comercial A, em ensaios conduzidos com mosto de melão.	36
Figura 20 – Eficiência de fermentação $\eta_b(\%)$ e Eficiência de processo $\eta_p(\%)$, em função da complementação do nutriente comercial B, em ensaios conduzidos com mosto de melão.	37
Figura 21 – Eficiência de fermentação $\eta_b(\%)$ e Eficiência de processo $\eta_p(\%)$, em função da complementação do nutriente comercial C, em ensaios conduzidos com mosto de melão.	37
Figura 22 – Produtividade (g/L.h), em função da complementação do nutriente comercial A, em ensaios conduzidos com mosto de melão em batelada simples.	38
Figura 23 – Produtividade (g/L.h), em função da complementação do nutriente comercial B, em ensaios conduzidos com mosto de melão em batelada simples.	38
Figura 24 – Produtividade (g/L.h), em função da complementação do nutriente comercial C, em ensaios conduzidos com mosto de melão em batelada simples.	39

Figura 25 – Variação da acidez sulfúrica e pH, em função da complementação dos nutrientes comerciais A, B e C, em ensaios conduzidos com mosto de melão em batelada simples.....	40
Figura 26 – Comparação entre as eficiências de fermentação e de processo nas concentrações ideais dos nutrientes comerciais A, B e C adicionados ao mosto de melão.	41
Figura 27 – Comparação entre as produtividades do processo nas concentrações ideais dos nutrientes comerciais A, B e C adicionados ao mosto de melão.....	42
Figura 28 – Variação do etanol produzido e ART residual, em função da complementação do nutriente comercial A, em ensaios conduzidos com mosto de caldo de cana.	43
Figura 29 – Variação do etanol produzido e ART residual, em função da complementação do nutriente comercial B, em ensaios conduzidos com mosto de caldo de cana.	44
Figura 30 – Variação do etanol produzido e ART residual, em função da complementação do nutriente comercial C, em ensaios conduzidos com mosto de caldo de cana.	44
Figura 31 – Eficiência de fermentação $\eta_b(\%)$ e Eficiência de processo $\eta_p(\%)$, em função da complementação do nutriente comercial A, em ensaios com mosto de caldo de cana.	46
Figura 32 – Eficiência de fermentação $\eta_b(\%)$ e Eficiência de processo $\eta_p(\%)$, em função da complementação do nutriente comercial B, em ensaios com mosto de caldo de cana.....	46
Figura 33 – Eficiência de fermentação $\eta_b(\%)$ e Eficiência de processo $\eta_p(\%)$, em função da complementação do nutriente comercial C, em ensaios com mosto de caldo de cana.....	47
Figura 34 – Produtividade (g/L.h), em função da complementação do nutriente comercial A, em ensaios conduzidos com mosto de caldo de cana em batelada simples.....	48
Figura 35 – Produtividade (g/L.h), em função da complementação do nutriente comercial B, em ensaios conduzidos com mosto de caldo de cana em batelada simples.....	48

Figura 36 – Produtividade (g/L.h), em função da complementação do nutriente comercial C, em ensaios conduzidos com mosto de caldo de cana em batelada simples.....	49
Figura 37 – Variação da acidez sulfúrica e pH, em função da complementação dos nutrientes comerciais A, B e C, em ensaios conduzidos com mosto de caldo de cana em batelada simples.....	50
Figura 38 – Comparação entre as eficiências de fermentação e de processo nas concentrações ideais dos nutrientes comerciais A, B e C adicionados ao mosto de caldo de cana.....	51
Figura 39 – Comparação entre as produtividades do processo nas concentrações ideais dos nutrientes comerciais A, B e C adicionados ao mosto de caldo de cana.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química do caldo de cana e do melaço	6
Tabela 2 – Constituintes inorgânicos das leveduras.....	10
Tabela 3 – Concentrações de nutrientes minerais no mosto para se obter adequada fermentação alcoólica.....	12
Tabela 4 – Composição química dos produtos utilizados como nutrientes, de acordo com o manual do fabricante.....	19
Tabela 5 – Concentrações dos macro e micronutrientes encontrados no mosto de melaço a 15°Brix e no mosto de caldo de cana a 14°Brix.....	26
Tabela A1 – Fermentação desenvolvida pelo fermento Fleischmann (levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>) no mosto de melaço a 15°Brix, no tempo total de 8,5 horas....	63
Tabela A2 – Fermentação desenvolvida pelo fermento Fleischmann (levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>) no mosto de melaço a 18°Brix, no tempo total de 10,5 horas...63	
Tabela A3 – Fermentação desenvolvida pelo fermento Fleischmann (levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>) no mosto de melaço a 21°Brix, no tempo total de 12,5 horas..	63
Tabela A4 – Fatores de rendimento, eficiência de fermentação e produtividade de etanol para mosto de melaço a 15, 18 e 21°Brix.	64
Tabela A5 – Fermentação desenvolvida pelo fermento Fleischmann (levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>) no mosto de caldo de cana a 12°Brix, no tempo total de 8,5 horas.	64
Tabela A6 – Fermentação desenvolvida pelo fermento Fleischmann (levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>) no mosto de caldo de cana a 14°Brix, no tempo total de 10,5 horas.....	64

Tabela A7 – Fermentação desenvolvida pelo fermento Fleischmann (levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>) no mosto de caldo de cana a 16°Brix, no tempo total de 12 horas	65
Tabela A8 – Fatores de rendimento, eficiência de fermentação e produtividade de etanol para mosto de caldo de cana a 12, 14 e 16°Brix.	65
Tabela A9 – Resultados da complementação do nutriente comercial A. O volume de mosto de melaço utilizado para cada ensaio foi de 1000 mL (mosto com 15°Brix, pH = 4,5 e ART = 112,4 g/L).	66
Tabela A10 – Eficiência de fermentação e de processo, fator de rendimento e produtividade em etanol dos ensaios com complementação do nutriente comercial A.	66
Tabela A11 – Resultados da complementação do nutriente comercial B. O volume de mosto de melaço utilizado para cada ensaio foi de 1000 mL (mosto com 15°Brix, pH = 4,5 e ART = 112,4 g/L).	67
Tabela A12 – Eficiência de fermentação e de processo, fator de rendimento e produtividade em etanol dos ensaios com complementação do nutriente comercial B.	67
Tabela A13 – Resultados da complementação do nutriente comercial C. O volume de mosto de melaço utilizado para cada ensaio foi de 1000 mL (mosto com 15°Brix, pH = 4,5 e ART = 112,4 g/L).	68
Tabela A14 – Eficiência de fermentação e de processo, fator de rendimento e produtividade em etanol dos ensaios com complementação do nutriente comercial C.	68
Tabela A15 – Resultados da complementação do nutriente comercial A. O volume de mosto de caldo de cana utilizado para cada ensaio foi de 1000 mL (mosto com 14°Brix, pH = 4,7 e ART = 136 g/L).	69

Tabela A16 – Eficiência de fermentação e de processo, fator de rendimento e produtividade em etanol dos ensaios com complementação do nutriente comercial A.....	69
Tabela A17 – Resultados da complementação do nutriente comercial B. O volume de mosto de caldo de cana utilizado para cada ensaio foi de 1000 mL (mosto com 14°Brix, pH = 4,7 e ART = 136 g/L).	70
Tabela A18 – Eficiência de fermentação e de processo, fator de rendimento e produtividade em etanol dos ensaios com complementação do nutriente comercial B.....	70
Tabela A19 – Resultados da complementação do nutriente comercial C. O volume de mosto de caldo de cana utilizado para cada ensaio foi de 1000 mL (mosto com 14°Brix, pH = 4,7 e ART = 136 g/L).	71
Tabela A20 – Eficiência de fermentação e de processo, fator de rendimento e produtividade em etanol dos ensaios com complementação do nutriente comercial C.....	71

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	1
2 – REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 – BIOQUÍMICA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	3
2.2 – MEIO DE FERMENTAÇÃO.....	4
2.3 – AGENTES DA FERMENTAÇÃO – LEVEDURAS	6
2.4 – MULTIPLICAÇÃO CELULAR	7
2.5 – CRESCIMENTO CELULAR	8
2.6 – IMPORTÂNCIA DOS NUTRIENTES PARA A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	9
2.7 – COMPLEMENTAÇÃO DE NUTRIENTES NO MOSTO	14
3 – JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	17
3.1 – JUSTIFICATIVA	17
3.2 – OBJETIVOS.....	17
3.2.1 – Geral	17
3.2.2 – Específicos.....	17
4 – METODOLOGIA.....	19
4.1 – MATERIAIS	19
4.1.1 – Mosto	19
4.1.2 – Microrganismo	19
4.1.3 – Nutrientes	19
4.2 – MÉTODOS.....	20
4.2.1 – Determinação do Brix Refratométrico	20
4.2.2 – Determinação do pH.....	20
4.2.3 – Determinação do Teor Alcoólico	20
4.2.4 – Determinação do Desprendimento de CO ₂ durante a Fermentação	20
4.2.5 – Determinação da Acidez Sulfúrica.....	20
4.2.6 – Determinação dos Açúcares Redutores Totais (ART) no Mosto	21
4.2.7 – Determinação dos Açúcares Redutores Totais (ART) no Vinho	21
4.2.8 – Experimentos fermentativos.....	22

4.2.9 – Parâmetros de fermentação.....	23
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1 – CARACTERIZAÇÃO DOS MEIOS DE FERMENTAÇÃO.....	26
5.2 – EXPERIMENTOS FERMENTATIVOS SEM ADIÇÃO DE NUTRIENTES.....	27
5.3 – EXPERIMENTOS FERMENTATIVOS COM COMPLEMENTAÇÃO DE NUTRIENTES	32
5.3.1 – Fermentação com mosto de melão a 15°Brix	32
5.3.2 – Fermentação com mosto de caldo de cana a 14°Brix	42
6 – CONCLUSÕES.....	53
7 – SUGESTÕES	54
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
APÊNDICES	62

1 – INTRODUÇÃO

A fermentação alcoólica vem sendo utilizada desde a mais remota antiguidade; há mais de 4.000 anos os egípcios fabricavam o pão e produziam bebidas alcoólicas a partir de cereais e frutas. No entanto, apenas recentemente é que se pôde relacionar a fermentação com as leveduras, fungos amplamente distribuídos na natureza e com capacidade de sobrevivência tanto em condições aeróbias como anaeróbias (LIMA et al., 2001). Segundo estes autores, as leveduras beneficiaram a humanidade por um longo período, mesmo sem saber de sua existência, notada pela primeira vez por Antoine Van Leewenhoek (1623-1723), ao observar amostra de cerveja em fermentação, com seu microscópio rudimentar.

Segundo Lima et al. (2001) após a formulação da estequiometria da fermentação, desenvolvida por Gay-Lussac em 1815, Pasteur em 1863 demonstrou a natureza microbiológica da fermentação alcoólica como sendo um processo anaeróbico e ainda, durante as primeiras décadas de 1900 as pesquisas culminaram com a elucidação das reações enzimáticas catalisadas por enzimas específicas responsáveis pela transformação química do açúcar em etanol e gás carbônico no interior da levedura. De acordo com Stryer (1996) e Lima et al. (2001) a via glicolítica completa foi elucidada por volta de 1940, principalmente devido às contribuições de Gustav Embden, Otto Meyerhof, Cal Neuberg, Jacob Parmas, Otto Warburg, Gerty Cori e Carl Cori.

Atualmente entende-se por fermentação, o processo de metabolismo anaeróbico de produção de energia em que os microrganismos oxidam parcialmente o substrato, atuando sobre um ou mais componentes, gerando produtos modificados de forma a obter características desejáveis. Nos processos fermentativos, as células vivas agregam os sistemas multienzimáticos, e seu funcionamento depende de uma série complexa de reações. Integrações altamente coordenadas dessas reações definem as vias metabólicas de utilização do substrato pelos microrganismos. A fermentação alcoólica tem seu início devido à ação das leveduras que usam os açúcares do mosto para seu crescimento e multiplicação, dando como resultado a formação de álcool e anidrido carbônico. Enquanto existe oxigênio no mosto, a levedura cresce e se multiplica. Quando este acaba começa a produção de álcool e CO₂ (AQUARONE et al., 1983).

Durante o processo fermentativo, o meio de fermentação esquenta devido à energia liberada e são desprendidas bolhas de CO₂. A Figura 1 ilustra o desprendimento de bolhas de CO₂ durante a fermentação.

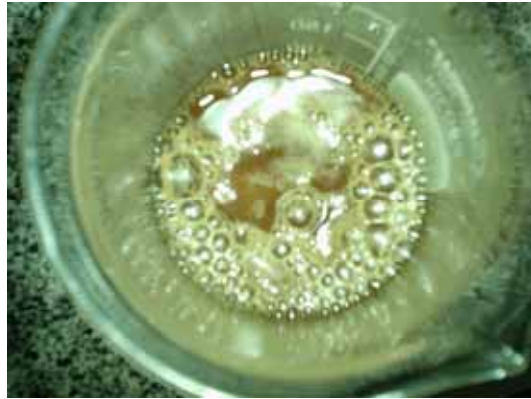


Figura 1 – Bolhas de CO₂ desprendidas durante a fermentação

Na fermentação alcoólica, o crescimento celular está intimamente relacionado com a formação do produto, que é o álcool. Desta forma, tanto o crescimento da levedura como a formação do álcool são influenciados pelas condições que o meio oferece. Então para suprir as exigências das leveduras, alguns macronutrientes e/ou micronutrientes são adicionados ao mosto, a fim de complementar as deficiências do meio, quanto a certos elementos indispensáveis às leveduras para a máxima transformação dos açúcares.

Devido à importância dos nutrientes no processo fermentativo, este trabalho visou estudar a influência da complementação de nutrientes no mosto sobre o processo de fermentação alcoólica em batelada.

2 – REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – BIOQUÍMICA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

A fermentação alcoólica é um processo anaeróbico que ocorre com a transformação de açúcares, em etanol e CO₂, catalizado por enzimas. Este processo é realizado principalmente por leveduras, em nível citoplasmático, com o objetivo de produzir energia, a qual será empregada na realização de suas atividades fisiológicas, e ainda para seu crescimento e reprodução, sendo, o etanol, tão somente, um subproduto desse processo (LIMA et al., 2001). A transformação do açúcar (glicose) em etanol e gás carbônico envolve 11 reações em seqüência ordenada conhecida como via glicolítica ou via EMP, onde cada reação é catalisada por uma enzima específica (Figura 2). Essas enzimas glicolíticas sofrem ações de diversos fatores (nutrientes, minerais, vitaminas, inibidores, substâncias do próprio metabolismo, pH, temperatura e outros), alguns que estimulam e outros que reprimem a ação enzimática, afetando o desempenho do processo fermentativo conduzido pelas leveduras. As rotas produtoras de energia ou catabólicas geram ATP e coenzimas necessárias para as diversas reações biossintéticas, e intermediários químicos utilizados como pontos de partida para as diversas reações de biossíntese. Um produto final significativo de todas as rotas é o ácido pirúvico, que em anaerobiose é precursor dos ácidos, álcoois e outros produtos (WARD, 1991).

De forma global, pode-se representar a fermentação alcoólica pela equação de Gay-Lussac. Na qual se observa que 1 mol de glicose (180 g) produz 2 moles de etanol (92 g), 2 moles de dióxido de carbono (CO₂) (88 g) e 57 kcal de energia (LEHNINGER et al., 1995; KOLB, 2002).



No que diz respeito ao rendimento teórico ($Y_{P/S}$) sabe-se que a partir do fator estequiométrico (0,511), obtém-se valor do rendimento na ordem de 90%, uma vez que se estima, que parte do açúcar metabolizado pela levedura seja desviado para gerar produtos como glicerol, álcoois superiores e outros, além do necessário para manutenção celular (SCHMIDELL; BONOMI, 2001; LIMA et al., 2001; WARD, 1991).

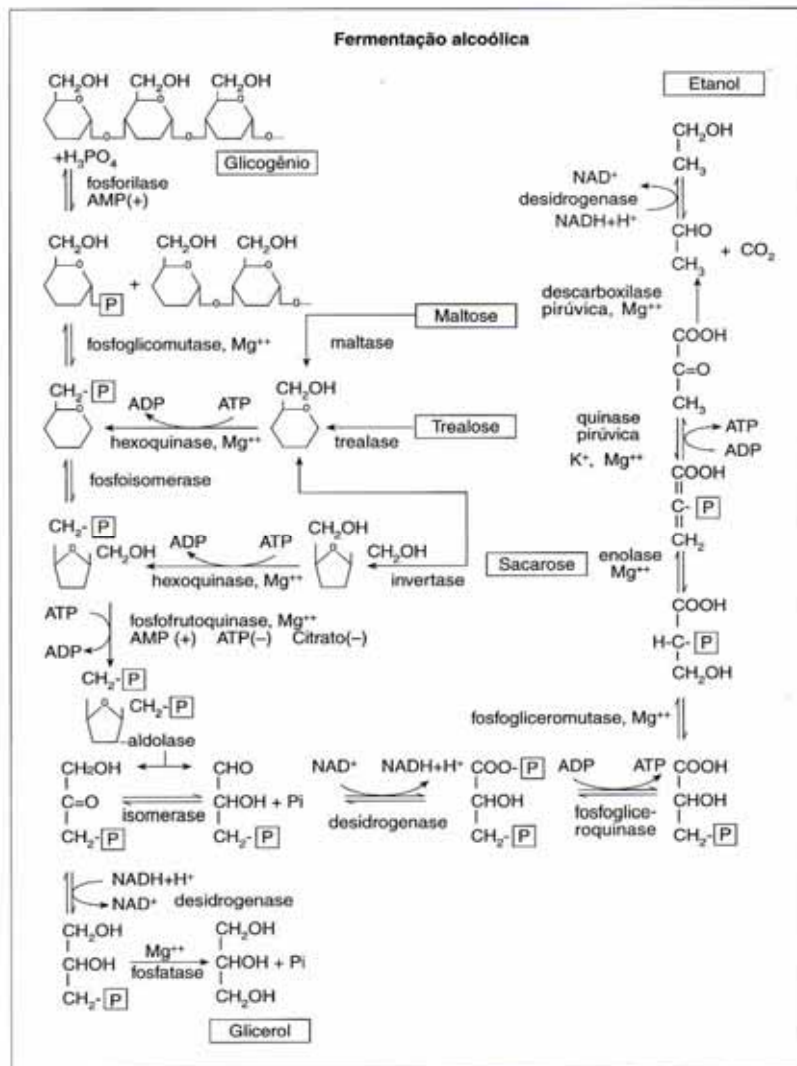


Figura 2 – Seqüência de reações enzimáticas pela fermentação alcoólica (LIMA et al., 2001).

2.2 – MEIO DE FERMENTAÇÃO

Qualquer produto que contenha açúcar ou outro carboidrato constitui-se em matéria-prima para obtenção de etanol. Os substratos (mostos) têm de ser adequados ao desenvolvimento do microrganismo e à finalidade de sua atividade, que é produzir uma determinada substância. Além de uma composição capaz de suprir as exigências do microrganismo, para seu melhor desempenho, deve estar devidamente condicionado em termos de pH, temperatura, assepsia ou esterilidade (LIMA et al., 2001).

As concentrações dos mostos, nas destilarias brasileiras, são comumente expressas em graus Brix (GAVA, 1998), quantidade de sólidos totais dissolvidos em uma solução açucarada a 20°C expressos em g/100g. O caldo de cana-de-açúcar servindo diretamente como matéria-prima para a fermentação, tem que ser diluído do seu Brix inicial de 16 – 18 para 14°Brix (RASOVSKY, 1973). Entretanto, para outros autores, a concentração de açúcares no mosto deve estar entre 16 a 20°Brix (GAVA, 1998). Além disso, durante a fermentação é necessário o controle de sua densidade, acidez, componentes nutritivos necessários ao crescimento das leveduras e temperatura que deve ser mantida entre 28 – 30°C (RASOVSKY, 1973; GAVA, 1998).

Na utilização de melaços é preciso fazer sua diluição com água. A diluição faz-se de modo contínuo, em misturadores especiais, com freqüente supervisão para garantir as concentrações adequadas, diluindo-se os melaços entre 15 e 25°Brix, com médias de 18 a 20°Brix (LIMA et al., 2001).

A composição da cana-de-açúcar é muito variável, chegando a divergir dentro de uma mesma região, em diferentes anos, variando, especialmente em função das condições climáticas, com as propriedades físicas, químicas e microbiológicas do solo, com o tipo de cultivo empregado, com a variedade, o estágio de maturação e a idade da cana, com a irrigação ou ainda com a irrigação-fertilizada (vinhaça) e com muitos outros fatores. Tal variação na composição química da cana-de-açúcar ocorre quantitativamente, porém qualitativamente ela é semelhante em todas as variedades. As composições químicas do melaço e do caldo de cana dependem muito da cana utilizada, portanto são também extremamente variáveis. A Tabela 1 apresenta essas composições segundo Stupiello (1974).

Tabela 1 – Composição química do caldo de cana e do melação (STUPIELLO, 1974).

Componente	Caldo de cana (%)	Melação (%)
Água	81,00	17,33
Sólidos totais	19,00	82,00
Brix	19,50	88,00
Sacarose	16,00	40,00
Glicose	0,30	12,00
Frutose	0,10	9,00
Açúcares Totais	18,00	65,00
Matéria nitrogenada	0,03	8,00
Acidez sulfúrica	0,50	3,00
pH	5,5	6,50
Cinzas	0,40	8,50
P ₂ O ₅	0,02	0,15
K ₂ O	0,15	3,80
CaO	0,02	1,05
MgO	0,02	0,50
Vitaminas	Variável	Variável

2.3 – AGENTES DA FERMENTAÇÃO – LEVEDURAS

As leveduras são os microrganismos mais importantes na obtenção do álcool por via fermentativa. Fazem parte do grupo de ascomicetos denominados fungos superiores e são unicelulares, eucarióticos, heterotróficos. Em geral são maiores que as bactérias, possuem quase sempre formas arredondadas, ovais ou elípticas; porém variam consideravelmente no que se refere a suas dimensões, com limites desde 1 a 5 µm de largura e 5 a 12 µm de comprimento (PELCZAR et al., 1980).

Na levedura existem duas regiões fundamentais, sendo elas o núcleo, que contém as características hereditárias e o citoplasma contendo enzimas responsáveis pela assimilação, transformação de substâncias vitais, crescimento e multiplicação celular (NAKANO, 2000). Nesta última, estão suspensas diversas organelas (mitocôndrias, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, etc.) que podem ser visualizadas na Figura 3.

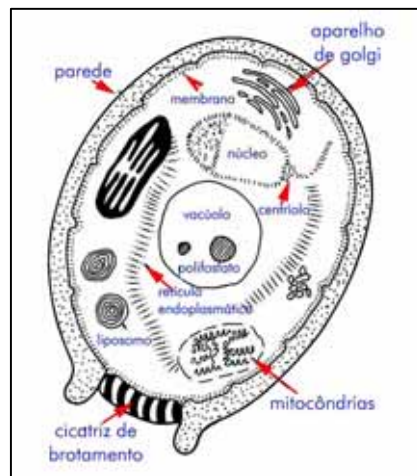


Figura 3 – Morfologia da célula de levedura (NAKANO, 2000).

Quanto ao ambiente, as leveduras se desenvolvem numa ampla faixa de temperatura, sendo que o intervalo ótimo de crescimento situa-se entre 26 e 35°C, com média de 30°C (LIMA et al., 1975). Em relação à variação de pH, os limites estão entre 4,5 e 5,5 (NOVAES et al., 1974). Esses microrganismos também apresentam elevada resistência osmótica.

Os critérios tecnológicos que fazem com que uma levedura seja utilizada comercialmente na fermentação alcoólica são o alto rendimento e a elevada produtividade, ou seja, rápida conversão de açúcar em álcool, com baixa produção de componentes secundários. A espécie mais importante de levedura alcoólica é a *Saccharomyces cerevisiae*, que possui um largo espectro de utilização, sendo empregada na produção de pães, bebidas alcoólicas, etanol, etc. Sua biomassa pode ser recuperada como subproduto de fermentação e transformada em levedura seca, que se constitui em matéria-prima para a fabricação de ração animal ou suplemento vitamínico para o homem (PATARO et al., 1998).

2.4 – MULTIPLICAÇÃO CELULAR

A reprodução da levedura é assexuada, ocorrendo por meio de um processo denominado de gemulação ou brotamento, estando a célula madura, o núcleo se desloca

para junto da membrana celular, onde surge uma gêmula (Figura 4). O núcleo se alonga, penetrando na gêmula. Posteriormente quando a gêmula alcança o tamanho aproximado da célula mãe, o núcleo em ambas as células se divide, gerando duas células filhas. Durante os períodos de reprodução contínua, os brotos podem permanecer ligados, formando, assim, uma cadeia de células ou, eventualmente separados, formando células unicelulares ou células mãe-filha (MADRID et al., 1995; SIMPSON, 1996; NAKANO, 2000).

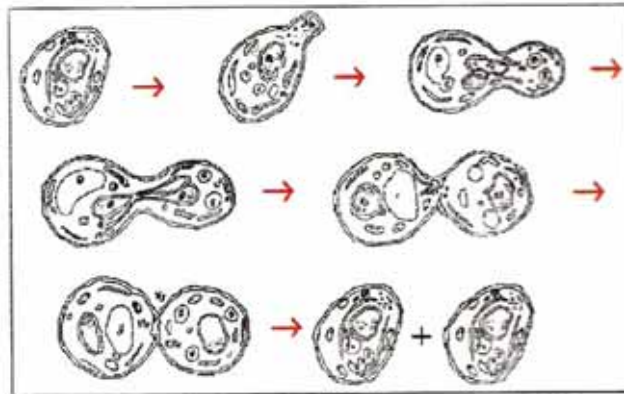


Figura 4 – Reprodução de uma célula de levedura (NAKANO, 2000).

2.5 – CRESCIMENTO CELULAR

O crescimento celular depende da capacidade da célula para utilizar os nutrientes do meio ambiente e sintetizar os compostos macromoleculares das estruturas celulares e também os principais compostos de baixo peso molecular, necessário para a atividade celular. O metabolismo intermediário inclui as reações que transformam os compostos de carbono e nitrogênio que entram na célula em novo material celular ou em produtos que são excretados. A síntese desses compostos necessita de energia e a maioria das células utilizada nas fermentações, são heterotróficas e obtém sua energia a partir da quebra de compostos orgânicos. Nos processos respiratórios ou aeróbios, os microrganismos são capazes de oxidar completamente alguns dos substratos a CO_2 e H_2O , obtendo o máximo de energia para a conversão dos substratos remanescentes em nova massa celular. No metabolismo fermentativo ou anaeróbio, as células são menos eficazes para converter os substratos orgânicos em material celular e usualmente excretam intermediários degradados parcialmente (PELCZAR et al., 1980).

Na Figura 5 temos o perfil característico do crescimento de um microrganismo unicelular. A fase A, chamada de “lag”, corresponde a uma fase de adaptação fisiológica das células ao novo meio de cultura no qual elas foram introduzidas. Nesta fase o metabolismo está ativo (sintetizando enzimas e coenzimas) de modo a criar as condições para que elas possam se dividir. Portanto, na fase “lag” as células não estão se dividindo. A fase B é conhecida como a fase exponencial de crescimento porque o número de células aumenta exponencialmente com o tempo. A fase C é a fase estacionária, onde o número de células viáveis se mantém constante, isto é, são iguais os números correspondentes às células que nascem e as que morrem. A fase D é a fase de morte, pois as condições do meio vão se tornando cada vez mais impróprias para as células sobreviverem (PELCZAR et al., 1980).

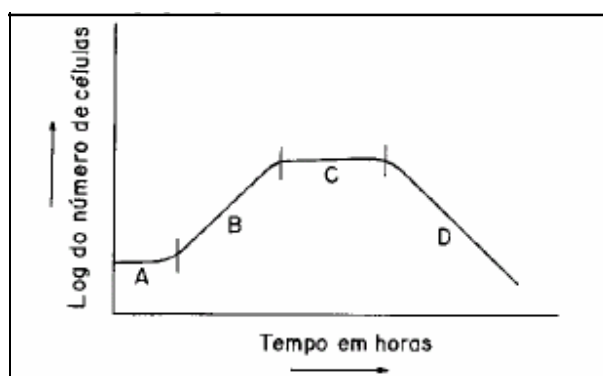


Figura 5 – Curva típica de crescimento celular. (A) fase “lag”; (B) fase exponencial de crescimento; (C) fase estacionária; (D) fase de morte (RETTORI; VOLPE, 2000).

2.6 – IMPORTÂNCIA DOS NUTRIENTES PARA A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

As leveduras são microrganismos saprófitas que exigem uma fonte de carbono elaborada – glicose ou outro açúcar – que fornece a energia química e o esqueleto carbônico de suas estruturas celulares, constituídas predominantemente de carbono, oxigênio e hidrogênio. Algumas vitaminas, como tiamina e ácido pantotênico, também são exigidas. O meio deve, igualmente, fornecer nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio, cálcio, zinco, manganês, cobre, ferro, cobalto, iodo e outros elementos em quantidades diminutas (LIMA et al., 2001).

Os micronutrientes (enxofre, magnésio, manganês, zinco, cobre, cobalto, dentre outros.) têm uma função importante no metabolismo celular, principalmente devido aos seus requerimentos como cofatores para várias enzimas (STEHLIK-TOMAS et al., 2004). Aparentemente, íons metálicos são vitais para todos os organismos, e desta forma, transportadores destes íons têm um papel crucial na manutenção da homeostase. Todavia, quantidades excessivas destes mesmos íons são tóxicos e podem causar danos às funções às quais se prestam (NELSON, 1999; COHEN et al., 2000 apud por STEHLIK-TOMAS et al., 2004). Jones & Greenfield (1984) definem as funções destes íons como: enzimática e estrutural. Na função enzimática, alguns íons são o centro catalítico de uma enzima, como um ativador ou estabilizador da função enzimática, ou mantêm controle fisiológico por antagonismo entre ativadores e desativadores. Dentre estes, Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} e Cu^{2+} são comumente centros catalíticos. A função estrutural é desempenhada pelos íons que agem neutralizando forças eletrostáticas presentes nas muitas unidades celulares aniônicas. Na maioria das vezes, K^+ e Mg^{2+} são encontrados em polifosfatos, RNA, DNA e proteínas. Segundo Lima (2001), a adição de sais minerais é vantajosa para corrigir deficiências que o caldo normalmente apresenta.

A composição elementar de uma célula microbiana depende de muitos fatores, como condições de cultivo, espécie do microrganismo, e até mesmo do substrato utilizado para seu crescimento (CARVALHO; SATO, 2001). Zinco, cobre e manganês são muito interessantes devido ao efeito positivo na atividade respiratória e na taxa de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (JONES; GADD, 1990, apud por STEHLIK-TOMAS et al., 2004).

Segundo Aiba et al. (1973), fósforo, potássio, enxofre e magnésio são os minerais mais encontrados na composição de microrganismos, e estes e outros elementos presentes em quantidades significativas devem ser suplementados ao meio de cultura. Na Tabela 2, são mostrados os constituintes inorgânicos de leveduras, segundo Aiba et al. (1973), Reed & Nagodawithana (1991) e Harrison (1971).

Tabela 2 – Constituintes inorgânicos das leveduras

Elementos (g/100g peso seco)	AIBA et al., (1973)	REED & NAGODA WITHANA (1991)	HARRISON (1971)
Fósforo	0,8 – 2,6	1,35	1,10 – 2,00
Enxofre	0,01 – 0,24	0,39	0,30 – 0,50
Potássio	1,0 – 4,0	2,1	0,90 – 3,50
Magnésio	0,1 – 0,5	0,165	0,15 – 0,50
Sódio	0,01 – 0,1	0,012	0,02 – 0,20
Cálcio	0,1 – 0,3	0,075	0,04 – 0,90
Ferro	0,01 – 0,5	0,002	0,003 – 0,10
Zinco	—	0,017	0,004 – 0,13
Cobre	0,002 – 0,01	0,0008	0,002 – 0,012
Manganês	0,0005 – 0,007	0,000002	0,0004 – 0,0035
Molibdênio	0,0001 – 0,0002	0,00004	0,000005 – 0,000009

Quanto à fonte de nitrogênio a levedura *Saccharomyces cerevisiae* utiliza esse elemento nas formas amoniacal (NH_4^+), amídica (uréia) ou amínica (na forma de aminoácidos), não tendo habilidade metabólica para aproveitar o nitrato e com pouquíssima ou nenhuma capacidade de utilizar as proteínas do meio (LIMA et al., 2001; ROITMAM et al., 1988). Sendo a principal forma a amoniacal, na ausência desta, a levedura procura outras fontes, como os aminoácidos, com isso acarreta um aumento na produção de componentes secundários, tais como os álcoois isoamílico, amílico, propílico, isopropílico, butílico, isobutílico etc.

O fósforo é absorvido na forma de íon H_2PO_4^- , forma predominante em pH 4,5, enquanto o enxofre pode ser assimilado do sulfato, sulfito ou tiosulfato. A sulfitação do caldo no processo de fabricação de açúcar, bem como o ácido sulfúrico empregado no tratamento do fermento, parecem fornecer quantidade suficiente de enxofre para a levedura, pois sua exigência desse elemento é pequena (LIMA et al., 2001).

A Tabela 3 apresenta as concentrações dos principais nutrientes minerais para uma boa fermentação alcoólica. Tais nutrientes podem já estar presentes no mosto, sendo desnecessária uma complementação entretanto, podem ocorrer tanto teores inadequados e

deficiência de alguns nutrientes como concentrações excessivas de outros (LIMA et al., 2001).

Tabela 3 – Concentrações de nutrientes minerais no mosto para se obter adequada fermentação alcoólica

Nutriente mineral	Concentração em mg/L	Nutriente mineral	Concentração em mg/L
NH ₄ ⁺	40 – 5900	Co ⁺⁺	3,5
P	62 – 560	Co ^{++**}	10
K ⁺	700 – 800	Zn ⁺⁺	0,5 – 10
Ca ⁺⁺	120	Cu ⁺⁺	7
Mg ⁺⁺	70 – 200	Mn ⁺⁺	10 – 33
SO ₄ ⁻	7 – 280	Mn ^{++*}	10 (10 – 80)
Na ⁺	200	Fe ⁺⁺	0,2

Fontes: Amorim, (1977); *Lima, (1953); **Lima, (1962).

Segundo Novaes et al. (1971 apud VASCONCELOS, 1987), a análise do caldo de cana revela que esta matéria-prima exige uma suplementação adequada de certos sais minerais para que a fermentação se processe com maior vigor, pois, embora seja rica em certos elementos, possui um desequilíbrio entre os mesmos. Um elemento importante para a qualidade do produto final é o nitrogênio amoniacal. Na ausência deste, a levedura irá metabolizar outros compostos, como os aminoácidos, cujo desdobramento resultam substâncias indesejáveis, verificando um sensível aumento no teor de álcoois superiores (NOGUEIRA & VENTURINI FILHO, 2005). O fósforo, na forma de P₂O₅, é de extrema importância para que ocorra a formação de álcool durante a fermentação. Além de favorecer a ação das leveduras, o fósforo também aumenta o rendimento alcoólico da fermentação.

A importância dos nutrientes no processo fermentativo pode ser ressaltada através de Novaes et al. (1971 apud VASCONCELOS, 1987), que afirmam que “Os sais minerais tanto sob o ponto de vista qualitativo como quantitativo, devem ser considerados, pois, certas reações enzimáticas da fermentação alcoólica podem ser favorecidas por

determinados elementos, tais como: fosfato de amônio, fosfato de cálcio, fluoreto de amônio, sulfato de magnésio, sulfato de manganês e sulfato de cobalto”.

Segundo Codistil (1978 apud VASCONCELOS, 1987), o melão apresenta uma concentração de nutrientes bem mais elevada do que os mostos de caldo de cana, porém não apresenta o nitrogênio em forma adequada para as leveduras, podendo inclusive comprometer a qualidade do álcool.

Devido à importância dos sais minerais no processo fermentativo, alguns autores descreveram as funções de alguns elementos minerais (AMORIM, 1977; SUOM ALAINE & OURA, 1971 apud VASCONCELOS, 1987): Nitrogênio é um elemento essencial para os organismos vivos, pois é um componente para a síntese de proteínas e ácidos nucléicos. As leveduras utilizam uma ampla variedade de compostos nitrogenados, porém nem todas as fontes propiciam crescimento igualmente eficiente. Fósforo é essencial para o metabolismo energético e na síntese de ácidos nucléicos. Tem importância na transformação do açúcar em álcool e na produção de ATP, tanto na glicólise como na cadeia respiratória. “Potássio atua como ativador em uma série de reações da glicólise e em outros passos do metabolismo. A quantidade de potássio absorvida pela levedura durante a fermentação é o dobro da quantidade exigida na sua multiplicação e crescimento”. Magnésio desempenha um papel importante no crescimento das leveduras como co-fator de muitas reações metabólicas. Cobre e ferro são necessários em pequenas quantidades, na fase de multiplicação e crescimento da levedura. Zinco, manganês e cobalto atuam como ativadores enzimáticos na glicólise. “Cálcio embora não seja aparentemente necessário para o crescimento de células de leveduras, ele estimula a fermentação” (AMORIM, 1977; SUOM ALAINE & OURA, 1971 apud VASCONCELOS, 1987; PEREIRA, 2007; SILVA, 2007).

O processo fermentativo pode ser inibido pelos metabólitos primários e/ou secundários produzidos pelos microrganismos, como o etanol, além de outras substâncias que podem estar presentes nos mostos. Assim, a falta ou o excesso de alguns minerais em mostos de melão ou de caldo de cana pode acarretar efeitos negativos à fermentação. Recentemente, o alumínio foi identificado como elemento estressante da levedura, em condições de fermentação industrial, acarretando queda simultânea da viabilidade e dos teores de trealose da levedura. Melões com altos teores de sulfito, proveniente da clarificação do caldo

também acarretam efeitos tóxicos à levedura, comprometendo a fermentação e aumentando a acidez do álcool obtido (LIMA et al., 2001).

Segundo Araújo (1982 apud VASCONCELOS, 1987), para a complementação de nutrientes nos mostos, deve-se levar em consideração as seguintes variáveis:

- ▲ Quantidade de nutrientes na matéria-prima;
- ▲ Tipos de nutrientes a serem adicionados ao mosto;
- ▲ Dosagem de cada nutriente a ser adicionado no mosto;
- ▲ Momento da fermentação em que deve-se adicionar os nutrientes ao mosto;
- ▲ Fontes dos nutrientes.

2.7 – COMPLEMENTAÇÃO DE NUTRIENTES NO MOSTO

O nitrogênio é um elemento essencial para multiplicação e crescimento das leveduras, como constituinte de várias substâncias orgânicas, como aminoácidos, proteínas, enzimas, purinas, piridinas, pigmentos respiratórios (citocromos), vitaminas, lecitina, cefalina, e outras (WHITE, 1954). A adição de nitrogênio na forma de nitratos não é recomendada, pois este não é assimilado pela maioria das leveduras, podendo acarretar ainda o decréscimo do teor de proteínas (MORRIS, 1958; SALGADO & SARRUGE, 1979).

Através da adição de sulfato de amônio, aos mais variados mostos, alguns autores verificaram o aumento no teor de proteínas e melhoria na multiplicação e no crescimento de diferentes gêneros de leveduras (SALGADO; SARRUGE, 1979; MASSART; HORENS, 1952; FARAH ALVES; DEL BIANCO, 1971; VAIRO; GREGORI; BORZANI, 1975; ANJOS MAGALHÃES et al., 1980; WICKERHAM, 1946).

Segundo Stuppiello & Horii (1981), os mostos de fermentação alcoólica devem conter níveis mais elevados de nitrogênio do que de fósforo, sendo da ordem de 300 – 350 ppm de N total, ocorrendo um residual da ordem de 30 a 50 ppm de N total. Já Amorim (1985), afirma que os teores de nitrogênio no mosto devem ser entre 500 e 600 ppm para uma fermentação alcoólica eficiente. De acordo com Vasconcelos (1987), a dose de nitrogênio que maximiza a eficiência de fermentação é da ordem de 0,11 g de sulfato de amônio/ litro de mosto, utilizando uma concentração inicial de 15°Brix de mosto.

O fósforo é encontrado no caldo de cana-de-açúcar na forma mineral e orgânica. A maior parte desse elemento encontra-se na forma solúvel (DELGADO; CÉSAR, 1977). Os

compostos fosfatados possuem substancial importância no processo de fabricação de açúcar (HONIG, 1969), principalmente na clarificação do caldo precipitando impurezas (KORNDORFER, 2003). No processo de clarificação o fósforo livre reage com a cal $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ formando fosfato tricálcico $[\text{Ca}(\text{PO}_4)_2]$ o qual, ao flocular e sedimentar, realiza o arraste das impurezas, que se depositam no fundo do decantador (KORNDORFER, 1990).

Segundo Honig, (1969), os teores de fosfato no caldo podem variar de 200 a 1000 mg de P_2O_5 por litro de caldo, teores de fosfato (P_2O_5) menores que 150 mg/L são considerados baixos, teores entre 150 e 500 mg/L são considerados normais e teores maiores que 500 mg/L são considerados altos. Delgado & César (1984) relatam uma variação de 70 a 800 mg de P_2O_5 por litro de caldo.

Segundo Meade (1963), Honig (1969), Delgado et al., (1973) e Delgado & César (1977) o teor necessário de fosfato (P_2O_5) no caldo para uma boa clarificação é de 300 a 350 mg/L, sendo recomendado a adição do mesmo sempre que valores inferiores a estes forem encontrados.

No colmo da cana-de-açúcar, 95% do fósforo contido se apresenta como solúvel e, portanto, passível de ser extraído por uma moenda de laboratório. As quantidades de fósforo total e inorgânico residuais no bagaço são proporcionais à do açúcar não extraído, o qual representa apenas de 2 a 4% do açúcar total da cana. Pode-se então restringir à análise do fósforo somente ao caldo extraído pela moenda (HONIG, 1960).

Os fosfatos orgânicos podem ser divididos nos seguintes grupos: fosfatos de inositol (ácido fítico), fosfatos de hexoses, nucleotídeos (compostos complexos de ácido fosfórico com carboidratos e bases purínicas ou pirimidínicas), fosfo-proteínas (ácido fosfórico combinado com hidroxiaminoácidos) e fosfolípidos. Durante o tratamento do caldo os fosfatos orgânicos tendem a se decompor, transformando-se em fosfatos inorgânicos (MALAVOLTA; HAAG, 1964 e HONIG, 1969).

A forma orgânica do fósforo ocorre numa quantidade de cerca de 10% do fósforo total (KORNDORFER, 1990). O nível de fósforo orgânico no caldo é, principalmente, função do grau de maturação da cana-de-açúcar, ou seja, em estágio de crescimento fisiológico, o teor de fósforo orgânico é mais alto, chegando a 60-70 mg/L, e em estágio de maturação, o teor de fósforo orgânico encontra-se na faixa de 25-45 mg/L (HONIG, 1960).

O fósforo absorvido pela levedura tem sua principal função relacionada com a transferência de energia na célula. Este elemento é considerado indispensável à absorção do carboidrato e a sua posterior conversão em etanol. Para uma fermentação eficiente, isto é, rápida e com alto rendimento em transformações dos açúcares redutores totais em álcool, é necessário que o mosto destinado à fermentação possua uma concentração de fósforo na faixa de 50 a 100 ppm (AMORIM, 1985).

Alguns autores realizaram fermentações com suplementação de nutrientes no mosto. Vasconcelos (1987) estudou a complementação de compostos nitrogenados e fosfatados na fermentação alcoólica em laboratório e concluiu que as doses de nitrogênio e fósforo que maximizaram a eficiência de fermentação foram 0,11g/L de sulfato de amônio e 0,11 g/L de superfosfato triplo, respectivamente. Dragone et al. (2004) investigaram diferentes fatores de fermentação de xarope de maltose no aumento da produção de etanol pela *Saccharomyces Cerevisiae*, dentre estes fatores estavam a suplementação do mosto com nutrientes (extrato de levedura, ergosterol). Esses autores concluíram que a produção de etanol aumentou com a adição dos nutrientes, porém a concentração desses nutrientes não foi avaliada. Já Pereira (2007) estudou a suplementação de diferentes fontes e concentrações de nitrogênio sobre a fermentação alcoólica na produção de cachaça, cerveja e vinho e concluiu que o maior rendimento da fermentação foi obtido pela linhagem de levedura de baixa fermentação na fonte de nitrogênio sulfato de amônio em 5g/L.

3 – JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

3.1 – JUSTIFICATIVA

O álcool é um produto obtido principalmente por fermentação alcoólica através da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Tem aplicações em diversos setores como de bebidas, médico-laboratorial, sendo mais utilizado como combustível para automóveis.

A conversão de açúcar em etanol e CO₂ envolve uma série de reações glicolíticas, as quais são influenciadas por diversos fatores: substrato, nutrientes, vitaminas, pH, temperatura e outros. Os substratos têm de ser adequados ao desenvolvimento do microrganismo e à finalidade de sua atividade, que é produzir uma determinada substância. A maioria dos substratos necessita de nutrientes como, Zn, N, Cu, P, K, e outros, para serem fermentados, proporcionando condições ideais de crescimento celular, o qual está intimamente relacionado com a formação do etanol.

Diante do exposto, este trabalho visou à complementação dos mostos de melaço e de caldo de cana com nutrientes comerciais, para possibilitar uma boa eficiência de conversão dos açúcares em etanol pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae*.

Os resultados obtidos neste estudo serão de grande importância, como subsídios em futuros trabalhos de ampliação para uma escala industrial, como também para o conhecimento científico/tecnológico da área.

3.2 – OBJETIVOS

3.2.1 – Geral

Estudar a influência da complementação de nutrientes comerciais nos mostos de melaço e de caldo de cana sobre o processo de fermentação alcoólica em batelada simples, utilizando leveduras *Saccharomyces cerevisiae*.

3.2.2 – Específicos

- Realizar ensaios preliminares de fermentação alcoólica com mostos de melaço e de caldo de cana sem adição de nutrientes a fim de determinar alguns parâmetros tais

como: tempo de fermentação alcoólica, quantidade de fermento a ser utilizada e a escolha da concentração inicial do mosto a ser complementado com nutrientes;

- Complementar os mostos de caldo de cana e melação com os nutrientes A, B e C, de modo a proporcionar uma condição ideal para o desenvolvimento da levedura;
- Avaliar o processo de fermentação alcoólica diante da complementação de nutrientes, através da eficiência e produtividade;
- Estabelecer as concentrações ideais dos nutrientes comerciais a serem adicionados nos mostos de melação e de caldo de cana.

4 – METODOLOGIA

4.1 – MATERIAIS

4.1.1 – Mosto

O melaço com aproximadamente 80°Brix proveniente da Usina Cachoeira (Maceió-AL) armazenado em reservatório de plástico de 150 L, foi diluído nas concentrações de 15, 18 e 21°Brix de modo a escolher a concentração ideal para a complementação dos nutrientes comerciais. O caldo de cana extraído com cerca de 18°Brix, clarificado por ebulição mantida por 5 minutos, esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos, foi diluído nas concentrações de 12, 14 e 16°Brix, também de modo a escolher uma concentração ideal.

4.1.2 – Microrganismo

Para a fermentação alcoólica, foram utilizadas as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* sob a forma de fermento prensado *Fleischmann* na proporção de 20g/ litro de mosto.

4.1.3 – Nutrientes

Três produtos comerciais (A, B e C) foram gentilmente doados pela QUIMATEC Produtos Químicos LTDA., foram utilizados nos ensaios para complementação de nutrientes nos mostos.

A composição química dos produtos comerciais está apresentada na Tabela 4.

Tabela 4 – Composição química dos produtos utilizados como nutrientes, de acordo com o manual do fabricante.

Composição (g/kg)	A	B	C
P ₂ O ₅	530,0	210,0	210,0
N	100,0	234,0	288,0
MgSO ₄	10,0	105,0	45,0
MnSO ₄	2,3	55,0	6,0
ZnSO ₄	2,1	15,0	6,0

4.2 – MÉTODOS

4.2.1 – Determinação do Brix Refratométrico

A determinação do Brix consiste na medida do índice de refração das soluções, e sua conversão a sólidos solúveis totais (Brix), através da utilização de refratômetro com escala de 0 a 32°Brix.

4.2.2 – Determinação do pH

A determinação do pH foi efetuada através da utilização de potenciômetro modelo Digimed DM-20.

4.2.3 – Determinação do Teor Alcoólico

O teor alcoólico foi determinado utilizando o microdestilador TECNAL, modelo TE-012. Para a destilação, 25,0 mL de amostra foram misturados com 50,0 mL de água destilada, coletando-se 50,0 mL de destilado, cuja concentração alcoólica foi determinada através de densímetro digital ANTON- PAAR, modelo DMA 4500 (SÁ, 2003).

4.2.4 – Determinação do Desprendimento de CO₂ durante a Fermentação

Para determinar o desprendimento de CO₂ as amostras foram pesadas imediatamente após acrescentar o fermento e de hora em hora até obter pesagem constante, a fim de se determinar o final da fermentação. As pesagens foram feitas em uma balança de precisão de marca METTLER TOLEDO, modelo PB8001-S.

4.2.5 – Determinação da Acidez Sulfúrica

Consiste na determinação do ponto de neutralização dos ácidos contidos na amostra utilizando solução de NaOH 0,05M, previamente padronizada, e fenolftaleína a 1% como indicador (CALDAS, 1998).

4.2.6 – Determinação dos Açúcares Redutores Totais (ART) no Mosto

A determinação da concentração dos Açúcares Redutores Totais (ART) expressa como glicose, presente nos mostos, foi realizada pelo método Eynon & Lane, utilizando um equipamento denominado REDUTEC (TECNAL, Brasil, modelo TE – 088) (Figura 6), para a titulação. Este método consiste na soma dos açúcares redutores originalmente presentes na amostra a ser analisada e os provenientes da hidrólise da sacarose (VASCONCELOS, 2000).



Figura 6 – Equipamento utilizado na titulação de ART (REDUTEC)

4.2.7 – Determinação dos Açúcares Redutores Totais (ART) no Vinho

A concentração dos Açúcares Redutores Totais (ART) expressa como glicose, presente nos vinhos, foi determinada utilizando o método espectrofotométrico de Somogyi-Nelson. Este método baseia-se na redução estequiométrica do Cu^{+2} a Cu^{+1} , com formação de óxido cuproso (Cu_2O), o qual forma um complexo corado com o agente cromogênico, enquanto o açúcar é oxidado a ácido orgânico. O Cu^{+1} é, então, complexado com o reativo de Nelson (arsenomolibdato) que tem um cromóforo, produzindo uma coloração azul cuja intensidade de cor é proporcional a quantidade de açúcares redutores existentes e a absorvância é determinada em espectrofotômetro a 540 nm. A concentração de ART é

obtida através de uma curva padrão utilizando soluções de concentrações rigorosamente conhecidas (VASCONCELOS, 2000).

4.2.8 – Experimentos fermentativos

Ensaio de fermentação alcoólica foram conduzidos em modo batelada simples com mostos de melaço (15, 18 e 21°Brix) e mosto de caldo de cana (12, 14 e 16°Brix) sem correção de pH, fermentando em Erlenmeyers de 1000 mL, em agitador rotatório com controle de agitação (200 rpm) e temperatura ($\pm 32^{\circ}\text{C}$), retirando amostras no início e no final da fermentação, para então estabelecer alguns parâmetros iniciais de processo, tais como tempo de fermentação, quantidade de células e a concentração ideal de mosto de melaço e caldo de cana para complementar com nutrientes. Os experimentos de fermentação foram realizados no Laboratório de Derivados da Cana-de-Açúcar (LDCA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

Os ensaios de fermentação alcoólica complementando com formulações comerciais de nutrientes também foram conduzidos em batelada simples em câmara incubadora rotativa (Figura 7) com controle de agitação (200 rpm) e temperatura ($\pm 32^{\circ}\text{C}$), utilizando-se Erlenmeyers de 1000 mL de volume total com cerca de 500 mL de volume de mosto de caldo de cana a 14°Brix e mosto de melaço a 15°Brix. Nos ensaios, foi feita uma correção do pH do mosto de melaço com H_2SO_4 concentrado para obter pH 4,5 de modo a reduzir a formação de glicerol, ao mesmo tempo em que reduz a contaminação bacteriana. Os mostos de caldo de cana fermentam sem correção de acidez, em pH natural em torno de 4,7.

O caldo de cana adquirido em comércio local foi previamente clarificado por ebulição mantida por 5 minutos, resfriado até a temperatura ambiente seguindo da retirada das impurezas flotadas com uma peneira de malha fina. Este meio foi posteriormente diluído a 14°Brix, esterilizado a 121°C por 15 minutos e suplementado com os nutrientes comerciais.

Amostras de mosto e vinho foram retiradas para a realização das análises físico-químicas pertinentes.



Figura 7 – Agitador rotatório tipo “Shaker” com controle de agitação e temperatura

Para cada formulação utilizada foi realizado um ensaio chamado de branco apenas com o mosto correspondente, sem nenhuma complementação para efeito de comparação. Porém antes da complementação com os nutrientes comerciais, amostras de mosto de caldo de cana a 14°Brix e o mosto de melação a 15°Brix foram analisadas no Laboratório da Central Analítica (Maceió-AL), realizando primeiramente uma digestão nítrica-perclórica nas amostras para posterior determinação da concentração dos micro e macronutrientes: nitrogênio, fósforo, sódio, cálcio, magnésio, potássio, ferro, zinco, cobre e manganês através de um equipamento de absorção atômica. Os nutrientes comerciais utilizados na complementação foram acrescentados três a seis níveis de concentração, tomando-se como ponto central dados encontrados na literatura, os cálculos desses níveis testados, podem ser visualizados nos apêndices B1 a B6. O desempenho das fermentações alcoólicas utilizando nutrientes comerciais foi avaliado quanto a maximização dos valores de eficiência de fermentação e de processo, produtividade e rendimento no processo de produção de etanol.

4.2.9 – Parâmetros de fermentação

A partir dos resultados obtidos das determinações analíticas do mosto inicial e mosto fermentado, foram realizados os cálculos dos seguintes parâmetros de fermentação, utilizando as equações de (1) a (6) (RIBEIRO; HORII, 1999).

Açúcar consumido:

$$S = -(S_f - S_0) \quad (1)$$

Onde:

S = açúcar consumido (g de glicose/L);

S_f = concentração final de açúcares (g de glicose/L); → ART_{final}

S₀ = concentração inicial de açúcares (g de glicose/L). → ART_{inicial}

- Etanol produzido:

$$P = P_f - P_i \quad (2)$$

Onde:

P = etanol produzido (g/L);

P_f = concentração de etanol final (g/L);

P_i = concentração de etanol inicial (g/L) = 0.

- Fator de conversão de substrato em etanol:

$$Y_{P/S} = \frac{P}{S} \quad (3)$$

Onde:

Y_{P/S} = Fator de conversão de substrato em etanol (g/g).

- Produtividade em etanol:

$$PR = \frac{P}{t} \quad (4)$$

Onde:

PR = produtividade em etanol (g/L.h),

t = tempo de fermentação (h).

- Eficiência de fermentação ($\eta_b(\%)$), com base no rendimento teórico proveniente da equação de Gay-Lussac ($0,511 \text{ g etanol} \cdot 1 \text{ g glicose}^{-1}$):

$$\eta_b(\%) = \frac{Y_{P/S}}{0,511} \times 100 \quad (5)$$

- Eficiência de processo ($\eta_p(\%)$), com base na concentração inicial de açúcar S_0 .

$$\eta_p(\%) = \frac{P_f}{0,511 \times S_0} \times 100 \quad (6)$$

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – CARACTERIZAÇÃO DOS MEIOS DE FERMENTAÇÃO

Para verificar a composição dos mostos para fermentação, foram realizadas as determinações dos teores de nitrogênio, fósforo, sódio, cálcio, magnésio, potássio, ferro, zinco, cobre e manganês. Estes valores estão demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5 – Concentrações dos macro e micronutrientes encontrados no mosto de melão a 15°Brix e no mosto de caldo de cana a 14°Brix.

COMPONENTES	AMOSTRAS	
	Mosto de melão 15°Brix	Mosto de caldo de cana 14°Brix
SÓDIO – Na (%)	0,014	0,011
CÁLCIO – CÁO (%)	0,060	0,016
MAGNÉSIO – MgO (%)	0,048	0,011
POTÁSSIO – K ₂ O (%)	0,519	0,065
NITROGÊNIO – N (%)	0,166	0,022
FÓSFORO – P ₂ O ₅ (%)	0,141	0,015
FERRO – Fe (ppm)	48,7	38,6
ZINCO – Zn (ppm)	4,4	3,6
COBRE – Cu (ppm)	10,8	6,3
MANGANÊS – Mn (ppm)	2,0	3,2

Comparando-se os dados presentes na Tabela 5 com as pesquisas feitas na literatura (Tabela 1), notou-se que os macronutrientes mais importantes e mais deficientes nos mostos são o fósforo e o nitrogênio. Como já era esperado, o melão tem quantidades desses nutrientes superiores em relação ao caldo de cana. Desta forma, este último deve receber uma complementação mineral maior.

5.2 – EXPERIMENTOS FERMENTATIVOS SEM ADIÇÃO DE NUTRIENTES

Os resultados obtidos a partir de mosto de melão e mosto de caldo de cana sem adição de nutrientes foram conduzidos em batelada simples a fim de determinar alguns parâmetros iniciais de fermentação. O principal parâmetro analisado foi a concentração inicial de sólidos solúveis, em especial a sacarose, presente nos mostos e verificou-se qual destas concentrações maximizava a eficiência de fermentação. Para o mosto de caldo de cana foram testadas três concentrações iniciais 12, 14 e 16°Brix e para o mosto de melão foram testadas as concentrações de 15, 18 e 21°Brix. Os resultados desses experimentos podem ser visualizados nas Figuras 8 a 15 e com maiores detalhes nas Tabelas A1 a A8 (Apêndice). As Figuras 8 e 9 mostram os valores de ART residual (g/L) e etanol produzido (g/L) nas três concentrações do mosto de melão e de caldo de cana, respectivamente.

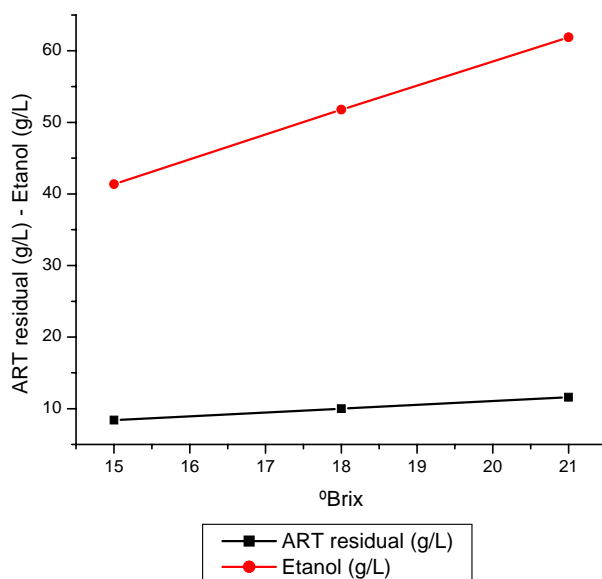


Figura 8 – Valores de ART residual (g/L) e Etanol produzido (g/L) para os ensaios com mosto de melão contendo diferentes concentrações de açúcares.

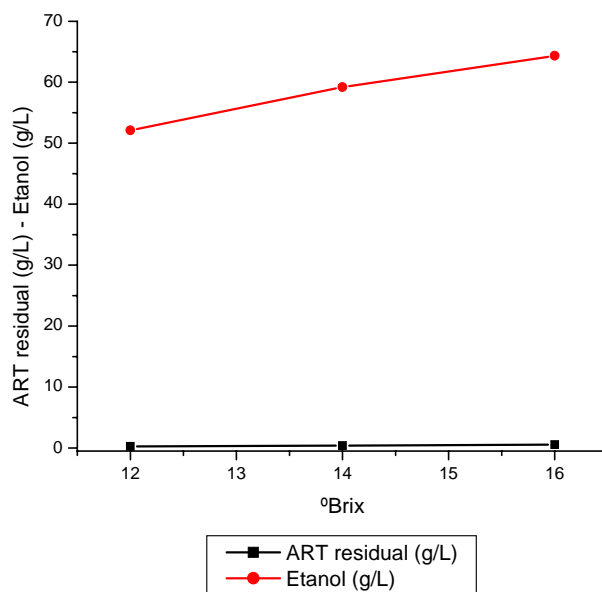


Figura 9 – Valores de ART residual (g/L) e Etanol produzido (g/L) para os ensaios com mosto de caldo de cana contendo diferentes concentrações de açúcares.

Através da Figura 8, verifica-se que o mosto de melação a 15°Brix proporcionou melhor aproveitamento pela levedura pois, apesar da menor quantidade de etanol produzida, apresentou maior eficiência fermentativa. O mesmo ocorreu para o caso do mosto de caldo em relação ao Brix de 14g/100g, que apresentou concentração intermediária de etanol, porém com maior eficiência de fermentação.

Com relação ao mosto de caldo de cana, as leveduras consumiram praticamente quase todo açúcar do meio, restando apenas traços de açúcar residual. A produção de álcool foi maior à medida que se aumentou o Brix. As Figuras 10 e 11 mostram a eficiência de fermentação e de processo para o mosto de melação e de caldo de cana, respectivamente.

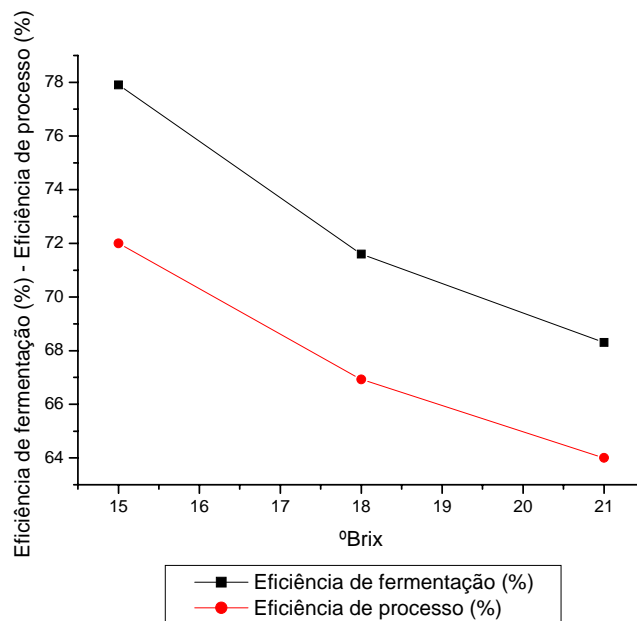


Figura 10 – Valores de Eficiência de fermentação $\eta_b(\%)$ e Eficiência de processo $\eta_p(\%)$ para os ensaios com mosto de melaço contendo diferentes concentrações de açúcares.

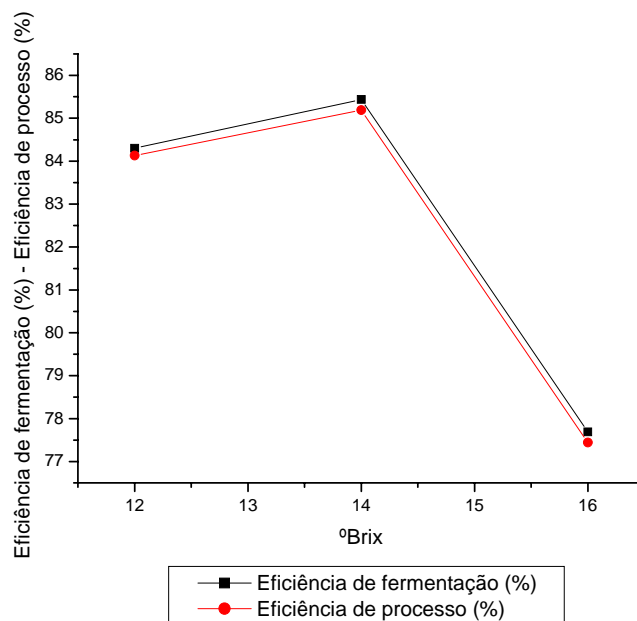


Figura 11 – Valores de Eficiência de fermentação $\eta_b(\%)$ e Eficiência de processo $\eta_p(\%)$ para os ensaios com mosto de caldo de cana contendo diferentes concentrações de açúcares.

Observando as Figuras 10 e 11, tem-se que a concentração de 15°Brix de mosto de melação e 14°Brix de mosto de caldo de cana proporcionaram maiores eficiências de fermentação e de processo, porque o álcool produzido e outros componentes provavelmente não foram suficientes para uma inibição significativa da fermentação.

As Figuras 12 e 13 mostram a produtividade em etanol para os mostos de melação e caldo de cana, respectivamente. Analisando estas Figuras pode-se observar que o mosto de melação a 15°Brix apresentou produtividade 4,87g/L.h (41,36 g/L, com tempo de fermentação 8,5 h) e o mosto de caldo de cana a 14°Brix apresentou produtividade 5,64g/L.h (59,2 g/L, com tempo de fermentação 10,5 h).

A variação do pH com o Brix do mosto está mostrada na Figura 14 para o mosto de melação e na Figura 15 para o mosto de caldo de cana. Analisando as Figuras 14 e 15 verificou-se em relação ao pH que os mostos de melação (15, 18 e 21°Brix) e de caldo de cana (12, 14 e 16°Brix) permaneceram numa faixa irregular, o que provavelmente pode ser explicado por variações nas respectivas leituras no potenciômetro, causada por oscilações na corrente elétrica.

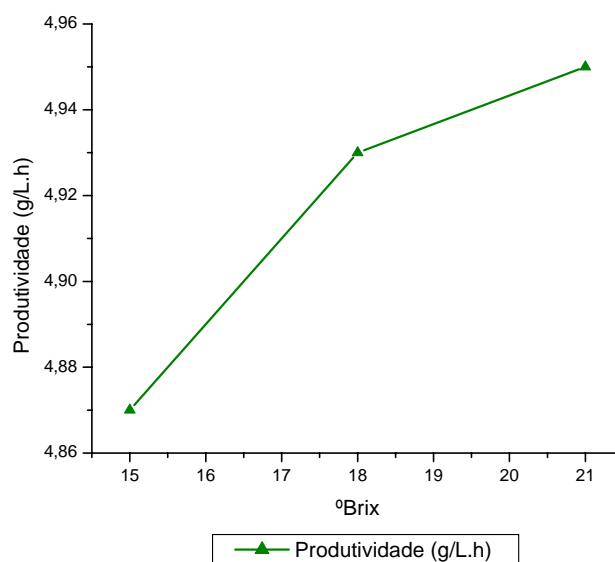


Figura 12 – Valores de Produtividade (g/L.h) para os ensaios com mosto de melação contendo diferentes concentrações de açúcares.

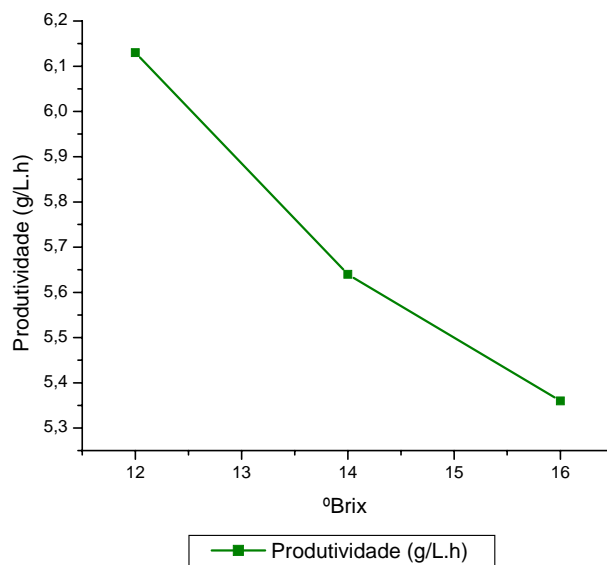


Figura 13 – Valores de Produtividade (g/L.h) para os ensaios com mosto de caldo de cana contendo diferentes concentrações de açúcares.

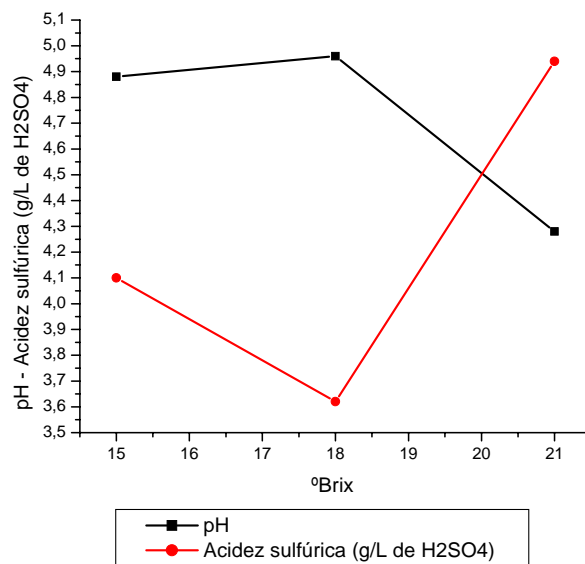


Figura 14 – Valores de pH e acidez sulfúrica (g/L de H₂SO₄) para os ensaios com mosto de melação contendo diferentes concentrações de açúcares.

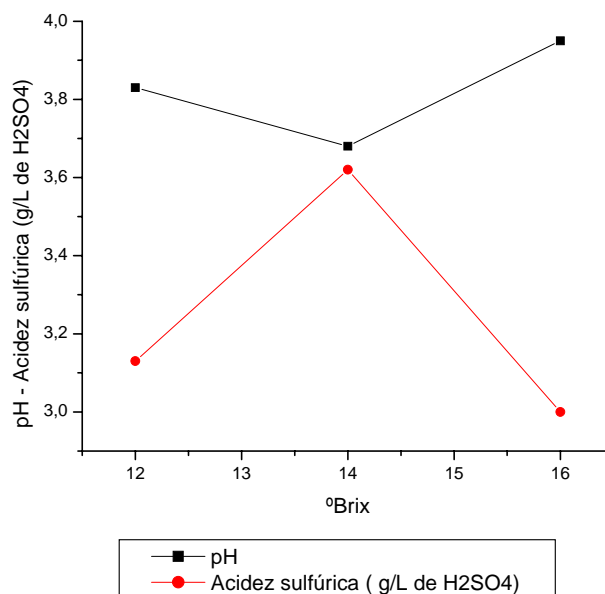


Figura 15 – Valores de pH e acidez sulfúrica (g/L de H₂SO₄) para os ensaios com mosto de caldo de cana contendo diferentes concentrações de açúcares.

Portanto, como o mosto de melação a 15°Brix e o mosto de caldo de cana a 14°Brix apresentaram maiores eficiências, estes meios, nestas concentrações, foram complementados com os nutrientes comerciais, de modo a aumentar tais eficiências e concomitantemente reduzir a formação dos metabólitos secundários.

5.3 – EXPERIMENTOS FERMENTATIVOS COM COMPLEMENTAÇÃO DE NUTRIENTES

5.3.1 – Fermentação com mosto de melação a 15°Brix

Levando em consideração os nutrientes presentes no mosto de melação a 15°Brix (Tabela 5) adicionaram-se os nutrientes comerciais A (0,05; 0,10; 0,20; 0,30; 0,40 e 0,50 g/L), B (0,10; 0,30; 0,50 e 0,70 g/L) e C (0,10; 0,30; 0,50 e 0,70 g/L) de modo a manter o suprimento de alguns elementos essenciais às atividades da levedura, estabelecendo assim a concentração do nutriente que aumentou as eficiências de fermentação e de processo. Todos os ensaios apresentados foram realizados nas seguintes condições (média de 2 ensaios em períodos distintos): mosto a 15°Brix, pH = 4,5 e ART = 112,4 g/L, temperatura

$\pm 32^{\circ}\text{C}$ e agitação 200 rpm. Estão apresentados graficamente nas Figuras 16 a 27, pela facilidade de visualização, quando se comparam os dados obtidos com as diferentes concentrações avaliadas. Os dados são mostrados nas Tabelas A9 a A14, apresentadas no apêndice. Nas Figuras 16, 17 e 18 estão apresentados graficamente os valores de ART residual (g/L) e etanol produzido (g/L) nos ensaios de complementação do mosto de melação com os nutrientes A, B e C, respectivamente.

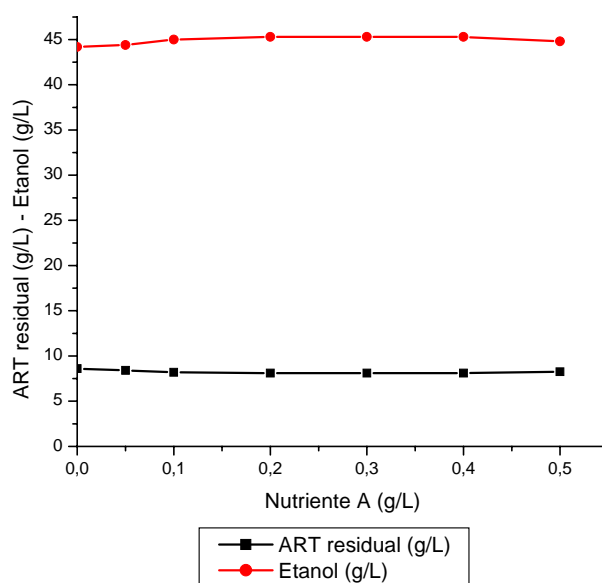


Figura 16 – Etanol produzido e ART residual, obtidos após a fermentação com mosto de melação em batelada simples complementado com o nutriente comercial A.

Observando-se a Figura 16, à medida que aumentou a concentração do nutriente A houve acréscimo na formação de etanol até a concentração de 0,20 g/L de A no meio de fermentação. Dessa concentração até 0,40, nota-se estabilização do etanol, porém em concentrações superiores à de 0,40 g/L de A ocorre um decréscimo na formação de etanol, provavelmente por causa de inibição do microrganismo pelo próprio etanol e por outras substâncias, consideradas como metabólicos secundários tais como: ácido succínico, álcoois superiores, glicerol, etc.

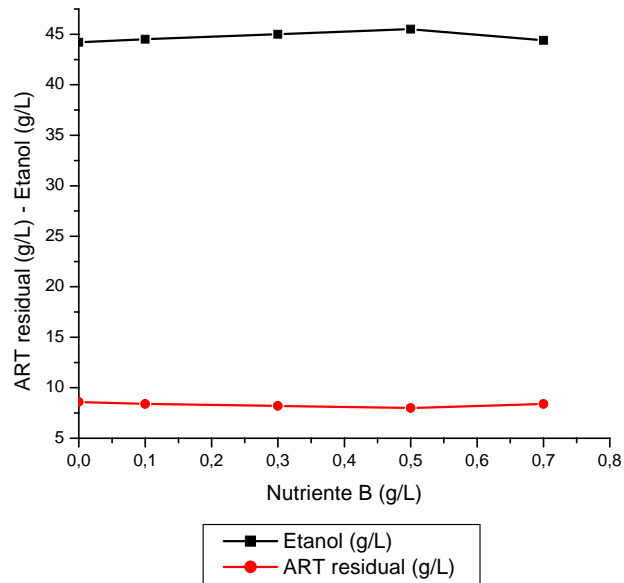


Figura 17 – Etanol produzido e ART residual, obtidos após a fermentação com mosto de melão em batelada simples complementado com o nutriente comercial B.

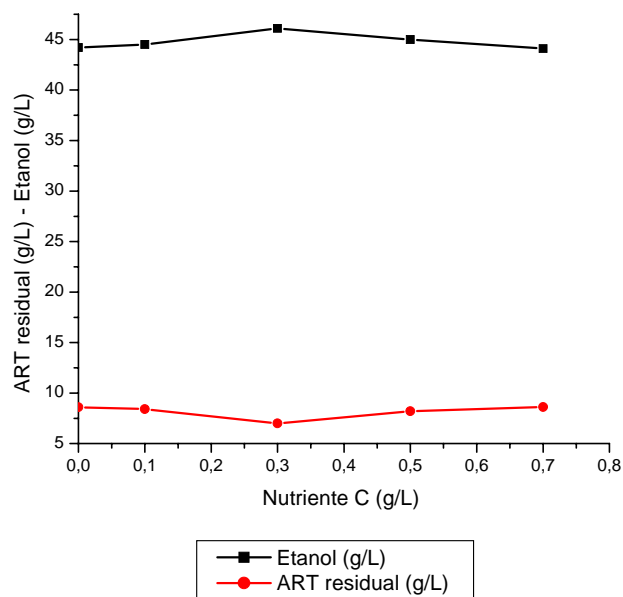


Figura 18 – Etanol produzido e ART residual, obtidos após a fermentação com mosto de melão em batelada simples complementado com o nutriente comercial C.

A Figura 17 demonstra os resultados obtidos de Etanol produzido e ART residual utilizando o nutriente comercial B. Notou-se então, que a concentração de 0,50 g de B/litro de mosto proporcionou maior formação de etanol. Concentração esta maior que a concentração ideal de A, ou seja, analisando as composições dos nutrientes A e B, verificou-se que o elemento presente nas composições desses dois nutrientes comerciais com maior diferença de doses é o fósforo, que é um elemento considerado de grande importância na transformação do açúcar em álcool e na produção de ATP.

Portanto, como o nutriente A tem mais fósforo, pelos resultados obtidos podem ser usadas quantidades menores, entre 0,2 e 0,4 g/L, para obter uma eficiência de 78,9%, próxima a do nutriente B, cuja eficiência é de 79,2%. Já na Figura 18, a concentração de C que proporcionou maior concentração de etanol, foi a de 0,30 g de C/ litro de mosto, concentração esta menor que a concentração ideal do nutriente B, devido à diferença de dose de nitrogênio (Nutriente C: 288 g de nitrogênio/kg e o Nutriente B: 234 g de nitrogênio/kg) presente nas composições dos nutrientes comerciais, motivo este o que pode ter contribuído para essa diferença de taxas ideais dos nutrientes comerciais, ou seja, apesar do nutriente C ter quantidades menores dos micronutrientes ($MgSO_4$: 6g/kg, $MnSO_4$: 6 g/kg, $ZnSO_4$: 45 g/kg) do que o nutriente B ($MgSO_4$: 105 g/kg, $MnSO_4$: 55 g/kg, $ZnSO_4$: 15 g/kg), o elemento que provavelmente influenciou na diferença do etanol produzido, utilizando 0,50 g de B/litro de mosto e 0,30 g de C/ litro de mosto foi o nitrogênio.

Com relação ao açúcar residual, observou-se que, quanto menor os ART remanescentes no final da fermentação, maior foi a concentração de etanol produzido no meio fermentativo. Como consequência houve maior conversão de ART para produção de etanol.

Os dados de avaliação da eficiência da fermentação alcoólica utilizando os nutrientes comerciais A, B e C, podem ser observados nas Figuras 19, 20 e 21, respectivamente. São apresentados dois tipos de eficiência. A primeira, denominada de eficiência fermentativa ou de fermentação $\eta_b(\%)$, os cálculos são feitos considerando-se os açúcares efetivamente consumidos e é, portanto, maior que a eficiência do processo fermentativo $\eta_p(\%)$ que tem como base de cálculo os açúcares adicionados e, portanto, seu valor é menor que o anterior.

Analisando os resultados das eficiências de fermentação e de processo, pôde-se observar que as concentrações do nutriente comercial A que mais supriram as deficiências do meio favorecendo o desenvolvendo da levedura e, portanto, aumentando tais eficiências

foram as de 0,20, 0,3 e 0,4 g de A/L de mosto. Por razões econômicas, a melhor é 0,2g/L. Enquanto que utilizando o nutriente B no mosto, nota-se que a concentração que proporcionou maiores eficiências foi 0,50 g de B/litro de mosto. Utilizando taxas crescentes a de 0,50 g de B/litro de mosto, começa a haver comprometimento do metabolismo da levedura, evidenciado provavelmente pela menor produção de etanol. Por razões semelhantes, fica estabelecida que a concentração do nutriente C seja 0,30 g de C/litro de mosto.

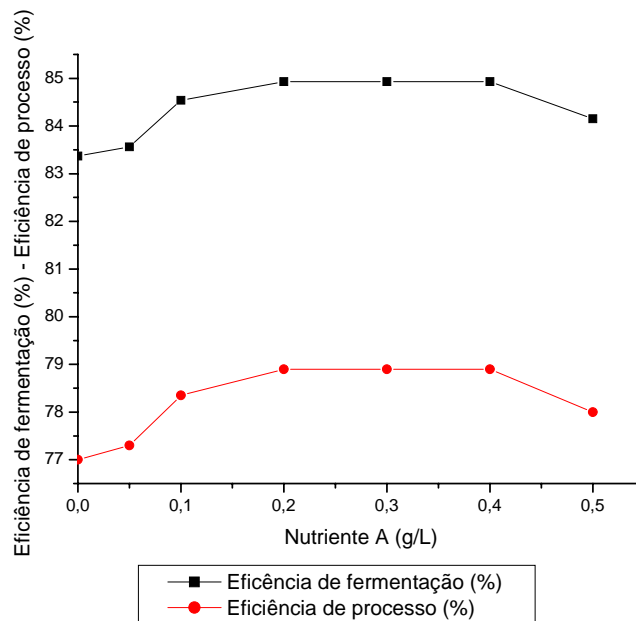


Figura 19 – Eficiência de fermentação $\eta_b(\%)$ e Eficiência de processo $\eta_p(\%)$, em função da complementação do nutriente comercial A, em ensaios conduzidos com mosto de melão.

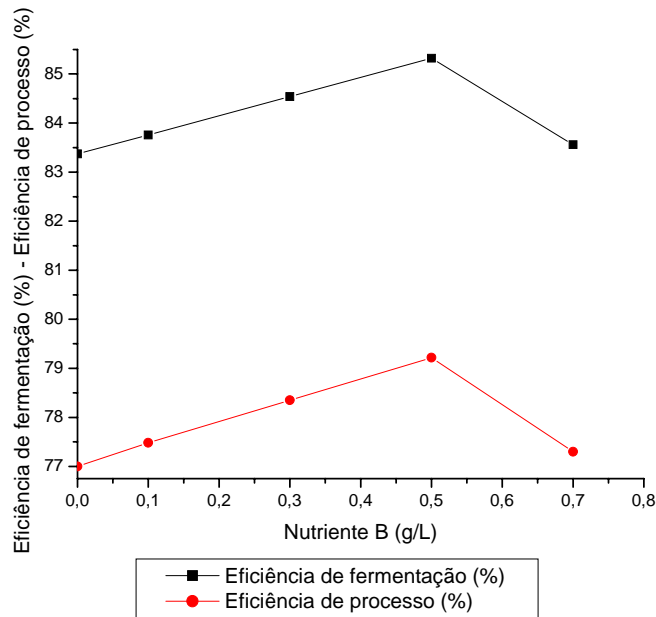


Figura 20 – Eficiência de fermentação η_b (%) e Eficiência de processo η_p (%), em função da complementação do nutriente comercial B, em ensaios conduzidos com mosto de melaço.

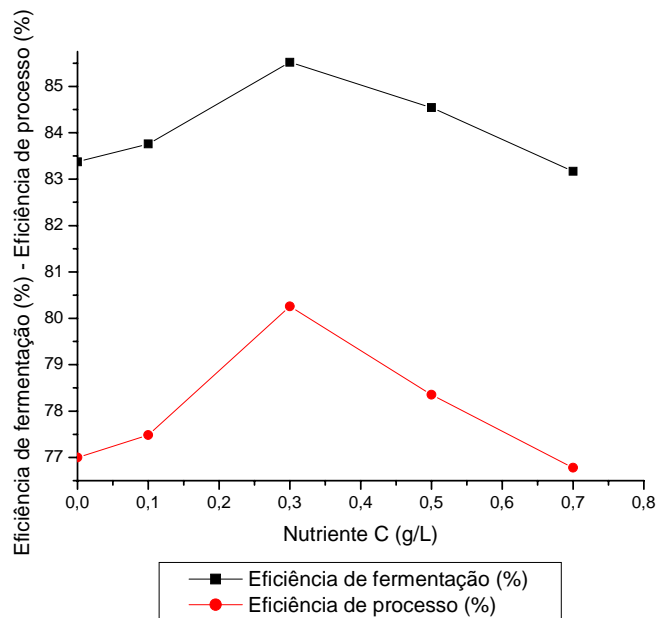


Figura 21 – Eficiência de fermentação η_b (%) e Eficiência de processo η_p (%), em função da complementação do nutriente comercial C, em ensaios conduzidos com mosto de melaço.

Outro parâmetro avaliado foi a produtividade, que representa a produção de etanol por unidade de volume na unidade de tempo. Esses resultados estão apresentados nas Figuras 22, 23 e 24 utilizando os nutrientes comerciais A, B e C, respectivamente.

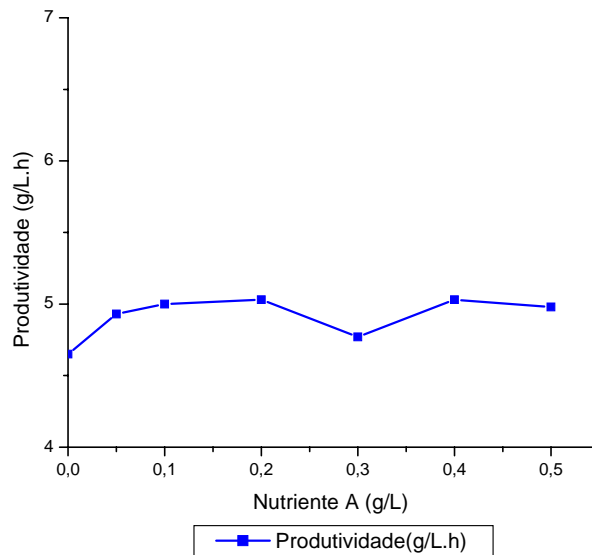


Figura 22 – Produtividade (g/L.h), em função da complementação do nutriente comercial A, em ensaios conduzidos com mosto de melaço em batelada simples.

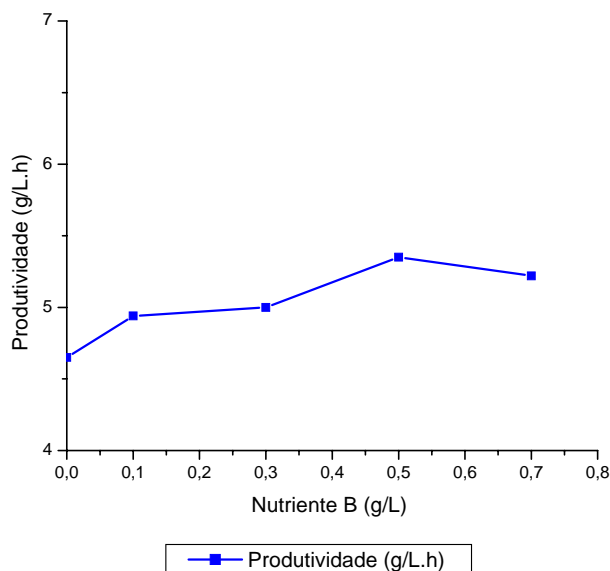


Figura 23 – Produtividade (g/L.h), em função da complementação do nutriente comercial B, em ensaios conduzidos com mosto de melaço em batelada simples.

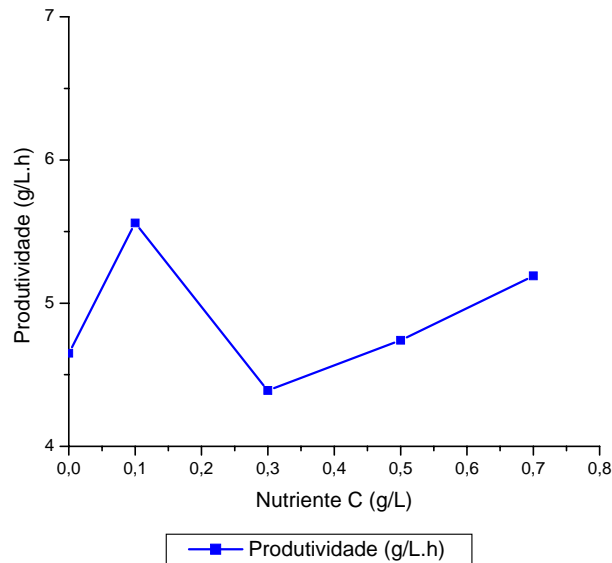


Figura 24 – Produtividade (g/L.h), em função da complementação do nutriente comercial C, em ensaios conduzidos com mosto de melação em batelada simples.

As produtividades (g/L.h) em função da concentração do nutriente comercial A podem ser observadas na Figura 22, onde fica evidente que complementando o meio com 0,20 g de A/litro de mosto ou 0,40 g de A/litro de mosto há maior produção de etanol levando em torno de 9 h de processo (PR = 5,03 g/L.h). Analisando a complementação com 0,30 g de A/litro de mosto, apesar de a concentração de etanol ter sido a mesma dos outros níveis de nutriente, a produtividade foi menor, pelo fato de o tempo de fermentação ter sido 30 minutos maior que nos outros níveis.

Complementando-se o meio de fermentação com o nutriente B, pode-se observar na Figura 23, que a concentração do nutriente que proporcionou maior produtividade em etanol foi a de 0,50 g de B/litro de mosto levando em torno de 8,5 h de processo fermentativo (PR = 5,35 g/L.h). Na Figura 24, observou-se que a complementação com nutriente C, na concentração de 0,10 g de C/litro de mosto, a produtividade foi de 5,56 g/L.h, ou seja, produziu 44,5 g/L de etanol em 8 h de processo e na concentração de 0,30 g de C/litro de mosto a produtividade foi de 4,39 g/L.h, ou seja, obteve-se 46,1 g/L de etanol em 10,5 h de processo. Então, apesar de ter obtido maior produtividade com 0,10 g de C/L,

na concentração de 0,3 g de C/L obteve-se maiores eficiência de fermentação e produção de etanol.

O pH é importante nas fermentações alcoólicas industriais por causa de sua atuação no controle de bactérias contaminantes e seu efeito sobre as taxas de fermentação, de formação de subprodutos e de crescimento das leveduras (JONES et al., 1981; BUZAS et al., 1989).

Segundo Novaes et al. (1971), uma boa fermentação, para um mesmo tipo de mosto de uma determinada matéria-prima, a acidez final é maior do que a inicial de 30 a 50%; aumentos maiores que esta ordem indicam ocorrência de infecções.

Os valores de pH e acidez sulfúrica no final da fermentação complementando-se o mosto de melaço com diferentes concentrações dos nutrientes comerciais A, B e C, podem ser visualizados graficamente na Figura 25.

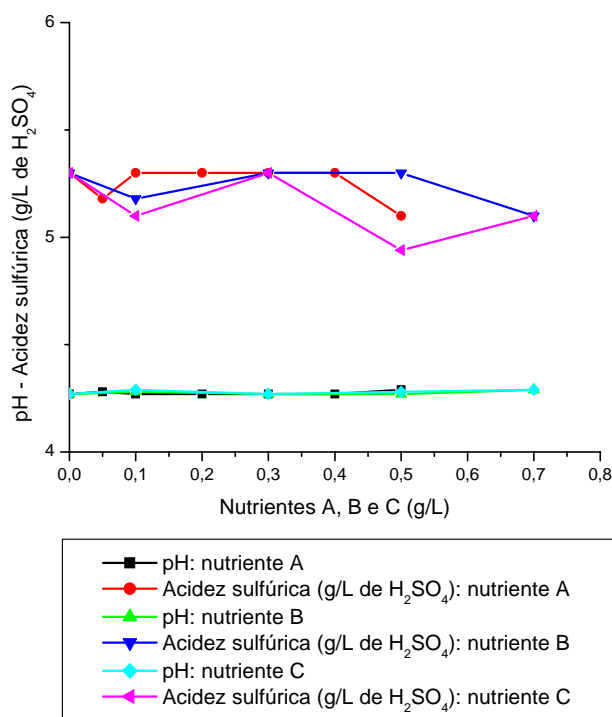


Figura 25 – Variação da acidez sulfúrica e pH, em função da complementação dos nutrientes comerciais A, B e C, em ensaios conduzidos com mosto de melaço em batelada simples.

Na Figura 25, pode-se observar que os resultados de pH e acidez são normais nas condições de fermentação comentadas anteriormente. Por outro lado, a diferença entre o pH inicial (4,5) e o pH do vinho não mostrou diferença significativa em virtude do elevado poder tamponante do melãoço.

A Figura 26 mostra o efeito comparativo dos três nutrientes comerciais em termos de eficiência de fermentação e eficiência de processo na fermentação para mosto de melãoço a 15°Brix, e a Figura 27 mostra essa comparação em termos de produtividade para cada nutriente.

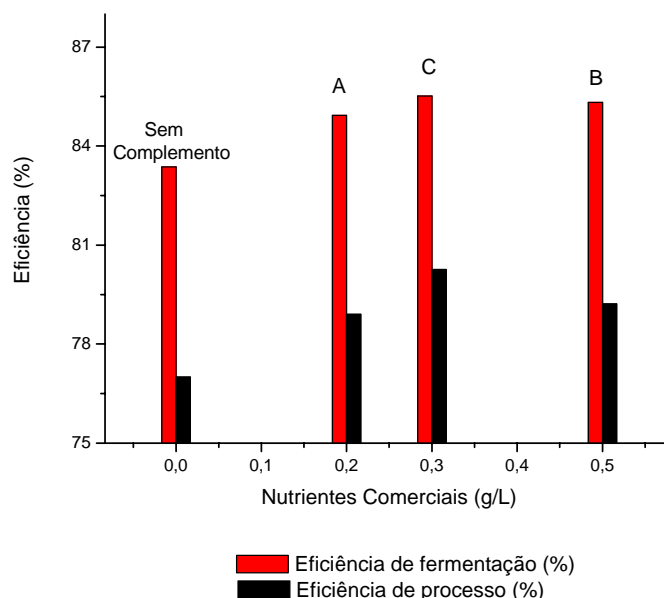


Figura 26 – Comparação entre as eficiências de fermentação e de processo nas concentrações ideais dos nutrientes comerciais A, B e C adicionados ao mosto de melãoço.

Verificou-se que utilizando o nutriente comercial C para complementação do mosto de melãoço as eficiências de fermentação e de processo aumentaram cerca de 2,6% e 4,24%, respectivamente, aumento este maior que o verificado utilizando os outros dois nutrientes comerciais. A ação do nutriente comercial C, deve-se, provavelmente, ao fato da maior quantidade de nitrogênio (288 g/Kg) presente em sua composição. Verificou-se ainda

que as eficiências obtidas utilizando os nutrientes comerciais B e C são próximas, pois a composição de nitrogênio nesses nutrientes diferem pouco um do outro.

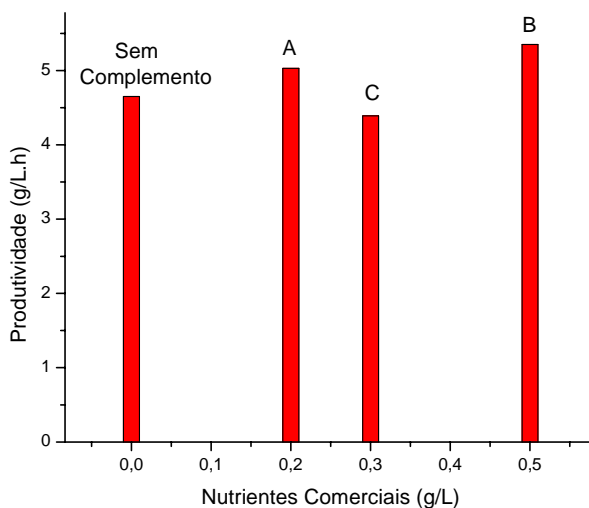


Figura 27 – Comparação entre as produtividades do processo nas concentrações ideais dos nutrientes comerciais A, B e C adicionados ao mosto de melação.

Com relação à produtividade, notou-se que, utilizando 0,20 g de A/L de mosto obteve-se produtividade de 5,03 g/L.h, ou seja, produziu-se 45,3 g/L de etanol em 9 h de processo e na concentração de 0,50 g de B/L de mosto a produtividade foi de 5,35 g/L.h, ou seja, produziu-se 45,5 g/L de etanol em 8,5 h de processo; na concentração de 0,30 g de C/L de mosto a produtividade foi de 4,39 g/L.h, ou seja, produziu-se 46,1 g/L de etanol em 10,5 h de processo. Então, apesar de que com o nutriente B ter-se constatado maior produtividade, com o nutriente C obteve-se maior quantidade de etanol produzido. Então complementando o mosto de melação a 15°Brix com 0,30 g do nutriente C/L, tornaria mais conveniente para o processo, por ter obtido maior eficiência e etanol produzido.

5.3.2 – Fermentação com mosto de caldo de cana a 14°Brix

Com base nos dados da composição química do mosto de caldo de cana a 14°Brix, observada na Tabela 5, foram realizadas complementações com os nutrientes comerciais A (0,50; 1,00 e 2,00 g/L), B (0,50; 1,00; 2,00; 3,00; 4,00 e 5,00 g/L) e C (0,50; 1,00; 2,00;

3,00; 4,00 e 5,00 g/L) cedidos pela QUIMATEC Produtos Químicos LTDA, com suas respectivas composições em termos de N, P, Mg, Mn e Zn.

Todos os ensaios apresentados foram realizados nas seguintes condições (média de 2 ensaios em períodos distintos): mosto a 14°Brix, pH = 4,7 e ART = 136 g/L, temperatura \pm 32°C e agitação 200 rpm. Estão apresentados graficamente nas Figuras 28 a 39, pela facilidade de visualização, quando se comparam os dados obtidos com as diferentes concentrações avaliadas. Os dados são mostrados nas Tabelas A15 a A20, apresentadas no apêndice.

Nas Figuras 28, 29 e 30 estão apresentados graficamente os valores de ART residual (g/L) e etanol produzido (g/L) nos ensaios de complementação do mosto com os nutrientes A, B e C, respectivamente.

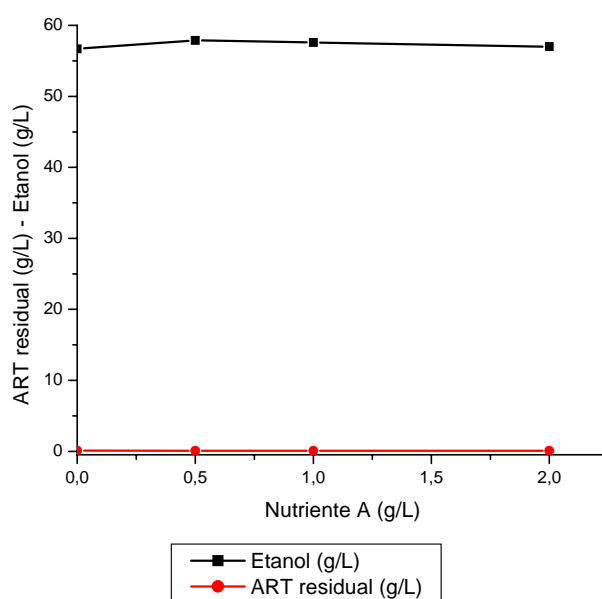


Figura 28 – Variação do etanol produzido e ART residual, em função da complementação do nutriente comercial A, em ensaios conduzidos com mosto de caldo de cana.

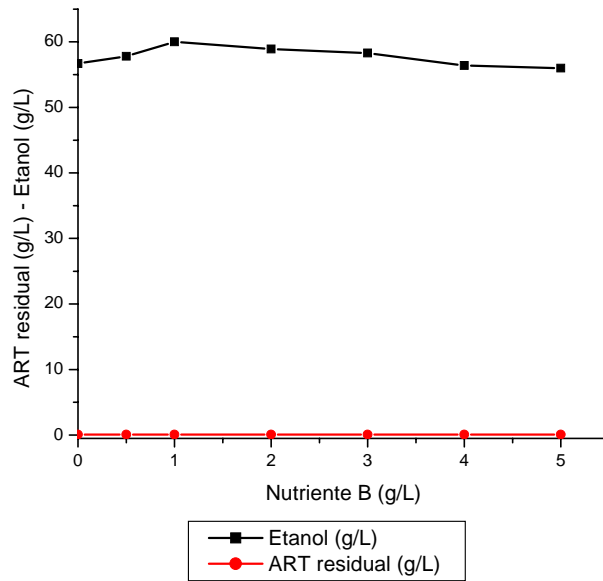


Figura 29 – Variação do etanol produzido e ART residual, em função da complementação do nutriente comercial B, em ensaios conduzidos com mosto de caldo de cana.

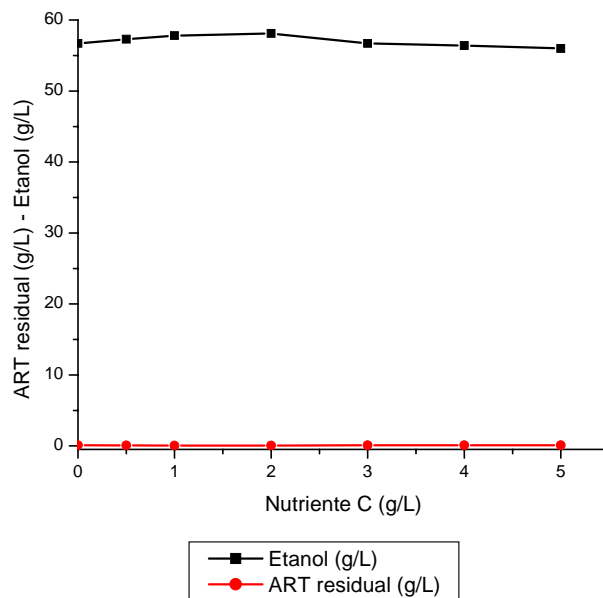


Figura 30 – Variação do etanol produzido e ART residual, em função da complementação do nutriente comercial C, em ensaios conduzidos com mosto de caldo de cana.

Observando-se a Figura 28, nota-se que complementando o mosto de caldo de cana com o nutriente comercial A na concentração de 0,50 g de A/litro de mosto, há aumento no teor alcoólico com relação ao mosto sem complementação, porém em valores acima dessa concentração observou-se um decréscimo na concentração de etanol, o que provavelmente tenha sido proveniente da inibição da levedura pelo próprio etanol produzido e até mesmo os componentes secundários que se formam durante o processo fermentativo. Algo semelhante acontece complementando o meio com o nutriente comercial B, onde observou-se que utilizando a concentração de 1 g de B/litro de mosto, a quantidade de etanol produzido foi maior, em concentrações superiores a esta houve diminuição na produção de etanol (Figura 29). Já na Figura 30, notou-se que a concentração de 2 g de C/litro de mosto proporcionou maior obtenção de etanol havendo um decréscimo em concentrações superiores a esta. Com relação aos Açúcares Redutores Totais (ART) no final do processo, notou-se o aproveitamento quase que total da levedura para conversão dos açúcares do mosto em etanol e outros componentes formados, restando apenas concentrações próximas de zero.

Os dados de avaliação da eficiência da fermentação alcoólica utilizando os nutrientes comerciais A, B e C, podem ser observados nas Figuras 31, 32 e 33, respectivamente. Esta eficiência diz respeito ao etanol formado em relação ao açúcar consumido. A eficiência nada mais é que o fator $Y_{P/S}$ transformado em porcentagem.

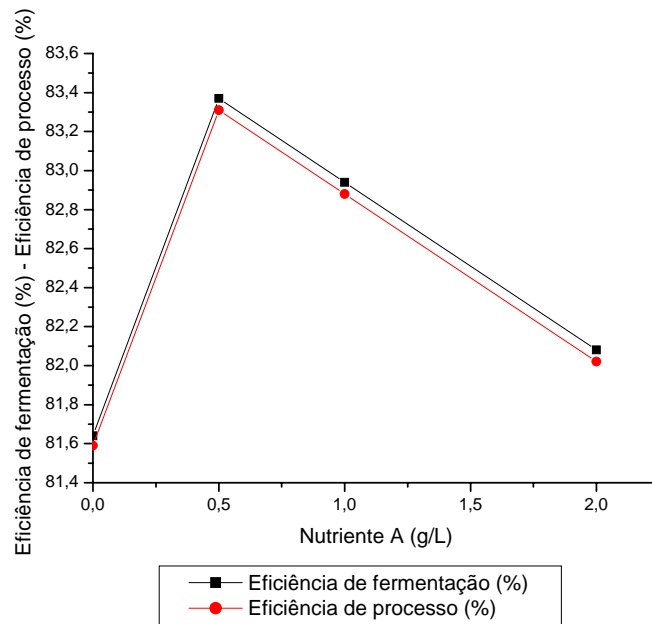


Figura 31 – Eficiência de fermentação η_b (%) e Eficiência de processo η_p (%), em função da complementação do nutriente comercial A, em ensaios com mosto de caldo de cana.

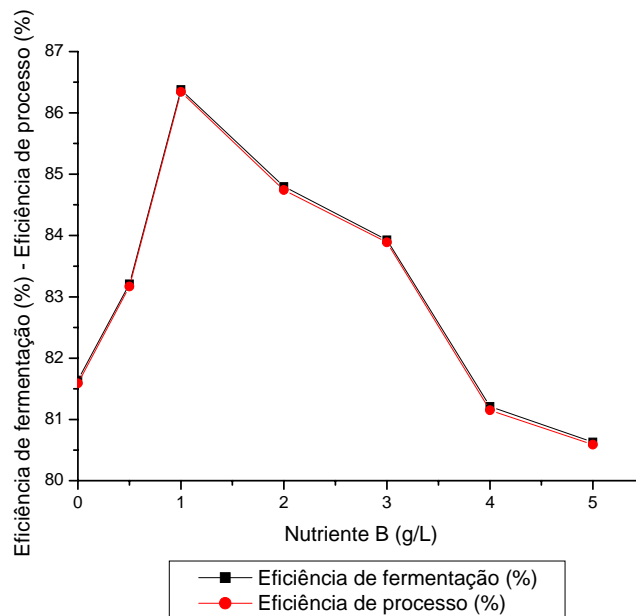


Figura 32 – Eficiência de fermentação η_b (%) e Eficiência de processo η_p (%), em função da complementação do nutriente comercial B, em ensaios com mosto de caldo de cana.

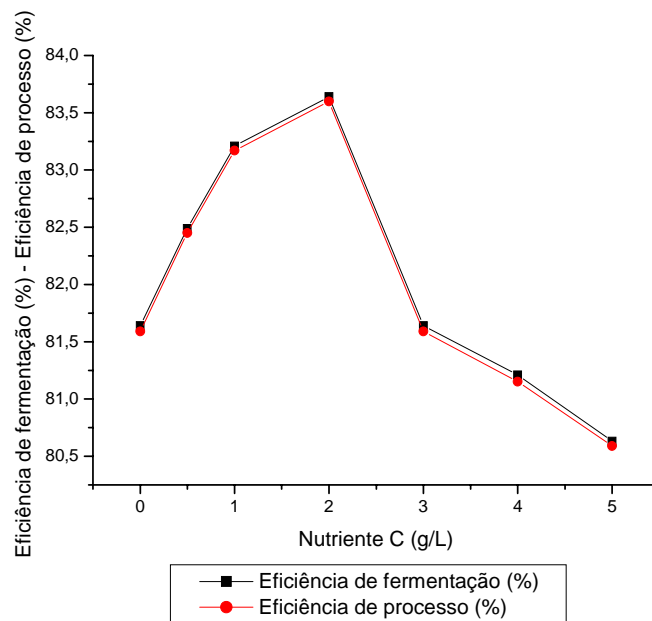


Figura 33 – Eficiência de fermentação η_b (%) e Eficiência de processo η_p (%), em função da complementação do nutriente comercial C, em ensaios com mosto de caldo de cana.

Analisando a Figura 31, observou-se que a concentração de 0,50 g de A/litro de mosto proporcionou maior eficiência (83,37%), estabelecendo assim que essa concentração é suficiente para complementar a deficiência do mosto de caldo de cana a 14°Brix. Quando utilizado os nutrientes comerciais B e C, obtiveram-se maiores eficiências nas concentrações de 1 g/L (86,38%) e 2 g/L (83,64%), respectivamente (Figuras 32 e 33). Essa diferença entre a concentração ideal desses nutrientes, deve-se, provavelmente, à carência dos macronutrientes (nitrogênio e fósforo) no mosto de caldo de cana, como pode ser observado na Tabela 5, e os nutrientes comerciais possuem valores diferentes desses macronutrientes (Nutriente B: 210 g de fósforo/Kg e 234 g de nitrogênio/Kg; Nutriente C: 210 g de fósforo/Kg e 288 g de nitrogênio/Kg). Porém, isso não quer dizer que os micronutrientes (Zn, Cu, Fe, Mn, Mg, etc.) não sejam essenciais durante a fermentação, haja vista que eles possuem importante função no metabolismo celular, principalmente devido aos seus requerimentos como cofatores para várias enzimas glicolíticas. Nota-se ainda, que as eficiências de fermentação e de processo não apresentaram diferenças significativas, pois os ART residuais são próximos entre si e de 0,0g/L.

Outro parâmetro avaliado foi a produtividade, que representa a produção de etanol por unidade de volume na unidade de tempo. Esses resultados estão apresentados nas Figuras 34, 35 e 36 utilizando os nutrientes comerciais A, B e C, respectivamente.

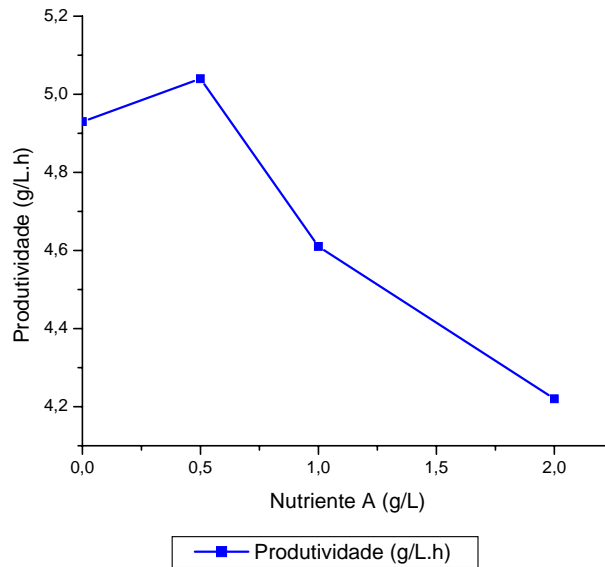


Figura 34 – Produtividade (g/L.h), em função da complementação do nutriente comercial A, em ensaios conduzidos com mosto de caldo de cana em batelada simples.

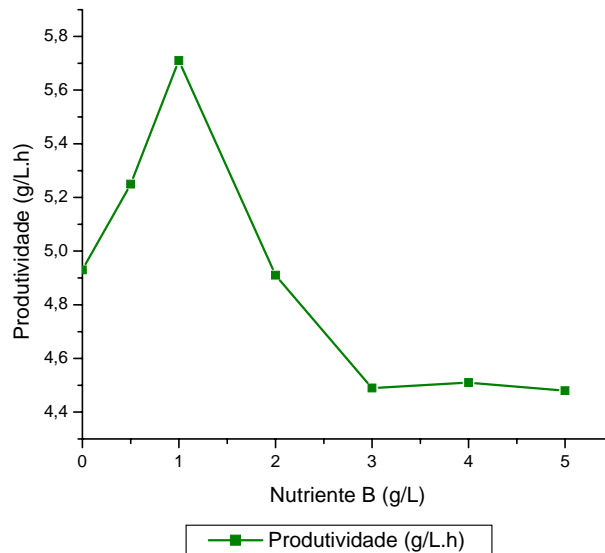


Figura 35 – Produtividade (g/L.h), em função da complementação do nutriente comercial B, em ensaios conduzidos com mosto de caldo de cana em batelada simples

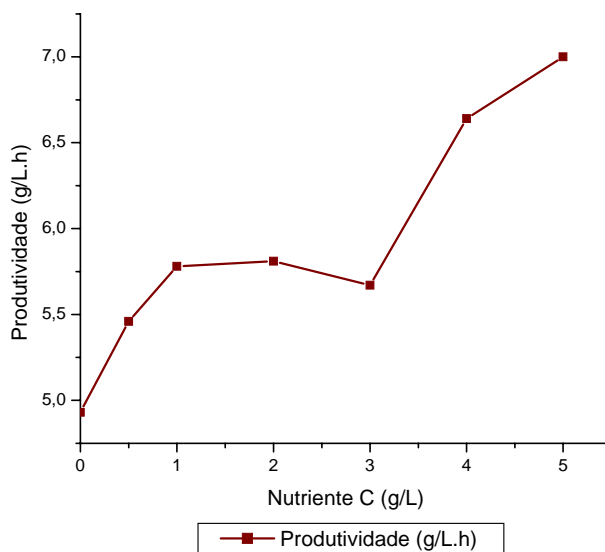


Figura 36 – Produtividade (g/L.h), em função da complementação do nutriente comercial C, em ensaios conduzidos com mosto de caldo de cana em batelada simples.

Na Figura 34 observou-se que, complementando-se o meio com 0,50 g de A/litro de mosto, obteve-se maior produtividade em etanol, levando em torno de 11,5 h de processo (PR = 5,04 g/L.h). Complementando o mosto de caldo de cana com 1 g de B/litro, obteve-se produtividade em etanol de 5,71g/L.h, ou seja, produziu 60 g/L de etanol em 10,5 h de processo fermentativo, como pôde ser visualizado na Figura 35.

Através da Figura 36, verificou-se que utilizando 2 g de C/litro de mosto, a produtividade foi de 5,81 g/L.h (58,1 g/L de etanol em 10 h de processo) e com 5 g de C/litro de mosto a produtividade foi de 7 g/L.h (56 g/L de etanol em 8 h de processo). No entanto, é importante obter concentração elevada de etanol no final da fermentação, para manter baixo o custo de produção de etanol pois, a nível industrial, à medida que aumenta a concentração de etanol, aumenta a produtividade e requer menos vapor para a destilação.

Nos meios fermentados, ácidos orgânicos produzidos durante a fermentação, provocam elevação da acidez e redução proporcional do pH, de modo a inibir o desenvolvimento de bactérias contaminantes sem prejudicar o desenvolvimento das leveduras.

Na Figura 37, estão apresentados graficamente os valores de pH e acidez em diferentes concentrações dos nutrientes comerciais A, B e C.

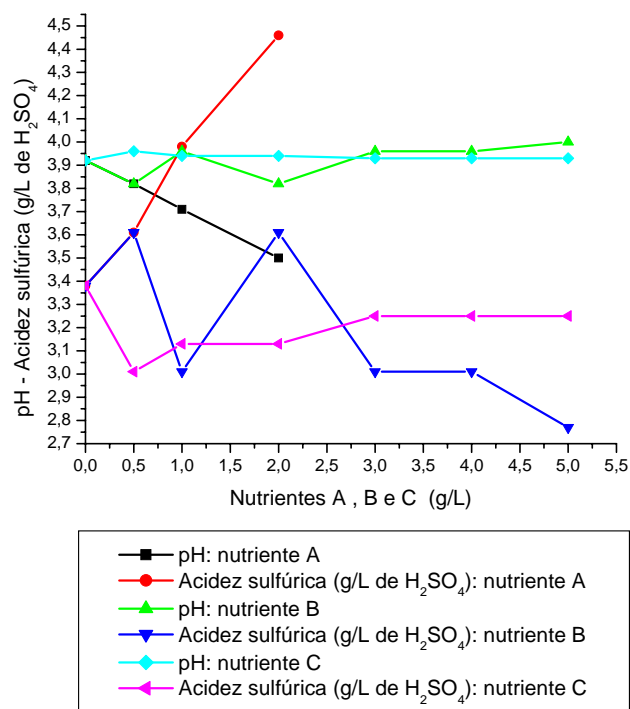


Figura 37 – Variação da acidez sulfúrica e pH, em função da complementação dos nutrientes comerciais A, B e C, em ensaios conduzidos com mosto de caldo de cana em batelada simples.

A Figura 37 mostra que os resultados obtidos estão de acordo com os relatados na literatura, pois à medida que o pH aumentou, a acidez diminuiu consideravelmente.

A Figura 38 mostra o efeito comparativo dos três nutrientes comerciais em termos de eficiência de fermentação e eficiência de processo na fermentação do mosto de caldo de cana a 14°Brix, e a Figura 39 mostra essa comparação em termos de produtividade para cada nutriente.

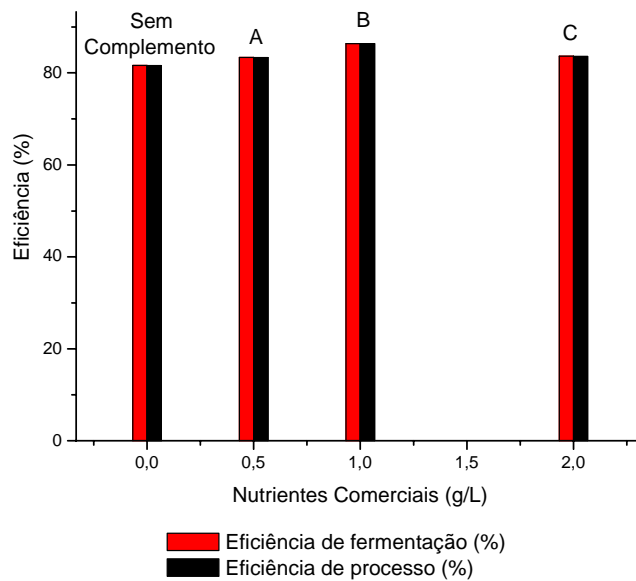


Figura 38 – Comparação entre as eficiências de fermentação e de processo nas concentrações ideais dos nutrientes comerciais A, B e C adicionados ao mosto de caldo de cana.

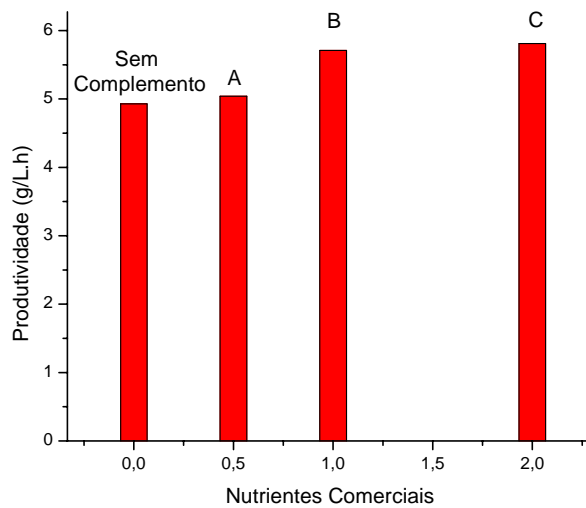


Figura 39 – Comparação entre as produtividades do processo nas concentrações ideais dos nutrientes comerciais A, B e C adicionados ao mosto de caldo de cana.

Analisando as Figuras 38 e 39, verificou-se que em termos de eficiência de fermentação e eficiência de processo o nutriente comercial que favoreceu melhor desempenho fermentativo da levedura foi o nutriente B, aumentando as eficiências em até 5,8% com relação ao ensaio sem complementação de nutrientes.

O comportamento dos três nutrientes comerciais na fermentação do mosto de caldo de cana a 14°Brix pode ser explicado, pelo fato de que os micronutrientes (Mg, Mn e Zn) estão em quantidades maiores na composição do nutriente B, elementos estes responsáveis por uma série de reações da via glicolítica. Essa afirmativa pode ser constatada comparando-se as concentrações dos nutrientes B (1g/L) e C (2g/L). Em relação à produtividade, observou-se na Figura 39 que, utilizando o nutriente comercial C na fermentação do mosto de caldo de cana obteve-se uma produtividade de 5,81 g/L.h, aumentando cerca de 18% com relação a fermentação do mosto sem complementação de nutriente. No entanto, vale ressaltar que utilizando o nutriente C produziu-se 58,1 g/L de etanol em 10 h de processo (PR = 5,81 g/L.h), o nutriente B produziu-se 60,0 g/L de etanol em 10,5 h de processo (PR = 5,71 g/L.h) e o nutriente A produziu-se 57,9 g/L de etanol em 11,5 h de processo (PR = 5,04 g/L.h). Então complementando o mosto de caldo de cana a 14°Brix com 1 g do nutriente B/L, tornaria mais conveniente para o processo, por ter obtido maior quantidade de etanol, em menor tempo de processo.

6 – CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- Dos ensaios preliminares determinou-se que o mosto de melão a 15°Brix e o mosto de caldo de cana a 14°Brix, foram definidos para serem complementados com os nutrientes comerciais A, B e C, pois com estes meios de fermentação obteve-se maiores eficiências e produtividades;
- A complementação do mosto de melão a 15°Brix com os nutrientes comerciais A, B e C, foi benéfica dentro das condições da matéria – prima e da condução do processo fermentativo, estabelecendo assim, as seguintes concentrações 0,20 g de A/litro de mosto, 0,50 g de B/litro de mosto e 0,30 g de C/litro de mosto, pois essas doses contribuíram para aumentar as eficiências e produtividades;
- A complementação do mosto de caldo de cana a 14°Brix com os nutrientes comerciais A, B e C, foi benéfica dentro das condições da matéria – prima e da condução do processo fermentativo, estabelecendo assim, as seguintes concentrações 0,50 g de A/litro de mosto, 1 g de B/litro de mosto e 2 g de C/litro de mosto, pois essas doses contribuíram para aumentar as eficiências e produtividades;
- Na comparação dos três nutrientes comerciais em fermentação alcoólica do mosto de melão a 15°Brix, evidenciou que o nutriente C apresentou melhor desempenho e na fermentação do caldo de cana a 14°Brix foi o nutriente B.

7 – SUGESTÕES

- Empregar outras formas de condução do processo fermentativo, como por exemplo, a batelada alimentada visando aumentar a eficiência e produtividade;
- Complementar com os mesmos nutrientes comerciais o mosto misto (melaço + caldo de cana), se houver necessidade, de modo a suprir as deficiências do meio de fermentação; testar nutrientes sintéticos tendo como base a concentração de cada nutriente comercial utilizado nesse trabalho, podendo fazer análise estatística;
- Realizar a análise econômica dos nutrientes comerciais disponíveis no mercado e os nutrientes sintéticos, para verificar qual compensaria no processo fermentativo.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, H.V. **Introdução à bioquímica da fermentação alcoólica.** Araras. Planalsucar. 1977.

AMORIM, H.V. **Nutrição mineral da levedura, aspectos teóricos e práticos.** In: SEMANA DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA “JAIME ROCHA DE ALMEIDA”, 4., Piracicaba, 1985. Anais. Piracicaba: ESALQ, 1985. p.144 – 148.

ANJOS MAGALHÃES, M.M.; VAIRO, M.L.R.; BORZANI, W. **Influência da adição de fonte de nitrogênio ao mosto no teor de proteína da levedura residual da fermentação alcoólica do melaço de cana-de-açúcar.** Revista Brasileira de Tecnologia, São Paulo, 1980.

AIBA, S.; HUMPHREY, A.E.; MILLIS, N. **Biochemical Engineering.** 2nd edition. Academic Press, Inc., 1973, 434 p.

AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W. **Alimentos e bebidas obtidos por fermentação.** São Paulo, Edgard Blucher, (Biotecnologia 5), 1983.

BUZAS, Zs; DALLMAN, K.; SZAJNSNI, B. **Influence of pH on the growth and ethanol production on free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells.** Biotechnology and Bioengineering, v.34, n.6, 1989, p.882 – 884.

CALDAS, C. S. **Manual de Análises Selecionadas para Indústrias Sucroalcooleiras.** Sindicato da Indústria do Açúcar e do Alcool do Estado de Alagoas, Maceió-AL, 1998, 424p.

CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. **Fermentação descontínua.** In: SCMIDELL, W. (Coord.); LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica.* São Paulo: Edgard Blücher, v. 2, 2001, p. 193-204.

CODISTIL, **Fermentação alcoólica**. Piracicaba, Deptº. de Engenharia, 1978, apud VASCONCELOS, J. N. de. **Influência da complementação de nutrientes nitrogenados e fosfatados sobre o processo de fermentação alcoólica industrial**. Brasil Açucareiro, v.4, 5 e 6, n.105, 1987, p.41 – 48.

DELGADO, A. A.; CESAR, M. A. A. **Elementos de tecnologia e engenharia do açúcar de cana**. Piracicaba, 1977, p. 365-752.

DELGADO, A. A.; CESAR, M. A. A. **Determinação de fosfatos em caldo e mosto de cana-de-açúcar**. STAB: açúcar, álcool e subprodutos, v.2, n.4, 1984, p.42 – 45.

DELGADO, A.A.; FERREIRA, L.J.; BARBIN, D. **Estudos sobre o comportamento do fósforo na clarificação do caldo de cana**. Brasil Açucareiro, v.82, n.1, jul. 1973, p.55 – 75.

DRAGONE, G.; SILVA, D. P.; ALMEIDA E SILVA, J. B. **Factors in.uencing ethanol production rates at high-gravity brewing**. LWT, v. 37, 2004, p. 797 – 802.

FARAH ALVES, T.C & DEL BIANCO, V. **Produção de levedura, alimento e assimilação do nitrogênio em melaços brasileiros**. Rio de Janeiro, INT, 1971, 63p.

FRANCO, C.J. **Fermentação alcoólica: Saccharum**, STAB, São Paulo, dez. 1978.

GAVA, A. J. **Princípios de tecnologia de alimentos**. São Paulo. Editora Nobel, 1998.

HARRISON, J.S. **Yeast production**. HOCKENHULL, D.J.D. **Progress in industrial microbiology**. London, Colchester and Beccles, 1971. cap.4, p.129 – 178.

HONIG, P. **Princípios de tecnologia azucarera**. México: Continental, v.1, 1969.

HONIG, P. **The presence of phosphate in cane juice**. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS, 10., Hawaii, 1959. Proceedings. Amsterdam: Elsevier, 1960, p.351 – 361.

JONES, R.P.; GADD, G.M. **Enzyme Microb. Technol.**, 1990. v. 12: 1-17 apud STEHLIK-TOMAS, V.; ZETIC, V.G.; STANZER, D.; GRBA, S.; AND VAHCIC, N. **Zn, Cu and Mn Enrichment in *S. cerevisiae***, Food Technology. Biotechnology. v.42 (2), 2004, p.115 –120.

JONES, R.P.; GREENFIELD, P.F. **A review of yeast ionic nutrition. Part I: Growth and fermentation.** Process Biochemistry, april 1984, p 48 – 60.

JONES, R.P.; PAMMENT, N.; GREENFIELD, P.F. **Alcohol fermentation by yeasts: The effect of environmental and other variables.** Process Biochemistry, London, v.16, 1981, p.42 – 49.

KOLB, E. **Vinos de frutas – Elaboración artesanal e industrial.** Zaragoza – Espanha, Ed. Acribia, 2002, 232 p.

KORNDORFER, G.H. **Fertilizantes fosfatados sólidos e fluidos na cana-de-açúcar.** Piracicaba, 1990, 91p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

KORNDORFER, G.H. **Resposta da cultura da cana-de-açúcar à adubação fosfatada.** Informações Agronômicas, v.102, jun. 2003, p.7.

LEHNINGER, A. L; NELSON, D.L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica.** Traduzido por SIMÕES, A. A.; LODE, W.R.N. São Paulo: Ed. SARVIER, 2ªed., 1995. Tradução de: Principles of biochemistry.

LIMA, U.A. *Aguardentes*. In: AQUARONE, E. et al. (Coord.) **Biotechnologia Industrial: alimentos e bebidas produzidos por fermentação.** São Paulo, Edgard Blücher, v. 4, 2001, p. 145 – 182.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. *Produção de Etanol*. In: LIMA, U. A. et al. (Coord.). **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo, Edgard Blücher, v. 3, 2001. p.1 – 43. (Biotecnologia Industrial; v.3)

LIMA, U. de A. **Contribuição ao estudo da influência do manganês sobre o crescimento e atividades do *Saccharomyces cerevisiae***, Hansen. Bol. do Instituto Zimotécnico. Piracicaba.1953.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Tecnologia das Fermentações**. São Paulo, Edgard Blucher, (Biotecnologia 1), 1975.

LIMA, U. de A. **Estudo dos principais fatores que afetam os componentes do coeficiente não-álcool das aguardentes de cana**. Piracicaba. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Univ. de São Paulo,1962.

MADRID, A.; CENZANO, I.; VICENT, J.M. **Manual de Indústrias de alimentos**. 1.ed. São Paulo: Varela, 1995. 599 p.

MALAVOLTA, E.; HAAG, H.P. **Cultura e adubação da cana-de-açúcar**. São Paulo: Instituto Brasileiro de Potassa, 1964, cap.8, p.220 – 237: Fisiologia.

MASSART, L.; HORENS, J. **L'assimilation d'azote amine par les levures**. Enzymologia Acta Biocatalytica, Den Haag, 1952.

MEADE, G.P. **Cane sugar handbook**. New York: John Wiley, v. 9, 1963, p.23 – 26: composition of cane juice.

MORRIS, E. **The Chemistry and biology of yeasts**. New York, Academic Press, 1958.

NAKANO, V. M. **Teoria da fermentação e maturação**. In: WORKSHOP ADEGAS, 2000, Brasília. Anais. Brasília: AMBEV, 2000, 96 p.

NOGUEIRA, A. M. P.; VENTURINI FILHO, W. G. **Aguardente de cana**. Botucatu: Faculdade de Ciências Agronômicas - UNESP, 2005. 71 p.

NOVAES, F.V.; STUPIELLO, J.P.; OLIVEIRA, A.J.; DELGADO, A.A.; OLIVEIRA, E.R.; CESAR, M.A.A.; VALSECCHI, O. **Tecnologia das aguardentes (apontamentos de aulas)**. Piracicaba, ESALQ, USP, Deptº. de Tecnologia rural, 1971, 138 p.

NOVAES, F.V.; STUPIELLO, J.P.; OLIVEIRA, A.J.; DELGADO, A.A.; OLIVEIRA, E.R.; CESAR, M.A.A.; VALSECCHI, O. **I curso de extensão em tecnologia de aguardentes (apontamentos)**. Piracicaba, ESALQ/USP. Deptº. de Tecnologia rural, 1974, 104 p.

PATARO, C.; SANTOS, A.; CORREA, S.R.; MORAIS, P.B.; LINARDI, V.R.; ROSA, C.A. **Physiological characterization of yeasts isolated from artisanal fermentations in na cachaça distillery**. Revista Microbiológica., v.29, 1998, p. 69 – 79.

PELCZAR, M., REID, R.; CHAN, E. C. S.; **Microbiologia**. v.1, São Paulo, McGraw, 1980.

PEREIRA, A. F. **Suplementação de nitrogênio sobre a fermentação alcoólica para produção de cachaça, cerveja e vinho**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, MG, 2007, 99p.

RASOVSKY, E.M; **Álcool:destilaria**. Rio de Janeiro. Coleção Canavieira. n.12, 1973.

RETTORI, D.; VOLPE, P. L. O. **Microcalorimetria: uma técnica aplicável ao estudo do diauxismo da Saccharomyces cerevisiae**. Quím. Nova., São Paulo, v. 23, n. 2, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br>. Acesso em: 06 Maio 2007.

REED, G.; NAGODAWITHANA, T.W. **Yeast Technology**. New York: 2 ed. Van Nostrand Reinhold Book. 1991. 378 p.

RIBEIRO, C. A. F.; HORII, J. **Potencialidades de linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação do caldo de cana.** Ciências e Tecnologia dos Alimentos, v. 56, n. 2, 1999.

ROITMAN, I; TRAVASSOS, L; AZEVEDO, J. L. **Tratado de microbiologia**, v.1. São Paulo, Ed. Manole LTDA, 1988.

SALGADO, J.M. & SARRUGE, J.R. **Influência dos compostos nitrogenados e da relação C/N na obtenção do concentrado protéico de microrganismos.** Revista Microbiológica, São Paulo, 1979.

SÁ, M.J.P. **Produção de etanol por levedura imobilizada em sabugos de milho.** 2003. 67 p. Dissertação (Mestrado em química e biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas, AL, 2003.

SCHIMIDELL, W.; BONOMI, A.; Fadiga. In: **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica. Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos.** São Paulo, v. 2, 2001, p. 123 – 178.

SILVA, C. G. M. da. **Processo Biotecnológico para conversão de algaroba (*Prosopis juliflora* (SW) D.C.) em etanol.** Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, PE, 2007, 104p.

SIMPSON, B. **The importance of yeast and fermentation.** 2.ed. London: Cara Technology, 1996, 34 p.

STEHLIK-TOMAS, V.; ZETIC, V.G.; STANZER, D.; GRBA, S.; AND VAHCIC, N. **Zn, Cu and Mn Enrichment in *S. cerevisiae*,** Food Technology. Biotechnology. v.42 (2), 2004, p.115 – 120.

STRYER, L. **Bioquímica.** 4 ed. Rio de Janeiro-RJ, Ed. Guanabara Koogan, 1996, p. 1000.

STUPIELLO, J.P.; MARINO, E.A. e CELINSKI, R. **Fermentação**. Copersucar, São Paulo, 1974.

STUPIELLO, J.P.; HORII, J. **Condução da fermentação alcoólica**. *Saccharum*, v.4, n. 17, 1981, p. 43 – 46.

SUOM ALAINE, H.; OURA, E. **Yeast nutrition and solute uptake**. In: *The yeasts*, 2:3-60, ed. A.A. Rose e J.S. Harrison. Academic press, London and New York, 1971.

VAIRO, M.L.R.; GREGORI, E.E.; BORZANI, W. **Respostas de um cultivo contínuo de *Saccharomyces cerevisiae* a perturbações por impulso provocadas por adição de sulfato de amônio**. *Revista Brasileira de Tecnologia*, São Paulo, 1975.

VASCONCELOS, J. N. de. **Guia de Aulas Práticas: Engenharia Bioquímica e Tecnologia do álcool**. Laboratório de Derivados da Cana-de-Açúcar, Centro de Tecnologia da Universidade Federal de Alagoas, 2000, 26 p.

VASCONCELOS, J. N. de. **Influência da complementação de nutrientes nitrogenados e fosfatados sobre o processo de fermentação alcoólica industrial**. *Brasil Açucareiro*, v.4, 5 e 6, n.105, 1987, p.41 – 48.

WARD, O. P. **Bioteconología de la fermentación: principios, procesos y productos**. Zaragoza – Espanha, Ed. ACRIBIA, S.A. 1991, p. 155.

WHITE, J. **Yeast technology**. London, Chapman and Hall, 1954, 432 p.

WICKERHAM, L.J. **A critical evaluation of the nitrogen assimilation tests commonly used in the classification of yeasts**. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, 1946.

APÊNDICES

APÊNDICE A – DADOS DOS ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO

Tabela A1 – Fermentação desenvolvida pelo fermento Fleischmann (levedura *Saccharomyces cerevisiae*) no mosto de melação a 15°Brix, no tempo total de 8,5 horas.

ANÁLISES	INÍCIO DA FERMENTAÇÃO (*)	FINAL DA FERMENTAÇÃO (*)
ART (g/L)	112,4	8,4
Acidez sulfúrica (g/L de H ₂ SO ₄)	5	4,1
pH	5,36	4,88
Etanol (g/L)	0	41,36

(*) Média de 2 ensaios em períodos distintos

Tabela A2 – Fermentação desenvolvida pelo fermento Fleischmann (levedura *Saccharomyces cerevisiae*) no mosto de melação a 18°Brix, no tempo total de 10,5 horas.

ANÁLISES	INÍCIO DA FERMENTAÇÃO (*)	FINAL DA FERMENTAÇÃO
ART (g/L)	151,5	10,0
Acidez sulfúrica (g/L de H ₂ SO ₄)	5,26	3,62
pH	5,37	4,96
Etanol (g/L)	0	51,78

(*) Média de 2 ensaios em períodos distintos

Tabela A3 – Fermentação desenvolvida pelo fermento Fleischmann (levedura *Saccharomyces cerevisiae*) no mosto de melação a 21°Brix, no tempo total de 12,5 horas.

ANÁLISES	INÍCIO DA FERMENTAÇÃO (*)	FINAL DA FERMENTAÇÃO (*)
ART (g/L)	188,7	11,6
Acidez sulfúrica (g/L de H ₂ SO ₄)	7,17	4,94
pH	5,42	4,28
Etanol(g/L)	0	61,88

(*) Média de 2 ensaios em períodos distintos

Tabela A4 – Fatores de rendimento, eficiência de fermentação e produtividade de etanol para mosto de melão a 15, 18 e 21°Brix.

PARÂMETROS	°BRIX		
	15	18	21
PRODUTIVIDADE EM ETANOL (PR) (g/L.h)	4,87	4,93	4,95
FATOR DE RENDIMENTO ($Y_{P/S}$) (g de glicose/g de etanol)	0,398	0,366	0,349
EFICIÊNCIA DE FERMENTAÇÃO ($\eta_b\%$)	77,9	71,6	68,3
EFICIÊNCIA DE PROCESSO ($\eta_p\%$)	72,0	66,93	64,0

Tabela A5 – Fermentação desenvolvida pelo fermento Fleischmann (levedura *Saccharomyces cerevisiae*) no mosto de caldo de cana a 12°Brix, no tempo total de 8,5 horas.

ANÁLISES	INÍCIO DA FERMENTAÇÃO (*)	FINAL DA FERMENTAÇÃO (*)
ART (g/L)	121,2	0,25
Acidez sulfúrica (g/L de H ₂ SO ₄)	5,49	3,13
pH	4,75	3,83
Etanol(g/L)	0	52,1

(*) Média de 2 ensaios em períodos distintos

Tabela A6 – Fermentação desenvolvida pelo fermento Fleischmann (levedura *Saccharomyces cerevisiae*) no mosto de caldo de cana a 14°Brix, no tempo total de 10,5 horas.

ANÁLISES	INÍCIO DA FERMENTAÇÃO (*)	FINAL DA FERMENTAÇÃO (*)
ART (g/L)	136,0	0,40
Acidez sulfúrica (g/L de H ₂ SO ₄)	5,25	3,62
pH	4,82	3,68
Etanol(g/L)	0	59,2

(*) Média de 2 ensaios em períodos distintos

Tabela A7 – Fermentação desenvolvida pelo fermento Fleischmann (levedura *Saccharomyces cerevisiae*) no mosto de caldo de cana a 16°Brix, no tempo total de 12 horas.

ANÁLISES	INÍCIO DA FERMENTAÇÃO (*)	FINAL DA FERMENTAÇÃO (*)
ART (g/L)	162,6	0,55
Acidez sulfúrica (g/L de H ₂ SO ₄)	4,3	3,0
pH	4,66	3,95
Etanol(g/L)	0	64,34

(*) Média de 2 ensaios em períodos distintos

Tabela A8 – Fatores de rendimento, eficiência de fermentação e produtividade de etanol para mosto de caldo de cana a 12, 14 e 16°Brix.

PARÂMETROS	°BRIX		
	12	14	16
PRODUTIVIDADE EM ETANOL (PR) (g/L.h)	6,13	5,64	5,36
FATOR DE RENDIMENTO ($Y_{P/S}$) (g de glicose/g de etanol)	0,4308	0,4366	0,3970
EFICIÊNCIA DE FERMENTAÇÃO ($\eta_b\%$)	84,30	85,44	77,69
EFICIÊNCIA DE PROCESSO ($\eta_p\%$)	84,13	85,19	77,44

Tabela A9 – Resultados da complementação do nutriente comercial A. O volume de mosto de melação utilizado para cada ensaio foi de 1000 mL (mosto com 15°Brix, pH = 4,5 e ART = 112,4 g/L).

Nutriente A (g/L de mosto)	Vinho (*)				
	pH	Acidez sulfúrica (g/L H ₂ SO ₄)	Etanol (g/L)	ART (g/L)	Tempo de Fermentação (h)
0,00	4,27	5,30	44,2	8,60	9,5
0,05	4,28	5,18	44,4	8,40	9,0
0,10	4,27	5,30	45,0	8,20	9,0
0,20	4,27	5,30	45,3	8,10	9,0
0,30	4,27	5,30	45,3	8,10	9,5
0,40	4,27	5,30	45,3	8,10	9,0
0,50	4,29	5,10	44,8	8,25	9,0

(*) Média de 2 ensaios em períodos distintos

Tabela A10 – Eficiência de fermentação e de processo, fator de rendimento e produtividade em etanol dos ensaios com complementação do nutriente comercial A.

Nutriente A (g/L de mosto)	Eficiência de fermentação η_b (%)	Eficiência de processo η_p (%)	Rendimento $Y_{P/S}$ (g/g)	Produtividade PR (g/L.h)
0,00	83,37	77,00	0,426	4,65
0,05	83,56	77,30	0,427	4,93
0,10	84,54	78,35	0,432	5,00
0,20	84,93	78,90	0,434	5,03
0,30	84,93	78,90	0,434	4,77
0,40	84,93	78,90	0,434	5,03
0,50	84,15	78,00	0,430	4,98

Tabela A11 – Resultados da complementação do nutriente comercial B. O volume de mosto de melação utilizado para cada ensaio foi de 1000 mL (mosto com 15°Brix, pH = 4,5 e ART = 112,4 g/L).

Nutriente B (g/L de mosto)	Vinho (*)				
	pH	Acidez sulfúrica (g/L H ₂ SO ₄)	Etanol (g/L)	ART (g/L)	Tempo de fermentação (h)
0,00	4,27	5,30	44,2	8,60	9,5
0,10	4,28	5,18	44,5	8,40	9,0
0,30	4,27	5,30	45,0	8,20	9,0
0,50	4,27	5,30	45,5	8,00	8,5
0,70	4,29	5,10	44,4	8,40	8,5

(*) Média de 2 ensaios em períodos distintos

Tabela A12 – Eficiência de fermentação e de processo, fator de rendimento e produtividade em etanol dos ensaios com complementação do nutriente comercial B.

Nutriente B (g/L de mosto)	Eficiência de fermentação η_b (%)	Eficiência de processo η_p (%)	Rendimento $Y_{P/S}$ (g/g)	Produtividade PR (g/L.h)
0,00	83,37	77,00	0,426	4,65
0,10	83,76	77,48	0,428	4,94
0,30	84,54	78,35	0,432	5,00
0,50	85,32	79,22	0,436	5,35
0,70	83,56	77,30	0,427	5,22

Tabela A13 – Resultados da complementação do nutriente comercial C. O volume de mosto de melão utilizado para cada ensaio foi de 1000 mL (mosto com 15°Brix, pH = 4,5 e ART = 112,4 g/L).

Nutriente C (g/L de mosto)	Vinho (*)				
	pH	Acidez sulfúrica (g/L H ₂ SO ₄)	Etanol (g/L)	ART (g/L)	Tempo de fermentação (h)
0,00	4,27	5,30	44,2	8,60	9,5
0,10	4,29	5,10	44,5	8,42	8,0
0,30	4,27	5,30	46,1	7,00	10,5
0,50	4,28	4,94	45,0	8,20	9,5
0,70	4,29	5,10	44,1	8,63	8,5

(*) Média de 2 ensaios em períodos distintos

Tabela A14 – Eficiência de fermentação e de processo, fator de rendimento e produtividade em etanol dos ensaios com complementação do nutriente comercial C.

Nutriente C (g/L de mosto)	Eficiência de fermentação η_b (%)	Eficiência de processo η_p (%)	Rendimento $Y_{P/S}$ (g/g)	Produtividade PR (g/L.h)
0,00	83,37	77,00	0,426	4,65
0,10	83,76	77,48	0,428	5,56
0,30	85,52	80,26	0,437	4,39
0,50	84,54	78,35	0,432	4,74
0,70	83,17	76,78	0,425	5,19

Tabela A15 – Resultados da complementação do nutriente comercial A. O volume de mosto de caldo de cana utilizado para cada ensaio foi de 1000 mL (mosto com 14°Brix, pH = 4,7 e ART = 136 g/L).

Nutriente A (g/L de mosto)	Vinho (*)				
	pH	Acidez sulfúrica (g/L H ₂ SO ₄)	Etanol (g/L)	ART (g/L)	Tempo de fermentação (h)
0,00	3,92	3,38	56,7	0,093	11,5
0,50	3,82	3,61	57,9	0,076	11,5
1,00	3,71	3,98	57,6	0,078	12,5
2,00	3,50	4,46	57,0	0,082	13,5

(*) Média de 2 ensaios em períodos distintos

Tabela A16 – Eficiência de fermentação e de processo, fator de rendimento e produtividade em etanol dos ensaios com complementação do nutriente comercial A.

Nutriente A (g/L de mosto)	Eficiência de fermentação η_b (%)	Eficiência de processo η_p (%)	Rendimento $Y_{P/S}$ (g/g)	Produtividade PR (g/L.h)
0,00	81,64	81,59	0,4172	4,93
0,50	83,37	83,31	0,4260	5,04
1,00	82,94	82,88	0,4238	4,61
2,00	82,08	82,02	0,4194	4,22

Tabela A17 – Resultados da complementação do nutriente comercial B. O volume de mosto de caldo de cana utilizado para cada ensaio foi de 1000 mL (mosto com 14°Brix, pH = 4,7 e ART = 136 g/L).

Nutriente B (g/L de mosto)	Vinho (*)				
	pH	Acidez sulfúrica (g/L H ₂ SO ₄)	Etanol (g/L)	ART (g/L)	Tempo de fermentação (h)
0,00	3,92	3,38	56,7	0,093	11,5
0,50	3,82	3,61	57,8	0,073	11,0
1,00	3,96	3,01	60,0	0,070	10,5
2,00	3,82	3,61	58,9	0,074	12,0
3,00	3,96	3,01	58,3	0,075	13,0
4,00	3,96	3,01	56,4	0,095	12,5
5,00	4,00	2,77	56,0	0,098	12,5

(*) Média de 2 ensaios em períodos distintos

Tabela A18 – Eficiência de fermentação e de processo, fator de rendimento e produtividade em etanol dos ensaios com complementação do nutriente comercial B.

Nutriente B (g/L de mosto)	Eficiência de fermentação η_b (%)	Eficiência de processo η_p (%)	Rendimento $Y_{P/S}$ (g/g)	Produtividade PR (g/L.h)
0,00	81,64	81,59	0,4172	4,93
0,50	83,20	83,17	0,4252	5,25
1,00	86,38	86,34	0,4414	5,71
2,00	84,80	84,76	0,4333	4,91
3,00	83,93	83,90	0,4289	4,49
4,00	81,21	81,15	0,4150	4,51
5,00	80,63	80,59	0,4120	4,48

Tabela A19 – Resultados da complementação do nutriente comercial C. O volume de mosto de caldo de cana utilizado para cada ensaio foi de 1000 mL (mosto com 14°Brix, pH = 4,7 e ART = 136 g/L).

Nutriente C (g/L de mosto)	Vinho (*)				
	pH	Acidez sulfúrica (g/L H ₂ SO ₄)	Etanol (g/L)	ART (g/L)	Tempo de fermentação (h)
0,00	3,92	3,38	56,7	0,093	11,5
0,50	3,96	3,01	57,3	0,060	10,5
1,00	3,94	3,13	57,8	0,050	10,0
2,00	3,94	3,13	58,1	0,045	10,0
3,00	3,93	3,25	56,7	0,093	10,0
4,00	3,93	3,25	56,4	0,096	8,5
5,00	3,93	3,25	56,0	0,100	8,0

(*) Média de 2 ensaios em períodos distintos

Tabela A20 – Eficiência de fermentação e de processo, fator de rendimento e produtividade em etanol dos ensaios com complementação do nutriente comercial C.

Nutriente C (g/L de mosto)	Eficiência de fermentação η_b (%)	Eficiência de processo η_p (%)	Rendimento $Y_{P/S}$ (g/g)	Produtividade PR (g/L.h)
0,00	81,64	81,59	0,4172	4,93
0,50	82,49	82,45	0,4215	5,46
1,00	83,21	83,17	0,4252	5,78
2,00	83,64	83,60	0,4274	5,81
3,00	81,64	81,59	0,4172	5,67
4,00	81,21	81,15	0,4150	6,64
5,00	80,63	80,59	0,4120	7,00

APÊNDICE B1 – CÁLCULO DO NUTRIENTE A PARA COMPLEMENTAÇÃO DO MOSTO DE MELAÇO A 15°BRIX.

- Concentração de fósforo presente no mosto (Tabela 5):

$$0,141 \frac{\text{mL de fósforo}}{\text{mL}} \times 2,3 \frac{\text{g}}{\text{L}} = 0,3243 \text{ g/L}$$

- Quantidade de fósforo no nutriente A (Tabela 4):

$$530 \frac{\text{g de fósforo}}{\text{Kg de nutriente}}$$

- Segundo Amorim (1977) e Lima (1953,1962) (Tabela 3):

$$62 - 560 \text{ mg/L} \Rightarrow 0,062 - 0,56 \text{ g/L}$$

- Suposições:

Complementando o mosto com 0,05 g/L de nutriente comercial A, obtem-se uma quantidade total de fósforo de 0,3508 g/L. Quantidade esta que está na faixa admissível da Tabela 3:

$$\begin{array}{ccc} 530 \text{ g de P}_2\text{O}_5 & \times & 1000 \text{ g de nutriente comercial A} \\ y & & 0,05 \text{ g de nutriente comercial A} \end{array}$$

$$y = 0,0265 \text{ g de P}_2\text{O}_5$$

$$\text{Total de P}_2\text{O}_5 \text{ no mosto: } 0,0265 + 0,3243 = 0,3508 \text{ g/L}$$

Quantidade de nutriente comercial A adicionada ao mosto de melaço a 15°Brix (g/L)	Total de P ₂ O ₅ no mosto (g/L)
0,05	0,3508
0,10	0,3773
0,20	0,4303
0,30	0,4833
0,40	0,5363
0,50	0,5893

As concentrações do nutriente comercial A testadas foram baseadas na Tabela 3, e os cálculos foram realizados baseando-se no composto presente em maior quantidade (P₂O₅) na composição do nutriente A.

APÊNDICE B2: CÁLCULO DO NUTRIENTE B PARA COMPLEMENTAÇÃO DO MOSTO DE MELAÇO A 15°BRX.

- Concentração de nitrogênio presente no mosto (Tabela 5):

$$0,166 \frac{mL \text{ de nitrogênio}}{mL} \times 1,250 \frac{g}{L} = 0,2075 \text{ g/L}$$

- Quantidade de nitrogênio no nutriente B (Tabela 4):

$$234 \frac{g \text{ de fósforo}}{Kg \text{ de nutriente}}$$

- Segundo Amorim (1977) e Lima (1953,1962) (Tabela 3):

$$40 - 5900 \text{ mg/L} \Rightarrow 0,04 - 5,9 \text{ g/L}$$

- Suposições:

Complementando o mosto com 0,10 g/L de nutriente comercial B, obtem-se uma quantidade total de nitrogênio de 0,2309 g/L. Quantidade esta que está na faixa admissível da Tabela 3:

$$\begin{array}{r} 234 \text{ g de N} \\ y \end{array} \begin{array}{l} \diagdown \\ \diagup \end{array} \begin{array}{l} 1000 \text{ g de nutriente comercial B} \\ 0,10 \text{ g de nutriente comercial B} \end{array}$$

$$y = 0,0234 \text{ g de N}$$

$$\text{Total de N no mosto: } 0,0234 + 0,2075 = 0,2309 \text{ g/L}$$

Quantidade de nutriente comercial B adicionada ao mosto de melaço a 15°Brix (g/L)	Total de N no mosto (g/L)
0,10	0,2309
0,30	0,2777
0,50	0,3245
0,70	0,3713

As concentrações do nutriente comercial B testadas foram baseadas na Tabela 3, e os cálculos foram realizados baseando-se no composto presente em maior quantidade (N) na composição do nutriente B.

APÊNDICE B3: CÁLCULO DO NUTRIENTE C PARA COMPLEMENTAÇÃO DO MOSTO DE MELAÇO A 15°BRIX.

- Concentração de nitrogênio presente no mosto (Tabela 5):

$$0,166 \frac{mL \text{ de nitrogênio}}{mL} \times 1,250 \frac{g}{L} = 0,2075 \text{ g/L}$$

- Quantidade de nitrogênio no nutriente C (Tabela 4):

$$288 \frac{g \text{ de fósforo}}{Kg \text{ de nutriente}}$$

- Segundo Amorim (1977) e Lima (1953,1962) (Tabela 3):

$$40 - 5900 \text{ mg/L} \Rightarrow 0,04 - 5,9 \text{ g/L}$$

- Suposições:

Complementando o mosto com 0,10 g/L de nutriente comercial C, obtem-se uma quantidade total de nitrogênio de 0,2363 g/L. Quantidade esta que está na faixa admissível da Tabela 3:

$$\begin{array}{r} 288 \text{ g de N} \\ y \end{array} \begin{array}{c} \diagdown \\ \diagup \end{array} \begin{array}{l} 1000 \text{ g de nutriente comercial C} \\ 0,10 \text{ g de nutriente comercial C} \end{array}$$

$$y = 0,0288 \text{ g de N}$$

$$\text{Total de N no mosto: } 0,0288 + 0,2075 = 0,2363 \text{ g/L}$$

Quantidade de nutriente comercial C adicionada ao mosto de melaço a 15°Brix (g/L)	Total de N no mosto (g/L)
0,10	0,2363
0,30	0,2939
0,50	0,3515
0,70	0,4091

As concentrações do nutriente comercial B testadas foram baseadas na Tabela 3, e os cálculos foram realizados baseando-se no composto presente em maior quantidade (N) na composição do nutriente C.

APÊNDICE B4: CÁLCULO DO NUTRIENTE A PARA COMPLEMENTAÇÃO DO MOSTO DE CALDO DE CANA A 14°BRIX.

- Concentração de fósforo presente no mosto (Tabela 5):

$$0,015 \frac{mL \text{ de fósforo}}{mL} \times 2,3 \frac{g}{L} = 0,0345 \text{ g/L}$$

- Quantidade de fósforo no nutriente A (Tabela 4):

$$530 \frac{g \text{ de fósforo}}{Kg \text{ de nutriente}}$$

- Segundo Amorim (1977) e Lima (1953,1962) (Tabela 3):

$$62 - 560 \text{ mg/L} \Rightarrow 0,062 - 0,56 \text{ g/L}$$

- Suposições:

Complementando o mosto com 0,50 g/L de nutriente comercial A, obtem-se uma quantidade total de fósforo de 0,2995 g/L. Quantidade esta que está na faixa admissível da Tabela 3:

$$\begin{array}{ccc} 530 \text{ g de P}_2\text{O}_5 & \times & 1000 \text{ g de nutriente comercial A} \\ y & & 0,50 \text{ g de nutriente comercial A} \end{array}$$

$$y = 0,265 \text{ g de P}_2\text{O}_5$$

$$\text{Total de P}_2\text{O}_5 \text{ no mosto: } 0,265 + 0,0345 = 0,2995 \text{ g/L}$$

Quantidade de nutriente comercial A adicionada ao mosto de caldo de cana a 14°Brix (g/L)	Total de P ₂ O ₅ no mosto (g/L)
0,50	0,2995
1,00	0,5645
2,00	1,0945

As concentrações do nutriente comercial A testadas foram baseadas na Tabela 3, e os cálculos foram realizados baseando-se no composto presente em maior quantidade (P₂O₅) na composição do nutriente A.

APÊNDICE B5: CÁLCULO DO NUTRIENTE B PARA COMPLEMENTAÇÃO DO MOSTO DE CALDO DE CANA A 14°BRIX.

- Concentração de nitrogênio presente no mosto (Tabela 5):

$$0,022 \frac{mL \text{ de nitrogênio}}{mL} \times 1,250 \frac{g}{L} = 0,0275 \text{ g/L}$$

- Quantidade de nitrogênio no nutriente B (Tabela 4):

$$234 \frac{g \text{ de fósforo}}{Kg \text{ de nutriente}}$$

- Segundo Amorim (1977) e Lima (1953,1962) (Tabela 3):

$$40 - 5900 \text{ mg/L} \Rightarrow 0,04 - 5,9 \text{ g/L}$$

- Suposições:

Complementando o mosto com 0,50 g/L de nutriente comercial B, obtem-se uma quantidade total de nitrogênio de 0,1445 g/L. Quantidade esta que está na faixa admissível da Tabela 3:

$$\begin{array}{r} 234 \text{ g de N} \\ y \end{array} \begin{array}{l} \diagdown \\ \diagup \end{array} \begin{array}{l} 1000 \text{ g de nutriente comercial B} \\ 0,50 \text{ g de nutriente comercial B} \end{array}$$

$$y = 0,117 \text{ g de N}$$

$$\text{Total de N no mosto: } 0,117 + 0,0275 = 0,1445 \text{ g/L}$$

Quantidade de nutriente comercial B adicionada ao mosto de caldo de cana a 14°Brix (g/L)	Total de N no mosto (g/L)
0,50	0,1445
1,00	0,2615
2,00	0,4955
3,00	0,7295
4,00	0,9635
5,00	1,1975

As concentrações do nutriente comercial B testadas foram baseadas na Tabela 3, e os cálculos foram realizados baseando-se no composto presente em maior quantidade (N) na composição do nutriente B.

APÊNDICE B6: CÁLCULO DO NUTRIENTE C PARA COMPLEMENTAÇÃO DO MOSTO DE CALDO DE CANA A 14°BRIX.

- Concentração de nitrogênio presente no mosto (Tabela 5):

$$0,022 \frac{mL \text{ de nitrogênio}}{mL} \times 1,250 \frac{g}{L} = 0,0275 \text{ g/L}$$

- Quantidade de nitrogênio no nutriente C (Tabela 4):

$$288 \frac{g \text{ de fósforo}}{Kg \text{ de nutriente}}$$

- Segundo Amorim (1977) e Lima (1953,1962) (Tabela 3):

$$40 - 5900 \text{ mg/L} \Rightarrow 0,04 - 5,9 \text{ g/L}$$

- Suposições:

Complementando o mosto com 0,50 g/L de nutriente comercial C, obtem-se uma quantidade total de nitrogênio de 0,1715 g/L. Quantidade esta que está na faixa admissível da Tabela 3:

$$\begin{array}{r} 288 \text{ g de N} \\ y \end{array} \begin{array}{c} \diagdown \\ \diagup \end{array} \begin{array}{l} 1000 \text{ g de nutriente comercial C} \\ 0,50 \text{ g de nutriente comercial C} \end{array}$$

$$y = 0,144 \text{ g de N}$$

$$\text{Total de N no mosto: } 0,144 + 0,0275 = 0,1715 \text{ g/L}$$

Quantidade de nutriente comercial C adicionada ao mosto de caldo de cana a 14°Brix (g/L)	Total de N no mosto (g/L)
0,50	0,1715
1,00	0,3155
2,00	0,6035
3,00	0,8915
4,00	1,1795
5,00	1,4675

As concentrações do nutriente comercial B testadas foram baseadas na Tabela 3, e os cálculos foram realizados baseando-se no composto presente em maior quantidade (N) na composição do nutriente C.