



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

LARISSA GABRIELE SILVA SILVEIRA

**Avaliação da composição mineral do mosto de cana de açúcar no
desempenho fermentativo com cultura mista de leveduras
Saccharomyces cerevisiae diagnóstico e solução de problemas
relacionados a produção industrial de etanol**

GOIÂNIA

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

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

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

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

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

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

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

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

2. Nome completo do autor

Larissa Gabriele Silva Silveira

3. Título do trabalho

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MINERAL DO MOSTO DE CANA DE AÇÚCAR NO DESEMPENHO FERMENTATIVO COM CULTURA MISTA DE LEVEDURAS *Saccharomyces cerevisiae* Diagnóstico e solução de problemas relacionados a produção industrial de etanol

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

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

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

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

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;

- Publicação da dissertação/tese em livro.

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



Documento assinado eletronicamente por **Gabriel Luis Castiglioni, Professor do Magistério Superior**, em 10/04/2023, às 07:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Larissa Gabriele Silva Silveira, Discente**, em 22/04/2023, às 17:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3650012** e o código CRC **495E515F**.

LARISSA GABRIELE SILVA SILVEIRA

**Avaliação da composição mineral do mosto de cana de açúcar no
desempenho fermentativo com cultura mista de leveduras
Saccharomyces cerevisiae diagnóstico e solução de problemas
relacionados a produção industrial de etanol**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás (UFG), como requisito para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química.

Área de concentração: Desenvolvimento de processos

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Luis Castiglioni
Coorientadora: Prof^a. Dra. Fernanda Ferreira Freitas

GOIÂNIA

2022

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

Silveira, Larissa Gabriele Silva

Avaliação da composição mineral do mosto de cana de açúcar no desempenho fermentativo com cultura mista de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* diagnóstico e solução de problemas relacionados a produção industrial de etanol [manuscrito] / Larissa Gabriele Silva Silveira. - 2022.
xvi, 82 f.

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Luis Castiglioni; co-orientadora Dra. Fernanda Ferreira Freitas.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Goiânia, 2022.

Bibliografia. Anexos. Apêndice.

Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Produção de etanol. 2. Fermentação industrial. 3. Levedura selvagem. 4. Nutrientes minerais. 5. *Saccharomyces cerevisiae*. I. Castiglioni, Gabriel Luis, orient. II. Título.

CDU 66.0



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE QUÍMICA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº **50-A** da sessão da Defesa de Mestrado de **Larissa Gabriele Silva Silveira**, que confere o título de **Mestra em Engenharia Química**, na área de concentração em **Desenvolvimento de Processos**.

Aos **16 (dezesseis) dias do mês de dezembro de 2022 (dois mil e vinte e dois)**, a partir das **09h30m**, via **videoconferência**, realizou-se a sessão pública da Defesa de Mestrado intitulada "**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MINERAL DO MOSTO DE CANA DE AÇÚCAR NO DESEMPENHO FERMENTATIVO COM CULTURA MISTA DE LEVEDURAS Saccharomyces cerevisiae Diagnóstico e solução de problemas relacionados a produção industrial de etanol**". Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, **Prof. Dr. Gabriel Luis Castiglioni (UFG)**, com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Prof. Dr. Franciolo Vendruscolo (EA-UFG)** e **Prof. Dr. Eloizio Júlio Ribeiro (UFU)**. Durante a arguição os membros da banca não fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Defesa de Mestrado, tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Prof. Dr. Gabriel Luis Castiglioni, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos 16 (dezesseis) dias do mês de dezembro de 2022 (dois mil e vinte e dois).

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Gabriel Luis Castiglioni, Professor do Magistério Superior**, em 10/04/2023, às 07:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Franciolo Vendruscolo, Professor do Magistério Superior**, em 10/04/2023, às 11:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3649992** e o código CRC **2CD15A3B**.

Referência: Processo nº 23070.064873/2022-36

SEI nº 3649992



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

DESPACHO

Atesto, na condição de presidente da banca examinadora, conforme o item 04 da instrução normativa da PRPG nº 001, de 27 de março de 2020, que o **Prof. Dr. Eloizio Júlio Ribeiro (UFG)**, participou como membro avaliador da banca examinadora de defesa de doutorado intitulada "AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MINERAL DO MOSTO DE CANA DE AÇÚCAR NO DESEMPENHO FERMENTATIVO COM CULTURA MISTA DE LEVEDURAS *Saccharomyces cerevisiae* Diagnóstico e solução de problemas relacionados a produção industrial de etanol" da discente **Larissa Gabriele Silva Silveira**, ocorrida aos 16 (dezesesseis) dias do mês de dezembro de 2022 (dois mil e vinte dois). Essa declaração se fez necessária em virtude da indisponibilidade da assinatura do professor supracitado no Sistema Eletrônico de Informações (SEI) da UFG.

Prof. Dr. Gabriel Luis Castiglioni (UFG)

Presidente da Banca Examinadora



Documento assinado eletronicamente por **Gabriel Luis Castiglioni, Coordenador**, em 13/01/2023, às 17:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3453479** e

o código CRC **CD505718**.

“A essência da vida é andar para a frente; sem possibilidade de fazer ou intentar marchar atrás. Na realidade, a vida é uma rua de sentido único”.
(Agatha Christie)

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora por ter me amparado nos muitos momentos em que pensei em desistir, por ter me guiado, me capacitado e me agraciado com sabedoria, resiliência e luz.

A minha mãe Marta pelo seu amor, companheirismo, apoio, orações e conselhos esperançosos.

Ao meu pai Jucio por acreditar no meu potencial, me ajudar em todos os momentos e realizar este mestrado junto comigo ao me levar todos os dias para o laboratório.

Ao meu irmão Lucas pelas palavras fraternas, atenção, presença diária e conversas.

A toda minha família pelo apoio, incentivo e compreensão nos momentos de ausência. Obrigada pelo carinho, por serem sempre meus maiores incentivadores e pelo amor genuíno nos mais simples momentos.

A Jéssica, Luiza e Neide que no início desta caminhada me deram apoio, atenção, carinho e momentos extraordinários.

Ao meu orientador Prof. Dr. Gabriel pela paciência, pela ajuda em tantos momentos, pelos conselhos generosos e contribuições cruciais.

A minha coorientadora Prof. Dra. Fernanda pela dedicação, orientação, cuidado e paciência durante todo o mestrado.

Aos professores do PPGEQ-UFG por todo o conhecimento compartilhado e aos professores Dr. Bruno, Dra. Inti e Dra. Tatianne pelas importantes contribuições e sugestões no desenvolvimento da pesquisa.

Aos técnicos Anna Paula, Deivis, Jussara e Taís por todo suporte, ajuda e atenção.

A Thairyne, Maria e Janyne por toda ajuda no desenvolvimento do trabalho, pelos momentos divertidos e pelas conversas compartilhadas.

Ao Lado i, especialmente ao Altino e ao Eduardo, pela oportunidade de aprender e ensinar a todo momento e por acreditarem no meu potencial.

A UFG pela estrutura e recursos oferecidos para a realização deste trabalho, e a CAPES pelo auxílio financeiro.

A todos que passaram, ficaram, permaneceram e de alguma forma contribuíram para que eu chegasse aqui. Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A Agência Internacional de Energia estima que o etanol proveniente da cana-de-açúcar reduz em 89% a emissão de gases de efeito estufa. O Brasil, mesmo ocupando o segundo lugar na geração global de etanol, ainda precisa crescer nos próximos anos para atingir as metas de descarbonização propostas pela Política Nacional de Biocombustíveis. Por mais que o processo de produção esteja consolidado, sua eficiência e melhoria dependem do papel desempenhado por diversos fatores, entre eles a fermentação. As cepas industriais são inoculadas no meio devido suas boas características fermentativas, entretanto, pode ocorrer a entrada ou surgimento de microrganismos contaminantes, que são chamados de leveduras selvagens. O processo requer uma vasta gama de minerais para atingir o rendimento adequado por isso, níveis adequados de macro e micronutrientes no meio permitem o bom funcionamento do metabolismo celular, a manutenção da viabilidade fermentativa e impedem o desenvolvimento das leveduras selvagens. Em vista disso, este estudo propõe a análise dos efeitos dos nutrientes minerais na fermentação dos açúcares contidos no caldo de cana-de-açúcar com cultura mista de leveduras industriais e selvagem. As leveduras industriais da espécie *Saccharomyces cerevisiae* BG-1, CAT-1, FT-858L e PE-2, e a levedura floculante selvagem isolada do processo produtivo de uma usina de etanol do estado de Goiás, chamada LFS, foram identificadas conforme suas características macromorfológicas no crescimento das colônias em placas. Para garantir a reprodutibilidade experimental, o mosto sintético com 16% de açúcares (m/v) foi usado, e sua caracterização por cromatografia líquida de alta performance identificou os açúcares residuais, glicerol, etanol e ácido acético, usados como parâmetros fermentativos. O teor mineral foi quantificado pela espectrometria de absorção atômica. Os ensaios foram conduzidos com 30% da levedura selvagem e 17,5% de cada levedura industrial, durante 72 horas, com 2,5 mL do mosto sintético, o inóculo preparado a partir da raspagem das cepas presentes nas placas de manutenção e a solução mineral. A influência dos íons Ca, Fe, Cu, K, P, N, S e Mg foi avaliada ao final da fermentação com base na dinâmica populacional da colônia, no consumo de açúcares e na produção de etanol. Os ensaios mostraram que nitrogênio, magnésio, enxofre e cobre favorecem a fermentação, enquanto cálcio, fósforo e ferro são mais prejudiciais ao processo. Para avaliar a relação entre os minerais danosos fez-se um delineamento de mistura *simplex-látice* com 3 componentes e observou-se que o cálcio isoladamente é o elemento mais prejudicial ao meio. Outro delineamento de mistura do tipo *simplex-centróide* foi realizado com os 4 elementos identificados como favoráveis em meios suplementados com cálcio e observou-se uma redução de 67% da contaminação inicial gerada pela interação entre N, Mg e S. Experimentos com mosto natural também foram realizados e comprovaram a redução em 48% ocasionada pela suplementação de nitrogênio, magnésio e enxofre. Assim, observa-se melhor eficiência fermentativa a partir da suplementação mineral de nitrogênio, magnésio e enxofre, com redução dos níveis de contaminação e aumento do rendimento de etanol, e sugere-se o a adição destes minerais em etapa industrial ou prematuramente no cultivo da cana a partir do uso de fertilizantes.

Palavras Chaves: produção de etanol, fermentação industrial, leveduras selvagens, nutrientes minerais.

ABSTRACT

The International Energy Agency estimates that ethanol from sugar cane reduces the emission of greenhouse gases by 89%. Brazil ranks second in world production of ethanol but still needs to improve in the coming years to reach the decarbonization targets proposed by the National Biofuel Policy. However, the process is consolidated the ethanol production improvement depends on the role performed by several factors as fermentation. Industrial yeasts are inoculated in the fermentation owing to their great fermentation characteristics but it may happen the entrance or appearance of contaminating microorganisms which are called wild yeasts. The process requires a wide range of minerals to reach adequate efficiency and a correct range of macro and micronutrients in the fermentation may improve the functioning of cellular metabolism and prevent the development of wild yeasts. This study aims to analyze the effects of mineral nutrients on ethanol production from synthetic sugarcane juice and a mixed culture of industrial and wild yeast. The industrial yeasts BG-1, CAT-1, FT-858L and PE-2 of the species *Saccharomyces cerevisiae* were used and the wild yeast was isolated from an Alcohol Power Plant in Goiás and called LFS. The yeasts were identified according to their macromorphological characteristics in the growth of colonies on plates. To assure the experimental reproducibility the synthetic sugarcane juice was used with 16% of sugars (m/v). The fermentation essays were evaluated by high performance liquid chromatography and residual sugars, glycerol, ethanol and acetic acid quantified. Minerals were quantified by atomic absorption spectrometry. The tests were carried out in the proportion of 30% of the wild yeast and 17.5% of each industrial yeast for 72 hours at 30°C with 2.5 mL of the synthetic sugarcane juice. The inoculum was prepared from the scraping of the yeast present in the sterile plates and the solution mineral was added for the supplementation. The influence of Ca, Fe, Cu, K, P, N, S and Mg ions was evaluated at the end of fermentation through colony population dynamics, sugar residual and ethanol production. The tests showed that nitrogen, magnesium, sulfur and copper favor fermentation while calcium, phosphorus and iron are more prejudicial to the process. To evaluate the relationship between the prejudicial minerals was carried out a *simplex-lattice* mixture design with 3 components and results showed that excess calcium is prejudicial to ethanol production. Another *simplex-centroid* mixture design was carried out with the 4 elements identified as favorable in synthetic sugarcane juice with calcium excess and the contamination decreased by 67% with supplementation of nitrogen, magnesium and sulfur. Tests in natural sugarcane juice showed that reduction of contaminating was by 48% and confirmed that nitrogen, magnesium and sulfur are favorable to inhibit wild yeast growth. In conclusion, the tests demonstrated that supplementation of nitrogen, magnesium and sulfur reduces the contamination and increases ethanol production. As a suggestion, the addition of fertilizers with these minerals during the cultivation of sugarcane or in start fermentation may help to improve the industrial process.

Keywords: ethanol production, industrial fermentation, wild yeasts, mineral nutrients.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE QUADROS	xv
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo Geral	3
2.2. Objetivos Específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. Produção Brasileira de Etanol	5
3.1.1. Contexto Histórico e Econômico.....	5
3.1.2. Perspectivas e Desafios	8
3.2. Processo Produtivo de Etanol	10
3.2.1. Fermentação Alcoólica.....	13
3.2.2. Processo Bioquímico	14
3.2.3. Interações Microbianas	16
3.3. Nutrientes minerais	19
3.3.1. Nitrogênio	21
3.3.2. Fósforo.....	22
3.3.3. Potássio	22
3.3.4. Cálcio	23
3.3.5. Magnésio.....	24
3.3.6. Enxofre	24
3.3.7. Cobre	25
3.3.8. Ferro	25
3.4. Otimização do Processo Fermentativo	26
3.4.1. Planejamento Experimental de Mistura.....	27
3.4.2. Parâmetros Cinéticos da Fermentação	28
4. METODOLOGIA	29
4.1. Caracterização e manutenção das leveduras	30
4.2. Preparo do mosto sintético e quantificação do teor mineral	31
4.3. Determinação da suplementação mineral	32

4.4. Experimentos preliminares com suplementação mineral para avaliação do desempenho fermentativo	33
4.5. Avaliação dos experimentos preliminares	34
4.5.1. Determinação da concentração celular e da dinâmica populacional	34
4.5.2. Determinação de metabólitos e açúcares residuais	34
4.6. Determinação dos minerais menos favoráveis ao processo fermentativo de produção do etanol utilizando mosto sintético	35
4.7. Determinação dos minerais mais favoráveis ao processo fermentativo de produção do etanol utilizando mosto sintético	36
4.8. Determinação do cenário fermentativo mais favorável a produção de etanol utilizando mosto natural	37
4.9. Determinação dos parâmetros cinéticos de fermentação	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1. Caracterização morfológicas das leveduras	39
5.2. Análise da concentração mineral em mosto sintético para determinação da suplementação mineral	40
5.3. Avaliação da produção de etanol e dinâmica populacional nos estudos preliminares de suplementação mineral	41
5.4. Determinação do pior cenário fermentativo a partir do delineamento de mistura com os minerais menos favoráveis obtidos nos experimentos preliminares suplementados	47
5.5. Solução do pior cenário fermentativo a partir do delineamento de mistura com os minerais mais favoráveis obtidos nos experimentos preliminares suplementados	52
5.6. Utilização dos minerais benéficos ao desempenho fermentativo em mosto natural com cálcio em excesso e presença de levedura contaminante	59
6. CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXOS	77
APÊNDICE	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Evolução do cultivo de cana-de-açúcar e da produção total de etanol entre as safras 2000/2001 e 2010/2011.....	6
Figura 2 - Venda de etanol hidratado e de gasolina C em milhões de m ³ de 2017 a 2021*.....	7
Figura 3 - Produção mundial do etanol combustível dividido por região.	9
Figura 4 - Esquema simplificado do processo de produção de etanol a partir da cana-de-açúcar.	11
Figura 5 - Síntese do etanol na célula de levedura.	15
Figura 6 - Fluxograma com as descrições das etapas executadas no presente trabalho.	29
Figura 7 - Leveduras usadas nos ensaios fermentativos sendo, (A) leveduras industriais em proporções iguais de BG-1, CAT-1, FT-858L e PE-2, (B) levedura LFS.	39
Figura 8 - Desempenho fermentativo dos ensaios suplementados com minerais em cultura mista de leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e levedura selvagem LFS a partir da (A) produção de etanol, (B) consumo de sacarose, (C) concentração celular, (D) nível de contaminação, (E) produção de glicerol e (F) glicose residual.....	41
Figura 9 - Curvas de nível para a (A) contaminação e a (B) produção de etanol nos 10 ensaios realizados conforme o delineamento de mistura <i>simplex-látice</i> para cálcio, fósforo e ferro..	50
Figura 10 - Curvas de nível para a contaminação nos ensaios do delineamento de mistura <i>simplex-centróide</i> para (A) nitrogênio, enxofre e magnésio, (B) nitrogênio, cobre e magnésio, (C) nitrogênio, cobre e enxofre e (D) magnésio, cobre e enxofre.	57
Figura 11 - Curvas de nível para a produção de etanol nos ensaios do delineamento de mistura <i>simplex-centróide</i> para (A) nitrogênio, enxofre e magnésio, (B) nitrogênio, cobre e magnésio, (C) nitrogênio, cobre e enxofre e (D) magnésio, cobre e enxofre.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Microrganismo utilizados nos ensaios fermentativos.....	30
Tabela 2 - Meio de cultura GPY sólido.	31
Tabela 3 - Meio de cultura GPY líquido.....	31
Tabela 4 - Concentrações de cada mineral suplementado nos experimentos preliminares. ...	32
Tabela 5 - Concentração de minerais (g.L^{-1}) utilizadas em mosto sintético para avaliação dos parâmetros fermentativos de produção de etanol na presença de levedura contaminante.....	33
Tabela 6 - Matriz real e codificada do delineamento de mistura <i>simplex-lattice</i> usando os minerais cálcio, fósforo e ferro para determinar o cenário menos benéfico ao desempenho fermentativo.	35
Tabela 7 – Matriz real e codificada do delineamento de mistura <i>simplex-centróide</i> usando os minerais nitrogênio, magnésio, enxofre e cobre para determinar a composição mais benéfica ao desempenho fermentativo.	36
Tabela 8 - Concentrações de minerais no mosto sintético e concentrações recomendadas por Lima (2019).	40
Tabela 9 – Valores reais e codificados, contaminação, concentração celular, fator de conversão de substrato a células ($Y_{X/S}$), concentração final de etanol, fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$), produtividade (\emptyset), eficiência fermentativas (η) e sacarose residual, para os ensaios do delineamento de mistura com cálcio, fósforo e ferro.	48
Tabela 10 - Residual quadrático médio (MSR), coeficientes de determinação experimental (R^2) e coeficientes de determinação ajustados (R_A^2) para os modelos linear, quadrático e cúbico no delineamento do tipo <i>simplex-lattice</i> , e avaliados para o grau de contaminação e a produção de etanol.....	49
Tabela 11 - Modelos matemáticos para o grau de contaminação e a produção de etanol em função da concentração mineral de cálcio (x_1), fósforo (x_2) e ferro (x_3).	50
Tabela 12 – Comparação entre os valores experimentais e preditos para o grau de contaminação e a produção de etanol nos ensaios do delineamento <i>simplex-lattice</i>	51
Tabela 13 - Valores reais e codificados, contaminação, concentração celular, fator de conversão de substrato a células ($Y_{X/S}$), concentração final de etanol, fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$), produtividade (\emptyset), eficiência fermentativas (η) e sacarose residual, para os ensaios do delineamento de mistura com nitrogênio, magnésio, enxofre e cobre.	53

Tabela 14 - Residual quadrático médio (MSR), coeficientes de determinação experimental (R^2) e coeficientes de determinação ajustados (R_A^2) para os modelos linear, quadrático e cúbico no delineamento do tipo *simplex-centróide*, e avaliados para o grau de contaminação e a produção de etanol.....56

Tabela 15 - Modelos matemáticos para o grau de contaminação e a produção de etanol em função da concentração mineral de nitrogênio (x_1), magnésio (x_2), enxofre (x_3) e cobre (x_4).56

Tabela 16 - Comparação entre as concentrações minerais do mosto natural e do mosto sintético.....59

Tabela 17 - Concentração mineral dos ensaios realizados em mosto natural ($g.L^{-1}$).....60

Tabela 18 - Contaminação, concentração celular, fator de conversão de substrato a células ($Y_{X/S}$), concentração final de etanol, fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$), produtividade (\emptyset), eficiência fermentativas (η) e consumo de açúcares, para os ensaios com mosto natural.....61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Composição molecular de leveduras industriais..... 19

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADP Adenosina Difosfato

ATP Adenosina Trifosfato

BG-1 *Saccharomyces cerevisiae* BG-1

CaO Óxido de Cálcio

CAT-1 *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1

CO₂ Dióxido de Carbono

CONAB Comissão Nacional de Abastecimento

CuSO₄ Sulfato de Cobre

FeSO₄ Sulfato Ferroso

FT-858L *Saccharomyces cerevisiae* FT-858L

GEE Gases do Efeito Estufa

HPLC *High Performance Liquid Chromatography*

IAA Instituto do Açúcar e do Alcool

KH₂PO₄ Fosfato de Potássio

MgSO₄ Sulfato de Magnésio

NH₄⁺ Cátion Amônio

NH₄Cl Cloreto de Amônio

PE-2 *Saccharomyces cerevisiae* PE-2

1. INTRODUÇÃO

O destaque às políticas internacionais, como o Acordo de Paris, demonstra a preocupação global em assumir compromissos atuais e futuros com o clima e a preservação ambiental (Araújo et al., 2020). A iminente necessidade de reduzir os gases de efeito estufa e adotar fontes de energias renováveis coloca a produção brasileira de etanol como uma boa alternativa para essas questões (Fazzi et al., 2020).

Mesmo com o maior índice produtivo da história na safra 2019/20, a Política Nacional de Biocombustíveis estima que a produção brasileira de etanol ainda precisa crescer 82% até 2026 para atingir as metas de descarbonização do programa RenovaBio (CONAB, 2020; Nova Cana, 2021). Um dos meios para aumentar a produtividade, sem expansão das áreas de cultivo, é o melhoramento do desempenho das células de levedura combinado com os fatores que proporcionem maior síntese de etanol (Santos, 2017).

A produção do etanol ocorre por meio da fermentação dos açúcares contidos no caldo de cana-de-açúcar ou melaço, e nas destilarias brasileiras é conduzido utilizando leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* como microrganismos de cultura pura (Basso et al., 2011). No entanto, o caldo natural já possui microrganismos selvagens que interferem na fermentação, sendo de fundamental importância analisá-los para evitar problemas tais como diminuição da viabilidade celular, floculação do fermento e queda no rendimento industrial (Amorim, Basso e Lopes, 2009).

O crescimento da levedura está intimamente relacionado ao meio fermentativo e conseqüentemente à formação do produto (Amorim e Lopes, 2013). Dessa forma, além de analisar o relacionamento das leveduras de cultura pura e selvagem, micro e macronutrientes podem ser adicionados ao mosto para elevar a conversão dos açúcares a etanol (De Souza et al., 2015).

Como a concentração de nutrientes minerais e diversos fatores como temperatura, pressão osmótica, pH, nutrientes orgânicos, concentração celular e inibidores afetam a fermentação, a compreensão do papel dos íons metálicos torna-se difícil neste cenário tão complexo (Ferreira, 2015).

Apesar de estudos na área já revelarem a redução da viabilidade celular quando potássio, cálcio e alumínio estão presentes no meio em quantidades excessivas, ainda não se conhece totalmente os efeitos destes e outros íons, e como a sua combinação afeta o processo fermentativo (Schmidell et al, 2001).

Souza (2012) observou que meios enriquecidos com nitrogênio aumentaram o rendimento do etanol, que o fósforo, quando em excesso, não gera diferenças significativas à fermentação, e que o magnésio é o mineral que mais contribui com o metabolismo fermentativo da levedura. Contrapondo, Ferreira (2015) observa que o magnésio inibe o crescimento celular e reduz a produção do etanol.

Assim também, quando Azenha, Vasconcelos e Moradas (2000) aumentaram a concentração do cobre no meio de 11,43 mg.L⁻¹ para 43,2 mg.L⁻¹, geraram o dobro de etanol e observaram ainda uma redução da velocidade fermentativa. Isso mostra que além de analisar a concentração ótima para cada mineral também é preciso observar as consequências nos demais fatores.

Diante da importância do etanol no mercado brasileiro, é importante averiguar como os nutrientes minerais afetam o rendimento final, bem como suas dosagens ideais, concentrações máximas e mínimas, diante das linhagens puras e selvagens empregadas no processo.

A avaliação da suplementação mineral visa melhorar o rendimento fermentativo e evitar prejuízos nas usinas de etanol considerando, principalmente, os grandes volumes de produção atuais e futuros. Com todo o exposto acima, a abordagem do estudo sobre os efeitos da suplementação mineral no desempenho fermentativo de uma cultura mista de leveduras torna-se justificável.

Dessa forma, este trabalho teve por objetivo fermentar o mosto sintético, com aproximadamente 16% de açúcares (m/v), com uma cultura mista de leveduras do gênero *Saccharomyces cerevisiae* e suplementado com soluções minerais, e avaliar a produção de etanol e as condições de contaminação no processo pela dominância de linhagens selvagem.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a influência da concentração de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, ferro e cobre nos parâmetros fermentativos na produção de etanol e na dinâmica populacional das leveduras utilizadas no processo.

2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar as leveduras usadas na fermentação por meio das suas características macromorfológicas;
- Determinar as concentrações de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, ferro e cobre presentes no mosto natural e sintético utilizado no processo de produção de etanol;
- Avaliar a suplementação de minerais no mosto sintético no que diz respeito a concentração celular, consumo de açúcares, produção de etanol e ácido acético;
- Verificar a dinâmica populacional das leveduras industriais e selvagem nas fermentações com e sem suplementação de minerais;
- Determinar quais minerais atuam de maneira benéfica ou prejudicial no processo de produção de etanol a partir da comparação entre os resultados encontrados nas fermentações com e sem suplementação de minerais;
- Elaborar um delineamento de mistura com mosto sintético de cana-de-açúcar para monitorar a dinâmica populacional e as concentrações de açúcares, etanol, glicerol e ácido acético nas fermentações com minerais que mais influenciam negativamente o processo de produção de etanol;
- Definir a partir do delineamento de mistura o cenário fermentativo menos favorável ao processo de produção de etanol;
- Elaborar um delineamento de mistura com mosto sintético de cana-de-açúcar para monitorar a dinâmica populacional e as concentrações de açúcares, etanol, glicerol e ácido acético nas fermentações com minerais que mais influem positivamente o processo de produção de etanol;
- Definir a partir do segundo delineamento de mistura o cenário fermentativo mais favorável ao processo de produção de etanol;

- Avaliar os melhores resultados obtidos no segundo delineamento de mistura em fermentações com mosto natural;
- Avaliar e comparar os parâmetros cinéticos de eficiência fermentativa, produtividade, fator de conversão de substrato a células e fator de conversão de substrato em produto, nas diferentes fermentações realizadas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Produção Brasileira de Etanol

3.1.1. Contexto Histórico e Econômico

O cultivo da cana-de-açúcar em grande parte do nordeste brasileiro fez do país o principal produtor e exportador de açúcar durante os séculos XVI e XVII. A ampliação do mercado, aumento da concorrência, transições políticas e transferência de cultivos estagnou a produção que só viria a mudar após a crise financeira de 1929 (Furtado, Scandiffio e Cortez, 2011; Machado, 2018).

A criação do Instituto do Açúcar e do Alcool (IAA) em 1933 e o surgimento da primeira usina brasileira de etanol direcionou a economia da agroindústria açucareira na tentativa de contornar a queda nas exportações do açúcar. Para estimular o mercado, uma das medidas adotadas na época foi a mistura do etanol à gasolina para potencializar o combustível. Entretanto, a política mostrou-se insuficiente com a deflagração da Segunda Guerra Mundial que evidenciou a dependência nacional por petróleo e seus derivados (Furtado, Scandiffio e Cortez, 2011; Gimenez et al, 2018).

Moraes e Bacchi (2015) afirmam que mesmo diante da sinalização da necessidade de desenvolvimento de um combustível nacional alternativo ao petróleo importado, o término do conflito e consequente normalização dos preços internacionais, oportunizou o mercado mundial de açúcar e estagnou, novamente, o setor sucroalcooleiro. Somente na década de 1970, com a abrupta alteração na economia brasileira por efeito, mais uma vez, da dependência de importação do petróleo, é que surgem políticas voltadas para a substituição do combustível fóssil na frota de automóveis, como a criação do Programa Nacional do Alcool (ProAlcool).

Paulillo et al. (2007) destacam que a ausência de planejamento neste período entre os anos 70 e 80, ocasionado pelo desenvolvimento setorial baseado na lucratividade e concessão de subsídios, contribuíram para a falta de tecnologia e progresso técnico observada nos anos seguintes.

Segundo Furtado, Scandiffio e Cortez (2011), a produção sob demanda negligenciou as deficiências do programa, de modo que a expansão do setor para garantir maior capacidade produtiva, permanecesse atrelada a expansão das áreas de cultivos e a criação de novas usinas. Desse modo, surgem indústrias de etanol principalmente em Goiás e Mato Grosso do Sul, tanto para suprir a produção e demanda doméstica, como pelas oportunidades de investimento, incentivos fiscais e condições endoclimáticas favoráveis à cana-de-açúcar (Granco et al., 2017).

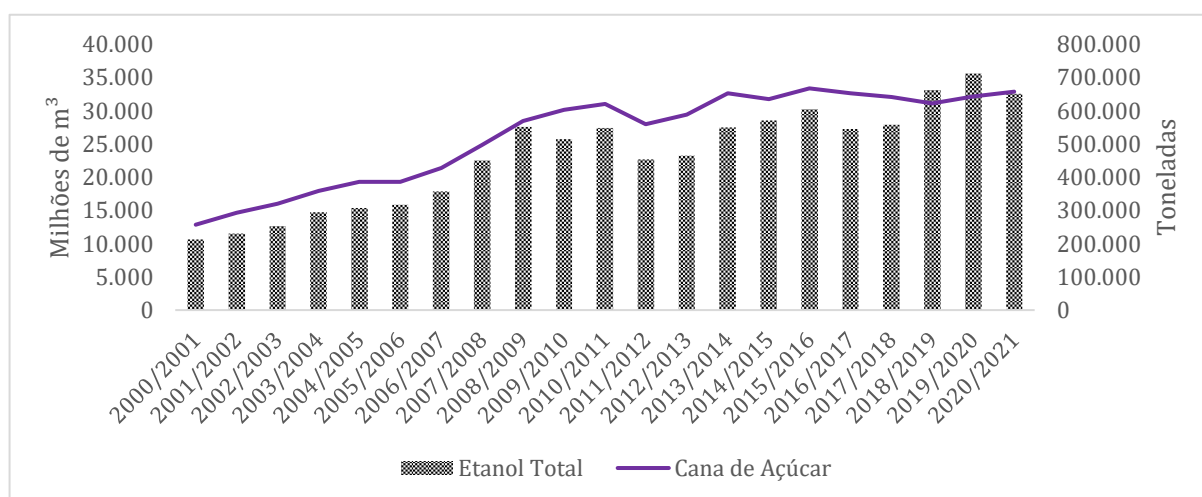
O desenvolvimento tecnológico do setor inicia-se apenas em 1981/82, com foco em pesquisas voltadas para maior eficiência na conversão de sacarose a etanol e com a junção das destilarias às usinas de açúcar, o que culminou em um aumento no quantitativo da cana-de-

açúcar processada de 10% para 70%, e na adoção de uma série de padronizações nas operações (Shikida, De Moraes e Alves, 2004; Paulillo et al., 2007; Gimenez et al., 2018).

Leal (2010 apud Gimenez et al., 2018), destaca que o avanço científico possibilitou uma diminuição considerável do tempo de fermentação de 14h para 8h e um incremento de 5% no rendimento fermentativo. Além disto, a desregulamentação da agroindústria canavieira na década de 1990 contribuiu para ampliar os investimentos privados em pesquisa e a competitividade do álcool brasileiro (Paulillo et al., 2007).

A maior ascensão da indústria sucroalcooleira ocorre na primeira década do século XXI, conforme observado na Figura 1.

Figura 1 - Evolução do cultivo de cana-de-açúcar e da produção total de etanol entre as safras 2000/2001 e 2020/2021.



Fonte: Adaptado de ÚNICA, 2022.

A retração de crescimento, observada na Figura 1, a partir da safra 2008/2009, é descrita por Milanez et al. (2012) como o resultado de grandes investimentos em usinas e canaviais, baseado nas perspectivas de consolidação do mercado internacional de etanol, que não se concretizaram.

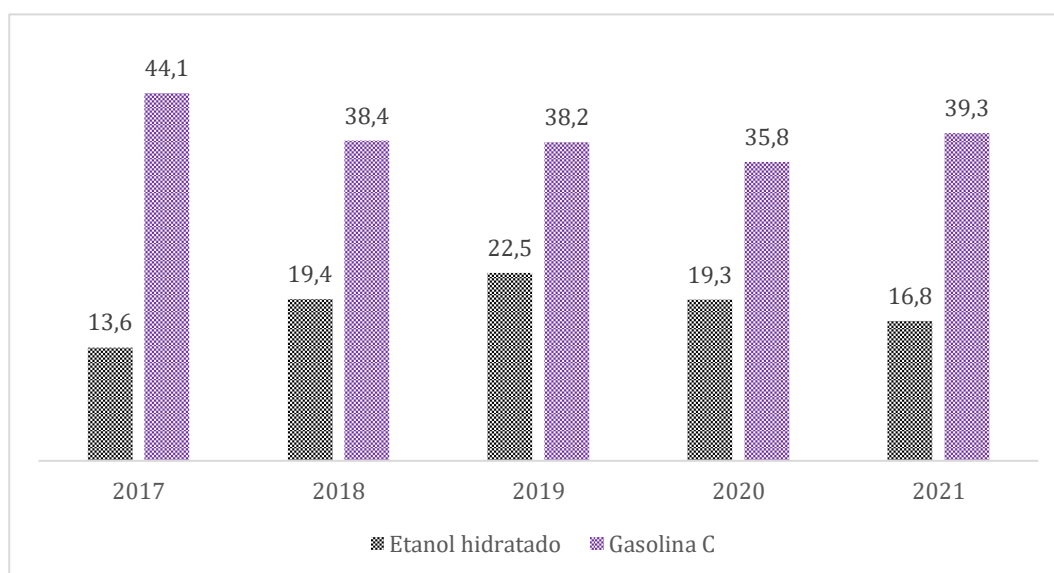
Moraes e Bacchi (2015), ao avaliarem o mercado brasileiro de etanol neste período, elencaram os motivos financeiros, agrônômicos e de mercado que desencadearam a ampliação do setor. Dentre os motivos destacam-se o salto de vendas de automóveis *flex* a partir de 2003, o aumento da demanda interna por etanol, o maior consumo do biocombustível frente a gasolina e a euforia com o possível aumento no volume de exportação (Gilio e Castro, 2017).

A crise econômica global de 2008 refutou as projeções otimistas do setor e causou o endividamento de várias unidades produtivas. Além disso, a política nacional de controle dos preços da gasolina, que estabeleceu um teto de custo para o etanol e reduziu as margens de lucro, restringiram os investimentos ao setor e o colocou em severas dificuldades financeiras (Gilio e De Moraes, 2016).

Em 2015, com o fim da política de manutenção do preço da gasolina e a elevação do percentual de mistura do etanol anidro à gasolina de 25% para 27%, o mercado interno se animou novamente. O aumento do consumo nacional ao longo dos anos fez com que a produção de etanol atingisse a maior marca da história na safra 2019/2020 com 36,5 milhões de m³ (Vidal, 2019, 2021; ÚNICA, 2022).

A pandemia de Covid-19 enfraqueceu outra vez o setor de combustíveis, com a queda da cotação internacional de petróleo e sucessivos cortes no preço nacional da gasolina. Como consequência, houve redução no volume de vendas conforme observado na Figura 2 (Almeida e Do Nascimento, 2021).

Figura 2 - Venda de etanol hidratado e de gasolina C em milhões de m³ de 2017 a 2021*.



Fonte: Adaptado de Vidal, 2021.

* O etanol hidratado é o combustível disponibilizado para o abastecimento de veículos e pode ser usado junto da gasolina, em qualquer proporção, nos chamados veículos *flex*; a gasolina C refere-se a mistura de 27% de etanol anidro à gasolina, conforme determinado pela legislação brasileira.

Mesmo com a retomada econômica acompanhada por uma forte alta no preço da gasolina, o etanol manteve a baixa competitividade com um fechamento em 2021 menor que em 2020. O aumento do dólar favoreceu o mercado de açúcar, elevou o percentual de cana destinada ao produto e reduziu a oferta interna do combustível. A tendência redutiva também é esperada para a safra 2021/2022 assim como a retração do crescimento brasileiro no mercado global de biocombustíveis (Vidal, 2021).

As oscilações ao longo dos anos refletem a fragilidade do mercado de etanol. O sistema de usinas acopladas às destilarias, que alterna a produção de açúcar e etanol de acordo com as oportunidades, é o que viabiliza o setor mesmo diante de crises econômicas e mercados em recuperação (Furtado, Scandiffio e Cortez, 2011).

3.1.2. Perspectivas e Desafios

As unidades sucroalcooleiras não demonstram uniformidade, de modo que a produção brasileira, em suas especificidades gerenciais, apresenta resultados muito distintos. Mesmo com base institucional, capacidade instalada, conhecimento técnico e processo produtivo reconhecidos internacionalmente, a dificuldade em melhorar a eficiência produtiva coloca a produção brasileira diante de grandes obstáculos (Pereira e Silveira, 2016; Vidal, 2019; Cooper, 2021).

Historicamente, a região Centro Sul apresenta maior produtividade agrícola e industrial, menores custos devido à proximidade com o mercado consumidor e processos relativamente mecanizados. As destilarias da região Norte/Nordeste usam tecnologias de mão de obra intensiva, são mais propensas à exportação e encontram dificuldade de se adaptar às imposições de desregulamentação do setor. As diferenças geográficas resultam em interações complexas entre colheita, práticas de pesquisa e desenvolvimento, e colaboração público privada (Paulillo et al., 2007; Compeán e Polenske, 2011).

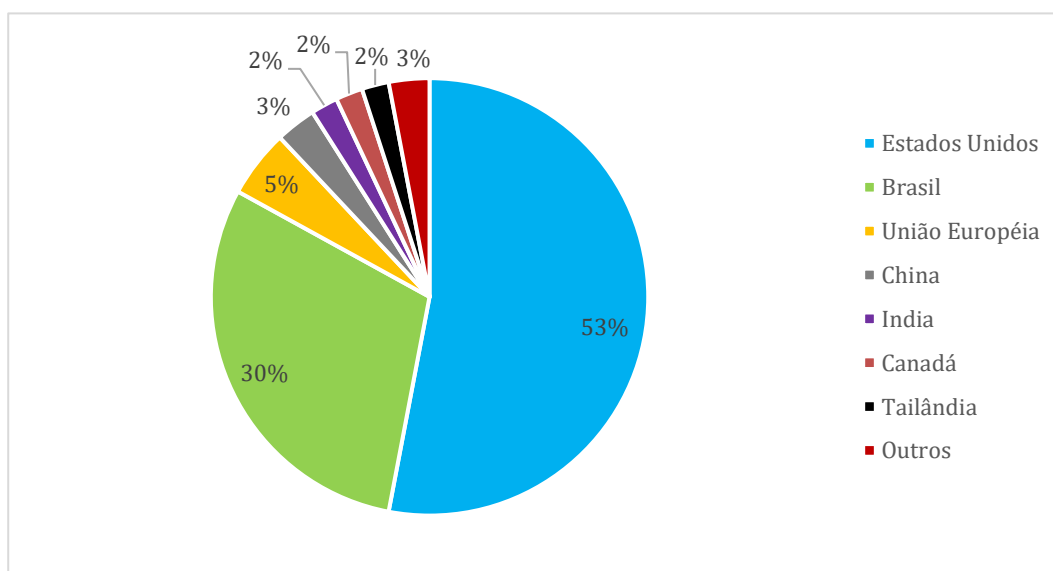
Estudos como de Milanez et al. (2012) e Pereira e Silveira (2016) sugerem que a dependência da expansão de fronteiras agrícolas é um dos principais gargalos do setor, acompanhado pela falta de investimentos voltados a novos processos tecnológicos. O cenário é reforçado por Vidal (2021) e Guo, Song e Buhain (2015) que destacam queda na produtividade em virtude da escassez de chuva e a competição com o setor alimentício e pecuário por áreas de cultivo.

Além das condições climáticas, De Oliveira et al. (2018) destacam ainda as incertezas relacionadas aos preços internacionais do açúcar e as instabilidades políticas, exemplificadas pela limitação do preço do etanol ao equivalente energético de 70% do óleo diesel. As políticas de mistura de etanol à gasolina adotada por vários países são baseadas no volume requerido ou no conteúdo energético. Esta medida não direciona investimentos e não focam no potencial de descarbonização do biocombustível brasileiro (Ebadian et al., 2020).

A Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico - OECD (2021) projeta o crescimento do mercado brasileiro de etanol com base na Política Nacional de Biocombustíveis (RenovaBio) instituída em 2017. O acordo visa reduzir em 43% as emissões de gases do efeito estufa, aumentar a produção de biocombustíveis no país segundo os padrões sustentáveis e reduzir a dependência por combustíveis fósseis até 2030 (Vidal, 2019).

Nos Estados Unidos, o etanol é majoritariamente produzido a partir do milho. Ainda que o produto proveniente da cana-de-açúcar seja sustentável ambientalmente e com custo médio 50% a 60% menor, os subsídios fornecidos especialmente aos EUA contribuem para mantê-lo na liderança da produção conforme disposto na Figura 3 (Manochio et al., 2017).

Figura 3 - Produção mundial do etanol combustível dividido por região.



Fonte: Adaptado de RFA - *Renewable Fuels Association*, 2021.

A produção de etanol brasileira corresponde a 30% do global e a parcela de energia que entra no setor de transporte brasileiro por meio de biocombustíveis é superior a 10% - maior percentual do mundo. Ainda assim, a produção brasileira de etanol é insuficiente para abastecer a demanda interna e o país precisa importar etanol norte americano (Vidal, 2019; OECD e NATIONS, 2021).

Ao longo dos anos, significativos ganhos foram alcançados por meio de pequenas mudanças na condução da operação, limitado investimento científico e nenhuma inovação radical no processo (Furtado, Scandiffio e Cortez, 2011). Tratamentos mais simples como em Rivera et al. (2017), Caspeta et al. (2019) e Pattanakittivorakul et al. (2019) sugerem aumento no rendimento fermentativo. Propostas mais robustas como de Gimenez et al. (2018) e Paz, Garnica e Curbelo (2019) sugerem investimentos na produção do etanol celulósico, a criação de biorrefinarias e o redimensionamento do sistema de resfriamento empregado na produção de etanol para aumentar a produtividade do combustível.

O foco na produtividade é o fator mais importante para garantir a sustentabilidade e viabilidade da produção brasileira de etanol. As perspectivas para o setor de bioenergia e biocombustíveis apontam que etanol e diesel serão os combustíveis dominantes para abastecer carros e veículos pesados até 2050 (Guo, Song e Buhain, 2015; Moraes e Bacchi, 2015).

A constância na matriz energética mundial gera expectativas otimistas para produção e consumo de etanol no Brasil, e possibilidades de estruturação e fortalecimento do setor à nível global (Schutz, Massuquetti e Alves, 2013).

3.2. Processo Produtivo de Etanol

O etanol pode ser obtido pela destilação de materiais com baixo significado econômico que contenham álcool em sua composição, como determinadas castas de bebidas alcoólicas, pela síntese empregando hidrocarbonetos alifáticos não saturados, como acetileno e etileno, que são subprodutos do petróleo, ou ainda pela fermentação de biomassa vegetal sendo chamado de bioetanol (Lima, 2019).

Para que a produção seja viável econômica, operacional e tecnologicamente, é fundamental que haja um sistema industrial apropriado e eficiente, bem como disponibilidade de matéria prima, boa produtividade e duração razoável (Góes-Favoni et al., 2018).

A via fermentativa é predominante no processo produtivo brasileiro, tanto pela capacidade diante do histórico de incentivo à produção de etanol como forma de reaproveitamento da cana-de-açúcar frente as crises no setor açucareiro, quanto pela disponibilidade territorial para o plantio e condições edafoclimáticas favoráveis ao desenvolvimento de diversas culturas (Sanchez e Cardona, 2008; Kohlhepp, 2010).

Lima (2019) destaca que cana-de-açúcar, milho, batata, sorgo e beterraba podem ser usados como matéria prima na fermentação. A cana-de-açúcar produz maior volume de etanol e utiliza de processos biotecnológicos mais simples e de maior controle em comparação a batata e beterraba. Além disso, a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar reduz a emissão de dióxido de carbono e tem custos até 72% menor que o etanol de milho (Zanardi e Júnior, 2016; Cardoso et al., 2020).

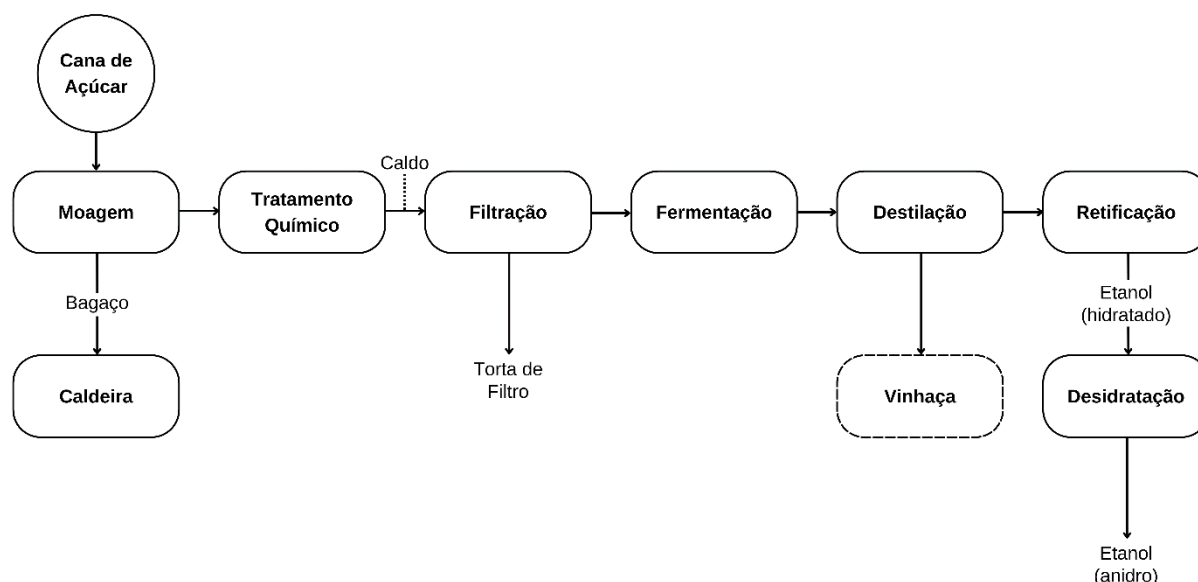
Dada a importância da cana-de-açúcar ao mercado brasileiro, o país é líder global na produção de etanol a partir desta matéria prima, com a ação de microrganismos sobre os açúcares fermentáveis presente no caldo extraído da biomassa, e em processos que podem ser contínuos ou bateladas alimentadas (Abreu-Cavalheiro e Monteiro, 2013).

A suscetibilidade às contaminações microbianas e mutações genéticas de leveduras, assim como o alto custo de implantação, inviabilizam a produção contínua e a tornam pouco usual nas destilarias brasileiras (Lopes et al., 2016a). Ainda assim, Brexó e Sant'ana (2017) ressaltam que o processo contínuo será uma evolução natural do processo descontínuo, com alimentação constante do sistema seguida pela manutenção do volume de reação.

A fermentação descontínua, conhecida como batelada alimentada, é empregada em 83% das usinas de etanol do Brasil em virtude da flexibilidade do processo, do maior controle para favorecer a via metabólica de interesse e da adequação as taxas de alimentação com o propósito de abastecer o biorreator, local onde ocorre a fermentação, com caldo de cana, microrganismos e os suplementos e substratos necessários ao meio (Lopes et al., 2016a; Brexó e Sant'ana, 2017; Lima, 2019).

O fluxograma simplificado apresentado na Figura 4 denota o sistema industrial para beneficiamento da cana-de-açúcar, suprimindo o processo de fabricação de açúcar e a geração de vapor e eletricidade, e salientando o processamento do etanol.

Figura 4 - Esquema simplificado do processo de produção de etanol a partir da cana-de-açúcar.



Fonte: Adaptado de Cruz (2015).

O processo de produção do etanol inicia-se com a colheita da cana e destinação para preparo na indústria dispondo-a em esteiras para limpeza e retirada de impurezas (Zanardi e Junior, 2016; Manochio et al, 2017). Segundo Brexó e Sant’ana (2017), a limpeza com água ocasiona perdas de açúcares fermentáveis e favorece a contaminação microbiana do caldo de cana, sendo a limpeza a seco preferível e profusamente adotada.

Após a limpeza a cana segue para o preparo para a moagem onde é processada em equipamentos como picador e desfibrador, sendo enviada para extração do caldo em um conjunto de várias moendas. O bagaço resultante passa ainda por sistema convencional de embebição com água para recuperar o máximo de sacarose da matéria prima antes de ser destinado às caldeiras para gerar calor, eletricidade e contribuir para que as usinas sucroalcooleiras sejam autossuficientes em energia (Zanardi e Junior, 2016; Manochio et al., 2017).

O caldo extraído é peneirado para eliminar as partículas sólidas e insolúveis. A pasta formada pelas impurezas, chamada de bagacilhos, regressa à moagem e o caldo segue para tratamentos químicos (Zanardi e Junior, 2016; Manochio et al., 2017).

Dentre os tratamentos químicos empregados, Rossetto et al. (2004) apontam que a calagem evita a degradação da sacarose, corrige a acidez, neutraliza os efeitos tóxicos de elementos como alumínio e manganês, fornece bases de cálcio e magnésio, aumenta a disponibilidade de alguns nutrientes e viabiliza a ação microbiana no meio. Góes-Favoni et al. (2018) e Gutierrez (1988) destacam ainda a sulfitação para reduzir a formação de álcoois superiores como isobutílico e n-propílico, devido a ação antimicrobiana para bactérias e leveduras contaminantes, e para geração de SO₂ como forma de inibir o escurecimento do açúcar em unidades integradas.

Manochio et al. (2017) salienta que um dos objetivos da calagem é corrigir o pH e mantê-lo entre 5,6 e 5,8 para minimizar a ação corrosiva nos equipamentos e tubulações, bem como para assegurar a mínima perda de nutrientes no suco.

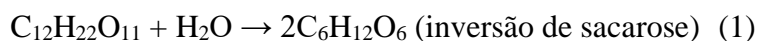
O tratamento térmico também é realizado para concentrar os sólidos solúveis, catalisar a floculação e sedimentação das impurezas, realizar a esterilização do caldo e efetivamente inibir microrganismos contaminantes (Oliva-Neto et al., 2013; Manochio et al., 2017; Góes-Favoni et al., 2018).

Ainda que a fermentação possa ocorrer com o caldo bruto, é comum clarificá-lo por meio da decantação para separar gomas, coloides e materiais nitrogenados com mínima perda de nutrientes essenciais. O caldo clarificado é aquecido para concentrar os sólidos solúveis em torno de 20° Brix para aumentar o teor de açúcares totais e possibilitar uma fermentação com menos espuma e sujeiras (Oliva-Neto et al., 2013; Manochio et al., 2017; Lima, 2019).

O caldo clarificado é resfriado em trocadores de calor e tem sua concentração de açúcares corrigida para compor o mosto. O meio fermentável é constituído pelo caldo de cana clarificado, água e melaço, um subproduto obtido na produção de açúcar e utilizado em unidades produtoras de açúcar e etanol (Góes-Favoni et al., 2018).

Como os açúcares fermentáveis são metabolizados pelas células de leveduras adicionadas nas cubas de fermentação, a concentração de açúcares totais é ajustada entre 16 e 23° Brix para assegurar a produtividade do processo (Brexó e Sant'ana, 2017; Manochio et al., 2017).

A fermentação ocorre de 6 a 11 horas e em temperaturas que variam de 32 a 35°C. Durante o processo, ocorre a hidrólise da sacarose a etanol pela levedura, e o caldo, chamado de vinho fermentado, concentra de 8 a 12% de álcool. As equações 1 e 2, simplificadas de Gay Lussac, demonstram as reações envolvidas durante a formação do etanol (Manochio et al., 2017):



Quando o sistema é alimentado de uma só vez, os açúcares em contato com o meio fermentável começam a se desdobrar pela ação das leveduras em três fases distintas: a fase preliminar caracterizada pela multiplicação de células, a fase tumultuosa com intenso desprendimento de gás carbônico, formação de espuma e aumento da temperatura, e a fase complementar que marca o fim do processo a partir da redução da liberação de gás carbônico e dos açúcares consumíveis. Em bateladas alimentadas, a fase preliminar é praticamente inexistente e a fermentação inicia-se de imediato (Lima, 2019)

Em um processo de fermentação chamado de Melle-Boinot, o vinho fermentado é destinado a centrifugação para separar o vinho produzido do creme de leveduras. As fermentações Melle-Boinot reutilizam e reaproveitam os microrganismos fermentadores a partir da circulação de altas concentrações celulares (Lopes et al., 2016a; Brexó e Sant'ana, 2017; Neitzel et al., 2020).

Neitzel et al. (2020) indicam que a alta concentração de células no início da fermentação é uma das melhores técnicas de otimização a nível industrial por diminuir o tempo do processo e os custos associados à preparação do inóculo, e aumentar a produtividade e a eficiência geral da produção. De acordo com Basso et al. (2008), cerca de 90% dos microrganismos inoculados são reutilizados nas fermentações seguintes e intensamente recicladas no decorrer da operação.

No tratamento ácido, as leveduras são lavadas com ácido sulfúrico diluído, o pH ajustado entre 2 e 2,5 para que os microrganismos indesejados e contaminantes sejam eliminados, e recondicionadas às cubas de fermentação (Basso et al., 2008).

Após a centrifugação o vinho separado do creme de leveduras possui entre 7 e 10% em volume de etanol e outros componentes como glicerol, ácidos orgânicos, gases e açúcares não fermentáveis. Assim, o vinho de levedurado é destinado à destilação para que o álcool seja concentrado e separado (Machado e Abreu, 2006; Brexó e Sant'ana, 2017).

Depois da destilação, o vinho é decomposto em dois fluxos: a vinhaça que é destinada a campos de cultivo para uso como fertilizantes, e a fleuma que segue para o processo de retificação onde o álcool é separado de impurezas como álcoois superiores e ésteres, concentrado e resfriado para resultar no etanol hidratado com 93° INPM usado, por exemplo, como combustível veicular (Zanardi e Junior, 2016; Manochio et al, 2017; Lima, 2019).

Parte do etanol hidratado segue para o processo de desidratação, sendo inserido na unidade desidratadora para a máxima separação de etanol e água, e formação do etanol anidro, comercializado como matéria prima e misturado à gasolina (Zanardi e Junior, 2016).

3.2.1. Fermentação Alcoólica

3.2.1.1. Microrganismo Fermentadores

As leveduras são agentes biologicamente ativos responsáveis pela fermentação alcoólica e, conseqüentemente, pela produção de etanol. Estes microrganismos possuem diâmetro variando entre 1 e 5 μm , comprimento de 5 a 30 μm , e podem se reproduzir por meio de fissão ou brotamento multilateral, ou ainda na forma sexuada por meio de ascósporos (Borzani et al., 2001; Brexó e Sant'ana, 2017; Almeida e Do Nascimento, 2021).

As leveduras são encontradas em diversos meios naturais, caracterizadas por células ovoides, elípticas ou arredondadas, unicelulares, de parede celular rígida, com as mesmas organelas eucarióticas encontradas em outras células superiores e fomentadas pelas suas condições de existência e sobrevivência latentes como temperatura ótima de crescimento de 20° a 30°C, pH entre 3,2 e 6,0 e alta tolerância osmótica (Brexó e Sant'ana, 2017).

Diante do seu papel intrinsecamente ligado ao resultado da operação, conhecer as espécies de leveduras que conduzem a fermentação alcoólica em nível citoplasmático é essencial para potencializar o rendimento do produto (Frota, 2008; Góes-Favoni et al., 2018).

3.2.1.1.1. *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura do gênero *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo eucariota historicamente usado para fabricação de pães, aditivos alimentares ou proteínas heterólogas, e predominantemente utilizadas em fermentações alcoólicas. As cepas *S. cerevisiae* possuem alta capacidade adaptativa para processos em larga escala, flexibilidade no melhoramento genético, rápido crescimento e efetiva capacidade na geração de etanol (Andrietta et al., 2007; Badotti et al., 2008).

Parapouli et al. (2020) destaca que a aplicação industrial da espécie também é viabilizada pela característica chamada “*make-accumulate-consume*”. Esta característica induz a produção e acúmulo de etanol sem inibir ou intoxicar a espécie microbiana. Badotti et al. (2008) reforça que a linhagem demonstra alta habilidade de fermentar açúcares, baixa formação de subprodutos e alto rendimento de biomassa.

As leveduras *Saccharomyces* são definidas como aeróbicas facultativas e podem se adaptar, metabolicamente, a condições de aerobiose e anaerobiose. Entretanto, os microrganismos sofrem perturbações de natureza ambiental durante a fermentação com forte interferência de altas temperaturas e contaminações, desequilíbrio pela deficiência de nutrientes, e estresses do metabolismo celular como acúmulo de etanol superior a 15%, assim como de ácido acético e ácido láctico (Bai, Anderson e Moo-Young, 2008; Lima, 2019).

Como forma de contornar adversidades inerentes ao meio fermentativo, a temperatura é monitorada durante todo o processo, a concentração de etanol regulada pela adição de nutrientes protetores, e o estresse osmótico, potencializado pela produção de glicerol, evitado pela sacarificação e fermentações simultâneas (Parapouli et al., 2020).

Desse modo, grande parte das destilarias brasileiras utilizam leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, previamente isoladas do processo produtivo de diversas usinas, caracterizadas por técnicas de cariotipagem e de comprovada eficiência operacional pela avaliação e reinserção em fermentações. Cada cepa foi identificada com as iniciais das unidades onde foram inicialmente encontradas tais quais BG-1 (Usina de Barra Grande), CR-1 (Usina Cresciumal), CAT-1 (Usina de Catanduva) e PE-2 (Usina da Pedra) (Góes-Favoni et al, 2018).

Linhagens como PE-2, CAT-1, FT-858L, BG-1 e AS-1 destacam-se industrialmente pelas características de dominância e persistência nas fermentações com reciclo de células ao longo da safra de cana-de-açúcar e pela combinação favorável entre baixa formação de glicerol, tolerância às condições estressantes, pouca produção de espumas e elevado rendimento (Amorim e Lopes, 2013).

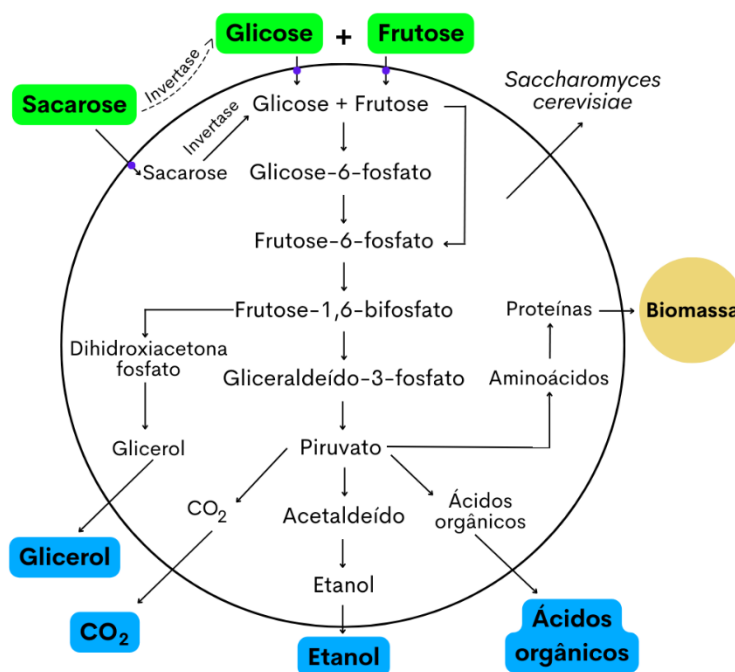
3.2.2. Processo Bioquímico

O processo bioquímico das leveduras inicia-se com a clivagem da sacarose e, por meio de uma sequência de reações na glicólise, forma-se o ácido pirúvico. Na presença de oxigênio o açúcar é convertido em biomassa, dióxido de carbono e água no chamado Ciclo de Kreb

enquanto, na ausência de oxigênio, produz etanol e dióxido de carbono (Brexó e Sant’ana, 2017).

O etanol e demais subprodutos são obtidos em uma série de reações ordenadas e sequenciadas e respectivamente catalisada por enzimas específicas conforme demonstrado na Figura 5.

Figura 5 - Síntese do etanol na célula de levedura.



Fonte: Adaptado de Rodrigues et al. (2018).

No início da fermentação alcoólica, as leveduras produzem a enzima invertase, responsável por hidrolisar a sacarose, açúcar predominante no caldo de cana, nas hexoses D-glicose e D-frutose, de mesma fórmula molecular $C_6H_{12}O_6$ e diferente fórmula estrutural. (Lopes, Gabriel e Borges, 2017; Almeida e Do Nascimento, 2021).

A glicose é convertida em glicose-6-fosfato pela enzima fosfoglicomutase, que requer íons manganês, cobalto e magnésio para sua ação, e isomerizada em frutose-6-fosfato pela enzima fosfohexoseisomerase. A depender da rota metabólica, a formação destas duas fosfohexoses decorre da transferência de fosfato da molécula de adenosina trifosfato (ATP) para a molécula de glicose ou frutose, catalisada pela enzima hexoquinase em presença de íons magnésio (Borzani et al., 2001).

A frutose-6-fosfato sofre fosforilação até a conversão em frutose-1,6-difosfato na presença de moléculas de ATP e íons magnésio em uma reação fomentada pela enzima fosfofrutoquinase. Pela ação da aldose, essa molécula é separada em diidroxiacetona-fosfato e em gliceraldeído-3-fosfato que, após a oxidação forma o ácido 1,3-difosfoglicérico (Borzani et al., 2001; Bai, Anderson e MOO-YOUNG, 2008; Madigan et al., 2016; Santos, 2021).

O ácido sofre a fosforilação para a formação do 3-fosfoglicérico, posterior conversão para 2-fosfoenolpirúvico e formação do enolpiruvato a partir da enzima enolase que é inibida por íons fluoreto e fosfato, e que exige íons magnésio para formar um complexo com a enzima antes da união com o substrato (Borzani et al., 2001).

As duas moléculas de ácido pirúvico, formadas a partir do enolpiruvato, sofrem descarboxilação a acetaldeído. Em seguida, o acetaldeído é reduzido por moléculas de NADH para formar o etanol (Madigan et al., 2016; Tortora, Case e Funke, 2016).

Durante as múltiplas reações enzimáticas, a energia produzida e consumida na forma de ATP é liberada em moléculas de ADP (adenosina difosfato) e empregada nas funções fisiológicas, no crescimento e na reprodução do microrganismo (Madigan et al., 2016; Góes-Favoni et al., 2018).

Segundo Lima (2019), cerca de 5% do açúcar metabolizado pelas leveduras são consumidos para a geração de produtos secundários da fermentação, resultando em um rendimento teórico máximo de 95%. Conforme estabelecido por Gay-Lussac, o fator estequiométrico na equação 2 estabelece que cada grama de glicose convertida gera 0,511 gramas de etanol, sendo que frequentemente observa-se um rendimento da ordem de 90% deste valor (Schmidell et al., 2001).

Os açúcares consumidos em reações paralelas formam subprodutos como ácidos orgânicos, álcoois superiores e glicerol, devido ao estresse osmótico causado por altas concentrações de açúcares ou pelo desbalanceamento de sais minerais no mosto. Estas rotas metabólicas alternativas são importantes para adaptação e sobrevivência dos microrganismos, bem como para o desenvolvimento do processo a partir das alterações decorrentes de diversas interações (Góes-Favoni et al., 2018; Lima, 2019).

3.2.3. Interações Microbianas

Consórcios microbianos complexos toleram mais variações no ambiente, impulsionam a diversificação das culturas iniciais e propiciam conhecimento sobre comunidades de micróbios fermentadores e seus correspondentes metabolismos (Smid e Lacroix, 2013).

As leveduras podem ser eleitas pela seleção natural, com linhagens dominantes das interações ecológicas suportando as condições físico-químicas do meio, sobrevivendo e conduzindo o processo principalmente pela capacidade de alterar suas características genéticas, organizar cromossomos e induzir o processo fermentativo (Brexó e Sant'ana, 2017).

Os microrganismos selecionados são chamados de linhagens ou leveduras industriais, e reúnem características de persistência e dominância nas fermentações, como elevado rendimento fermentativo e tempo razoável de produção (Amorim e Lopes, 2013).

Ainda assim, a competição por nutrientes e fatores de crescimento no meio é uma das causas determinantes ao sucesso das leveduras que, em antagonismo, geram subprodutos metabólicos, alteram o ambiente e estimulam a competição entre as linhagens que garantem o

domínio e sobrevivência de um microrganismo frente a outros (Rosa, 2006; Smid e Lacroix, 2013).

A adição intencional de microrganismos contaminantes também pode ser empregada para delinear leveduras com maior resistência a fatores como acidez, temperatura, pressão osmótica, concentração de etanol, menor síntese de glicerol e maior produção de biomassa. As leveduras personalizadas se distinguem das selecionadas pela especificidade, submetendo-se às particularidades de um determinado processo industrial, e direcionadas quanto a matéria-prima, características do mosto, tratamentos do meio e equipamentos usados (Amorim e Lopes, 2013; Brexó e Sant'ana, 2017).

Interações vantajosas podem ser alcançadas como nos estudos de Waite e Shou (2014) que projetaram uma comunidade microbiana sintética para criar um sistema cooperativo de dois parceiros baseado na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Karagöz e Özkan (2014) mostraram que o desempenho de co-cultura de *S. stipitis* e *S. cerevisiae*, em sistemas contínuos e descontínuos, é superior quando comparado ao uso de culturas puras de *S. cerevisiae*.

A aplicação de interações mútuas e ramificada em sistemas de co-cultura e cultura mista acontecem pela troca de metabólitos e sinais moleculares. Cada célula de levedura responde, individualmente, pela presença de outras e pela divisão de trabalho, visando potencializar a produção global pela combinação de cepas (Smid e Lacroix, 2013).

Segundo Bader et al. (2010) a co-cultura corresponde à inoculação anaeróbica de diferentes cepas microbianas especificadas sob condições assépticas, enquanto a cultura mista refere-se à incubação de diferentes microrganismos, por vezes não especificados, e em condições sépticas.

Estudos demonstraram o potencial de co-culturas na produção de etanol, fornecendo menores custos e tempo de fermentação (Chen, 2011), aumento da produtividade (Unrean e Khajeeram, 2015) e maiores taxas de fermentação (Wang et al., 2019).

Outros estudos mostraram que as estratégias de fermentação utilizando cultura mistas potencializa o rendimento fermentativo quando comparado às fermentações com monoculturas como em Szambelan, Nowak e Czarnecki (2004) e Guo, Zhou e Xiao (2010).

3.2.3.1. Leveduras Selvagens

Geralmente, cepas sem as características desejadas ao processo fermentativo são eliminadas ou substituídas pelas linhagens mais resistentes e adaptadas. Contudo, a natureza séptica em cultura mista incita o surgimento de microrganismos contaminantes que predominem sobre as leveduras selecionadas e que são chamadas de leveduras selvagens (Brexó e Sant'ana, 2017).

As leveduras selvagens apresentam alta capacidade de floculação, formam espumas em excesso, produzem gomas, consomem menos açúcares e podem sintetizar toxinas que inibem as leveduras industriais. Os microrganismos indesejados também reduzem o rendimento

fermentativo e a produtividade do etanol, e são mais resistentes a altas concentrações de etanol, temperatura e acidez (Basso et al., 2008; Amorim e Lopes, 2013; Costa et al., 2015).

Cerca de 91% das cepas selvagens *Saccharomyces cerevisiae* ou não *Saccharomyces* causam sérios problemas à fermentação, com crescimento invasivo e predominante, desenvolvimento de subprodutos e qualidade de etanol organolepticamente inaceitável (Muthaiyan, Limayem e Ricke, 2011; Brexó e Sant'ana, 2017; LNF, 2022).

Basso et al. (2008) destacam que leveduras industriais do gênero *Saccharomyces cerevisiae* ainda não são competitivas frente às leveduras selvagens em grande parte das usinas brasileiras de etanol. Reis et al. (2018), avaliando os efeitos de diferentes microrganismos na produção de etanol, observou que a contaminação por leveduras selvagens é mais prejudicial que a contaminação bacteriana.

As fermentações contínuas são mais suscetíveis ao desenvolvimento das leveduras selvagens pela prolongada duração da operação. Ainda que fermentações descontínuas imperem na produção brasileira, a entrada de microrganismos indesejáveis é inerente ao processo e significativas perdas econômicas são observadas com contaminações que podem reduzir o rendimento de bioetanol em até 30% (Abbott e Ingledew, 2005, Muthaiyan, Limayem e Ricke, 2011; Brexó e Sant'ana, 2017).

A maioria das leveduras contaminantes são não *Saccharomyces*, com identificação e classificação em outros gêneros como *Brettanomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Rhodotorula* e *Torulopsis* (Muthaiyan, Limayem e Ricke, 2011). Basílio et al. (2008), monitorando a produção de etanol em destilarias do nordeste brasileiro, identificou 24 espécies de leveduras selvagens, sendo *Dekkera bruxellensis*, *Candida tropicalis*, *Pichia galeiformis* e *C. intermedia* as mais proeminentes. As demais espécies foram classificadas como adventícias e todas as cepas isoladas e estudadas estão associadas à diminuição da produtividade.

Ao contrário das bactérias produtoras de ácido lático (LAB), que eram as principais contaminantes nas fermentações alcoólicas e controladas pelo uso de antibióticos e tratamentos ácidos, as contaminações por leveduras impõem mudanças na população do microrganismo. Para contornar as contaminações é necessário detectar precocemente os microrganismos e injetar um lote fresco de leveduras industriais (Muthaiyan, Limayem e Ricke, 2011).

A contaminação microbiana tem sido um fator limitante para melhorar o desempenho do processo apesar da estrutura tecno-científica desenvolvida pela indústria sucroalcooleira (Brexó e Sant'ana, 2017). A prevenção e controle nos fermentadores de bioetanol devem ser econômicos, de amplo espectro de atividade, de fácil administração, ambientalmente favorável e não pode ser tóxico para as cepas de leveduras usadas bem como para humanos, animais e plantas (Muthaiyan, Limayem e Ricke, 2011).

Nas fermentações para produção de bebida alcoólica como o vinho, o dióxido de enxofre (SO₂) pode ser utilizado para controle das leveduras contaminantes, ainda que não seja uma

solução viável e de longo prazo devido à natureza potencialmente corrosiva e tóxica do composto (Beckner, Ivey e Phister, 2011). Desse modo, estudos como o de Worley-Morse, Deshusses e Gunsch (2015) avaliaram diversos produtos na busca por um tratamento que reduz os efeitos prejudiciais das leveduras selvagens e a viabilize da produção de etanol.

Compostos como quitosana, hidroxicinamatos, ácidos orgânicos e peptídeos antimicrobianos ativos de membrana também têm sido avaliados e empregados na tentativa de combater o crescimento microbiano indesejado, mesmo com os resultados prévios demonstrando alto custo financeiro e potencial risco biológico e ambiental (Beckner, Ivey e Phister, 2011).

3.3. Nutrientes minerais

As leveduras são organismos saprófitos constituídos predominantemente por hidrogênio, oxigênio e carbono e, em menor proporção, por outros minerais como nitrogênio, enxofre, fósforo, magnésio, zinco, cobre, vitaminas e outros fatores de crescimento (Amaral et al, 2009; Brexó e Sant'ana, 2017; Lima, 2019).

A viabilidade e a manutenção dos microrganismos no meio fermentativo dependem de quantidades diminutas de nitrogênio, fósforo, potássio, zinco, enxofre, magnésio, cálcio, manganês, cobre, ferro, cobalto, iodo e outros elementos conforme disposto no Quadro 1 abaixo (Lima, 2019).

Quadro 1 - Composição molecular de leveduras industriais.

Nutriente	Concentração Mineral na Levedura (g/100g de matéria seca)	Concentração Mineral no Meio Fermentativo (g/L)
Nitrogênio (NH ₄ ⁻)	7,50 - 9,00	0,040 – 5,900
Fósforo (PO ₄ ³⁻)	1,10 - 2,00	0,062 – 0,560
Potássio (K ⁺)	0,90 - 3,50	0,700 – 0,800
Cálcio (Ca ²⁺)	0,04 - 0,90	0,120
Magnésio (Mg ²⁺)	0,15 - 0,50	0,070 – 0,200
Enxofre (SO ²⁻)	0,30 - 0,50	0,002 – 0,280
Cobre (Cu ²⁺)	0,002 - 0,12	0,007
Ferro (Fe ²⁺)	0,003 - 0,10	0,0002
Sódio (Na ⁺)	0,02 - 0,20	0,200

Zinco (Zn ²⁺)	0,004 - 0,13	0,0005 – 0,010
Manganês (Mg ²⁺)	0,0004 - 0,0035	0,010 – 0,013

Adaptado de Amaral et al. (2009) e Lima (2019)

Os nutrientes minerais oportunizam os processos fisiológicos das leveduras, mantêm a integridade estrutural das células e organelas, atuam na osmorregulação e no metabolismo enzimático, e são responsáveis pela sobrevivência celular, expressão gênica, divisão e crescimento celular (Walker, 2004). Tais mecanismos estão intimamente relacionados à multiplicação e crescimento celular, a eficiência na transformação de açúcares a etanol, a tolerância ao estresse e ao controle da floculação (Amaral et al., 2009).

Rees e Stewart (1997) enumeram as dificuldades na definição do papel dos íons inorgânicos que, apesar de serem fundamentais ao processo fermentativo, são impactados por complexas relações com o meio. A concentração de um elemento pode depender da presença de outras espécies, as interações dependem da biodisponibilidade do ânion e as quantidades devem impedir efeitos tóxicos.

Além disso, a variabilidade das linhagens de leveduras, a manutenção dos meios de cultura, a idade dos microrganismos, a composição mineral da cana-de-açúcar e as características do processo fermentativo também influenciam na avaliação dos nutrientes minerais (Lopes, 1989; Parapouli et al., 2020).

As células de levedura podem localizar, transportar, compartilhar e sequestrar os metais necessário às suas funções fisiológicas, neutralizando os potenciais tóxicos e mantendo as concentrações dentro de uma faixa relativamente estreita e não prejudicial. As espécies induzem a mobilização de íons metálicos, excretam metais de baixo peso molecular e absorvem metais essenciais em sistemas específicos de transporte de membrana (Walker, 2004).

O caldo extraído da cana necessita de ajustes devido à colheita não maturada, deterioração da cultura, influência de incêndios em canaviais, coleta em tempo superior ao recomendado, solo deficiente em nutrientes, imprecisão nos tratamentos químicos e outros. Dessa forma, as concentrações sugeridas no Quadro 1 podem ser satisfeitas ou compensadas durante o processo fermentativo (Lima, 2019).

Góes-Favoni et al. (2018) destacam que o tratamento químico com ácido sulfúrico, empregado principalmente no reciclo das leveduras, provoca a extração de nutrientes como nitrogênio, fósforo e potássio, gerando desgaste na parede celular e prejudicando a produção de etanol. Para minimizar tais efeitos, sulfatos de amônio, magnésio, potássio, zinco e fósforo podem ser adicionados durante a safra buscando favorecer a rápida multiplicação celular e o percentual de células viáveis.

Dadas as dificuldades de estudo, cobre, cobalto, zinco, manganês, boro e sódio, chamados de micronutrientes, são alocados em importância secundária sendo necessário apenas traços de

elementos. Os macronutrientes como fósforo, potássio e magnésio, são requeridos para diversas ações em quantidades apreciáveis (Borzani et al., 2001).

3.3.1. Nitrogênio

O nitrogênio é essencial para formar proteínas, ácidos nucleicos e outros componentes das células de levedura. Parapuli et al. (2020) apontam que a presença deste mineral favorece a síntese de compostos para fortalecimento da membrana celular dos microrganismos. Lopes (1989) destaca que na escolha de uma fonte de nitrogênio, uma mistura de aminoácidos é mais eficiente do que apenas os íons amônio, e que fontes nitrogenadas complexas obtidas a partir de misturas propiciam melhor assimilação de nitrogênio por parte das leveduras.

A presença do etanol inibe o sistema de transporte das membranas por interferir na absorção de amônio e aminoácidos, sendo necessário a introdução do nitrogênio no meio, principalmente em altas concentrações de substrato, para favorecer a multiplicação e crescimento das leveduras, operações em menores tempo e a produção de etanol (Alves, 1994; Neto et al., 2015).

Uma série de elementos podem fornecer o composto sob a forma orgânica como aminoácidos e peptídeos, ou inorgânica como sais amoniacais (Borzani et al., 2001; Monteiro, 2016). Assim, as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* comumente utilizam nitrogênio amoniacal (NH_4^+), ureia ou aminoácidos devido a inabilidade de fixação do nitrogênio e baixa capacidade de absorção em nitratos ou proteínas do meio (Walker, 2004; Amaral et al., 2009; Lima, 2019). As limitações de nitrogênio geram acúmulo de glicogênio e trealose, carboidratos de reserva para leveduras, e excessos assimiláveis suscitam o consumo de açúcares e maior produção de etanol pela manutenção do equilíbrio metabólico dos níveis intracelulares do mineral (Alves, 1994). Já a adição de nitrogênio sugere melhor ação das células de levedura na conversão do açúcar a etanol, assegurando a recirculação e produção contínua de novas células de leveduras e induzindo a produção do combustível comprovado pelos melhores índices de rendimento e produtividade alcançados em diversos estudos (Monteiro, 2016).

Alguns estudos apontam a importância da suplementação de nitrogênio. Walker (2004) observou nas destilarias brasileiras um crescimento produtivo descrito como “quase linear” com a adição de amônia ou ureia no meio, principalmente em mostos com deficiências nutricionais. Johnston e Mcaloon (2014) avaliaram os efeitos da protease ácida e da adição de ureia em fermentações e concluíram que a combinação resultou em um rendimento final mais alto do que separadamente, com um máximo de 1200 ppm de nitrogênio suplementar para garantir a produção de etanol. Tesfaw e Assefa (2014) relataram que a adição de extrato de levedura como fonte de nitrogênio acrescenta biotina e riboflavina, importantes cofatores para a ação das leveduras *S. cerevisiae*, e estimulam o desempenho fermentativo pelo maior consumo de açúcares disponíveis e, conseqüentemente, maior produção de etanol. Li et al. (2020) apontaram que o uso de extrato de leveduras, como principal fonte de nitrogênio, é capaz de fornecer carbono, enxofre, elementos traço, vitaminas e outros nutrientes importantes para a manutenção e viabilidade dos microrganismos.

3.3.2. Fósforo

Depois do nitrogênio, o fósforo é considerado o segundo macronutriente mais importante ao processo fermentativo por ser um componente estrutural de ácidos nucleicos, fosfolipídios, ATP e outras macromoléculas empregadas em diversas rotas metabólicas da glicólise (Monteiro, 2016). Na fermentação, o fósforo atua principalmente na transferência de energia durante a glicólise, sendo fundamental para a conversão de açúcares a etanol. Compensatoriamente, é um possível limitador do crescimento dos microrganismos em concentrações inadequadas (Fernandes et al, 2014).

O fósforo pode ser absorvido na forma de íons H_2PO_4^- , preferencialmente em pH 4,5, ou ter sua deficiência suprida pelo consumo de fosfato inorgânico do meio para atuar no metabolismo energético e na síntese de ácidos nucleicos (Borzani et al., 2001; Amaral et al., 2009). A quantidade de íons fosfato livre deve manter-se baixa, e uma flutuação pode indicar transição do metabolismo fermentativo para o metabolismo respiratório, ocasionando uma redução na produtividade do etanol (Monteiro, 2016).

Lopes (1989) destaca que a absorção dos íons é condicionada à presença de íons K^+ para que sejam metabolizados pelas leveduras enquanto Monteiro (2016) aponta que fosfato é requerido majoritariamente nas reações de fosforilação e transfosforilação das etapas intermediárias do processo metabólico, cujo acúmulo em forma de polifosfato no vacúolo da célula atua como carregador no transporte ativo da glicose.

Há ainda uma correlação nitrogênio e fósforo denotada no metabolismo nitrogenado do sistema ATP-ADP, onde aumento no teor do fósforo incide em diminuições das taxas de nitrogênio (1989).

A complexa relação com demais nutrientes é pronunciada ainda na variabilidade do polifosfato que, em meios diminutos pode sequer ser detectado e, em abundância, gerar acúmulos acima de 20% do peso da célula (Lopes, 1989).

3.3.3. Potássio

Os íons K^+ atuam como ativador de algumas enzimas das reações da via glicolítica e como regulador da pressão osmótica, aumentando o consumo de açúcares em até 83% pela reversão do efeito inibitório causado por íons H^+ (Alves, 1994; Borzani et al., 2001). Segundo Zörb, Senbayram, Peiter (2014), menores teores de potássio são observadas na cana-de-açúcar devido ao extenso uso de fertilizantes nitrogenados e fosfatados e as baixas concentrações deste elemento no solo. Em conjunto, grande parte do potássio não está diretamente disponível para absorção das plantas uma vez que é incorporado na estrutura cristalina dos minerais.

Walker (2004) salienta que o potássio é um dos cátions mais abundantes em leveduras, sendo essencial para a osmorregulação da célula, o balanceamento de cargas de macromoléculas, a regulação de fosfato, a absorção de cátions divalentes, e como cofator para enzimas da fosforilação oxidativa, biossíntese de proteínas e catabolismo de carboidratos.

O potássio é considerado um elemento permutável, onde magnésio e cálcio o substituem como estabilizadores das membranas celulares, acentuadamente em meios mais ácidos, e com íons sódio e amônio podendo substituí-lo parcialmente como ativador da enolase, onde o potássio é, de fato, primordial (Lopes, 1989).

O comportamento multifacetado também é demonstrado em um possível efeito compensador observado em elevadas concentrações, onde o potássio mostra-se estressante às leveduras, inibindo o crescimento das cepas selecionadas como também dos microrganismos contaminantes (Alves, 1994).

Bernardes et al. (2019) suplementando doses de potássio para produção de etanol a partir do sorgo sacarino, concluíram que a adição aumentou a produção e proporcionou melhores taxas de fermentação dos açúcares totais.

3.3.4. Cálcio

O cálcio deve estar presente no meio fermentativo para viabilizar o metabolismo das leveduras, sendo primordial no tratamento do caldo, no controle do pH para evitar a inversão da sacarose e na ação inibitória aos microrganismos contaminantes (Lopes, 1989; Manochio et al., 2017). Os complexos papéis desempenhados pelo cálcio nos processos fermentativos são evidenciados pelas células de leveduras que o usa como facilitador da interação levedura-levedura, como protetor de algumas proteínas secretadas, para a amilase e precipitação de fosfato, e o exclui para manter os níveis citosólicos sub tóxicos (Walker, 2004).

Apesar de proteger a estrutura da célula agindo na membrana plasmática e na parede celular, a presença do íon Ca^{2+} é um cofator que antagoniza a absorção de magnésio, elemento essencial para várias vias metabólicas, e que está intimamente ligado à floculação das leveduras, importante para a indústria cervejeira, mas extremamente prejudicial às usinas de etanol (Rees e Stewart, 1997; Walker, 2004; Bertoletti, 2008).

Chotineerant et al. (2010) mostraram uma ligeira diminuição na taxa de fermentação e no rendimento do etanol quando cálcio estava presente à concentração de 0,18% m/v no melão de cana de açúcar. O mesmo estudo observou ainda que o processo de calagem, usando CaO , pode resultar numa superdosagem de cálcio que danifica a qualidade do suco fermentável.

Ciesarová, Šmogrovičová e Dömény (1996), avaliando a produção de etanol com três linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* apontaram que cálcio, na forma de CaCl_2 , e magnésio, na forma de MgCl_2 , exercem efeitos protetores sobre as leveduras contra a ação do etanol.

Segundo Trofimova, Walker e Rapoport (2010) os íons cálcio aumentam a resistência das células de leveduras à desidratação, principalmente em culturas sensíveis ao estresse da fase de crescimento exponencial, representando uma possibilidade de uso de leveduras secas para potencializar o rendimento fermentativo.

3.3.5. Magnésio

O magnésio interfere no desenvolvimento das leveduras por ser um ativador de enzimas extracelulares. O elemento age como cofator para mais de 300 enzimas envolvidas em vias metabólicas e bioenergéticas, como a síntese de ATP, fosfatases, quinases e a descarboxilação do piruvato catalisado pela piruvato descarboxilase (Borzani et al., 2001; Walker, 2004).

Por meio de um sistema de transporte específico de alta afinidade, as células de levedura absorvem o magnésio de forma intracelular e melhoram sua ação durante a fermentação (Walker et al., 1996; Rees e Stewart, 1997). A regulação metabólica do piruvato também depende do magnésio presente no meio, de modo que, em baixas concentrações, gera mitose incompleta e afeta o controle do crescimento, a divisão e o tamanho das células (Rees e Stewart, 1997).

Os íons Mg^{2+} podem ser transportados em grandes quantidades por meio da membrana celular e atua como carregador para promover a atividade enzimática. Junto ao NH_4^- o magnésio melhora o rendimento de etanol e o crescimento celular. O K^+ neutraliza forças eletrostáticas, mantém a integridade estrutural geral das células e organelas, e protege fosfolipídios carregados como forma de conservar a estrutura das membranas em estresse (Walker, 2004; Li et al., 2020). O cálcio, no entanto, compete com o magnésio pelo sistema de transporte através do plasmalema e pode inibir a fermentação (Lopes (1989).

A estabilização da membrana celular depende da disponibilidade de íons Mg^{2+} livres para proteção ao estresse fisiológico. Além de reduzir a permeabilidade das células pela produção de etanol e pelas variações na temperatura, os íons Mg^{2+} podem responder aos estresses do meio e viabilizar a ação das enzimas na rota metabólica (Trofimova, Walker e Rapoport, 2010; Li et al. 2020).

3.3.6. Enxofre

O enxofre compõe parte de aminoácidos, participa da síntese de vitaminas, é requerido em quantidades diminutas e absorvido em forma de sulfito, sulfato e tiosulfato. Com isso, as fermentações industriais consideram o residual do tratamento químico do caldo e das leveduras suficientes para abastecer o meio, gerando caldos com cerca de 300 mg/L de dióxido de enxofre (Borzani et al., 2001; Lima, 2019). Grande parte do enxofre presente no mosto é proveniente da queima do enxofre elementar e do sulfito de sódio adicionado durante o tratamento ácido em destilarias integradas que produzem etanol e açúcar. (Góes-Favoni et al., 2018).

O sulfito age como antimicrobiano tanto para bactérias como para leveduras, ligando-se aos receptores celulares da parede celular do microrganismo. Ao causar a inibição das reações enzimaticamente catalisadas e vinculadas à membrana citoplasmática, como a inibição da cadeia enzimática produtora de ATP, provoca a queda da viabilidade celular (Góes-Favoni et al., 2018).

As concentrações de enxofre acima do ideal tendem a impulsionar a produção de etanol e inibir, momentaneamente, o desenvolvimento das leveduras por direcioná-las à um mecanismo de adaptação ao meio (Amaral et al., 2009). Segundo Alves (1994) há duas constantes de dissociação que relacionam a toxicidade do enxofre ao pH do meio fermentativo: uma mistura das formas bissulfitos (HSO_3^-) e sulfitos (SO_3^{2-}) em pH entre 5,0 e 9,0, e a coexistência das formas bissulfitos e dióxido de enxofre (SO_2), cuja combinação forma o sulfato sem efeitos tóxicos quando pH está abaixo de 5,0. O extremo efeito tóxico do sulfito pode ocorrer em meios extremamente ácidos, com o dióxido de enxofre ligando-se aos sítios receptores da superfície da membrana celular e desencadeando uma série de distúrbios intracelulares até a morte da levedura (Alves, 1994).

Amaral et al. (2009) apontam que a presença do sulfito em até 100 ppm é mais benéfico do que tóxico às leveduras, e que a alta concentração inibitória mínima de 5000 mg/mL de sulfito de sódio em adição ao meio, atinge as leveduras contaminantes em maior grau.

3.3.7. Cobre

O cobre é um elemento traço, requerido em baixas quantidades para participar do crescimento celular e dos pigmentos respiratórios das leveduras, componentes capazes de ligar-se reversivelmente ao oxigênio e induzir condições de aerobiose (Lopes, 1989; Walker, 2004). Os íons Cu^{2+} são incorporados nas células de levedura por transportadores de alta afinidade e se agrupam a diferentes organelas. Em excesso, ligam-se a moléculas glutatona e metalotioneínas, onde complexos de cobre são sequestrados em vacúolos para evitar toxicidade uma vez que podem gerar radicais livres ou romper as estruturas das proteínas (Shi et al., 2021).

Importante ao processo bioquímico, o cobre é cuidadosamente monitorado para não causar toxicidade. Os íons Cu^{2+} operam como cofator para citocromo *c*-oxidase e outras enzimas essenciais às reações redox da via glicolítica (Lopes, 1989; Pena, Koch e Thiele, 1998; Serrano et al, 2004). Brasu e Ducan (1994) mostraram que as leveduras são capazes de acumular vários metais pesados em diferentes condições ambientais, e demonstraram que as células de *S. cerevisiae* em suspensão apresentam modificação química nas paredes celulares que aumentam a capacidade de acumular cátions cobre sem prejudicar a ação no meio. Entretanto, Serrano et al. (2004) observaram que a adição de cobre é incapaz de melhorar o crescimento de cepas.

A depender da linhagem empregada na fermentação, os microrganismos podem produzir uma proteína de baixo peso molecular e rica em grupamentos tióis que se ligam ao cobre, impelindo a capacidade adaptativa das leveduras em meios com íons Cu^{2+} à concentração de até 1000 ppm (Lopes, 1989).

3.3.8. Ferro

Assim como o cobre, o ferro atua nas vias respiratórias de leveduras como componentes de pigmentos redox, na síntese de citocromo, e sendo requeridos em concentrações diminutas para acelerar a taxa de crescimento e o metabolismo dos microrganismos (Lopes, 1989; Borzani et al., 2001; Walker, 2004).

O comportamento de meios fermentativos suplementados com ferro é relatado como de difícil compreensão, na medida que leveduras *Saccharomyces cerevisiae* mostram-se adaptáveis e prósperas em ambientes escassos ou abundantes em ferro. Quando limitado, as células de levedura regulam a produção de biotina com absorção do metal, e se demasiado, a regulação ocorre pela biossíntese. Além disso, a disponibilidade de ferro altera as respostas das vias de assimilação do nitrogênio a partir da regulação positiva de vários genes envolvidos na absorção. Em condições de privação de íons Fe^{2+} , o metabolismo nitrogenado altera a síntese de glutamato e afeta o desempenho da operação (Philpott e Protchenko, 2008).

Segundo Serrano et al. (2004), alterações do pH no meio fermentativo resultam na adaptação metabólica do ferro para que seja utilizado pelas células de levedura. A presença de íons Fe^{2+} , por exemplo, limita o crescimento, virulência e/ou invasividade de patógenos, como *Candida albicans*.

Philpott e Protchenko (2008) relataram que células deficientes em ferro são sensíveis à toxicidade de outros metais como cobalto, manganês, zinco e cobre, o que pode desencadear o aumento na captação de íons Fe^{2+} por meio de transportadores de baixa afinidade e baixa especificidade.

3.4. Otimização do Processo Fermentativo

Certas análises são compostas por diversas variáveis dependentes cuja intercorrelação mostra-se de difícil compreensão. A análise estatística busca aumentar o rendimento do etanol e reduzir os custos. Contudo, os fatores físicos (temperatura, pressão osmótica e agitação), químicos (pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos, inibidores) e biológicos (espécie e linhagem dos microrganismos, concentração da levedura) precisam ser avaliados de maneira integrada uma vez que a avaliação unitária, ou seja, de cada um desses fatores, não considera os efeitos sinérgicos entre eles (Kim et al, 2008).

Assim, a otimização do processo busca equiparar todas as variáveis envolvidas e analisadas, e compreender qual combinação é mais viável sob aspectos econômicos, operacionais e tecnológicos.

Uma outra forma de avaliar a interação entre diversas variáveis é por meio da metodologia de superfície de resposta. Esta técnica é utilizada para modelagem e análise de problemas, fornecendo uma região ótima para o processo a partir da análise dos parâmetros requeridos. (Comparini et al, 2012). Assim também, o planejamento estatístico pode ser usado na otimização do processo para reduzir a quantidade de experimentos a serem realizados e torná-los mais específico ao correlacionar os dados de maneira mais objetiva. Os métodos contribuem para a redução dos custos e do tempo dispendido nos ensaios (Vargas Betancur e Pereira Jr, 2010).

Alguns estudos demonstram a necessidade de aprimorar ainda mais as técnicas de análise e, com o crescimento dos estudos nas áreas de bioquímica e biotecnologia focados na

viabilidade técnica-econômica, a análise estatística desempenha importante função na avaliação e quantificação dos parâmetros envolvidos no processo (Moura, 2018). Silva et al, (2008) aponta que o uso do planejamento em estudos que abrange muitas variáveis, como no caso da fermentação alcoólica, é importante para viabilizar a realização de maneira organizada e prática da quantidade mínima necessária de experimentos.

A concentração de açúcares e o tamanho do inóculo foram avaliados por Sulaiman et al. (2022) para otimizar a cinética da produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* em melão tratado e não tratado, mostrando que o substrato nas respectivas concentrações de 150 e 200 g.L⁻¹ fornece as maiores concentrações de bioetanol. Sharma et al. (2007) buscaram otimizar a produção de etanol a partir da concentração do inóculo, temperatura, tempo de incubação e tempo de agitação na fermentação de resíduos de *kinnow* e cascas de banana, e estabeleceram a efetividade do processo encontrando os parâmetros de fermentação otimizados. Shen, Liu e Wang (2009) avaliaram em seus estudos os efeitos da temperatura, pH, nível de agitação e a taxa de crescimento dos microrganismos na fermentação, e encontraram os níveis ótimos desses fatores no rendimento do etanol.

3.4.1. Planejamento Experimental de Mistura

O planejamento experimental é usado para formular novos sistemas ou aprimorar sistemas já existentes, e têm encontrado larga aplicação no campo da ciência, engenharias e particularmente no setor de pesquisa e desenvolvimento (Lopes et al, 2016b). Para encontrar as condições otimizadas de um processo, o planejamento avalia os efeitos e impactos diante das especificações desejadas. Dentre as principais técnicas destaca-se o planejamento fatorial (completo e fracionado), a metodologia por superfície de resposta, e o planejamento experimental para misturas (Rodrigues e Iemma, 2005 apud Faraoni et al, 2012).

Os experimentos com misturas envolvem dois ou mais componentes em proporções cujo soma total seja 100%, e uma resposta é obtida para cada conjunto de componentes de acordo com as proporções usadas (Cornell, 2011). A partir da mistura, é possível identificar como os parâmetros de interesse são afetados pela variação das proporções dos componentes usados. Assim também, o conhecimento prévio sobre os efeitos isolados de cada componente no meio analisado, somado aos dados obtidos no planejamento de mistura, permitem analisar e estimar as melhores e piores condições para um produto (Campos, Amorim e Ferreira, 2005).

O planejamento experimental de misturas estima ainda o erro experimental e testa o modelo quanto ao ajuste. Com isso, um planejamento do tipo *simplex-látice* é usado para verificar o arranjo dos pontos estabelecidos na proporção dos experimentos, a partir do número de componentes na mistura e do grau de polinômio ajustado, permitindo obter modelos lineares, quadráticos e cúbicos para descrever a interação dos componentes (Cornell, 2011). Os dados obtidos pelo planejamento experimental são usados na metodologia da superfície de resposta e as combinações pré-determinadas otimizam a resposta e permitem a compreensão do comportamento do sistema de mistura em todo o espaço experimental (Reis e Andrade, 1996).

3.4.2. Parâmetros Cinéticos da Fermentação

Hiss (2013) define a cinética química de um sistema como resultado da variação da concentração de substrato (açúcar), produto (etanol) e células (levedura) de acordo com o tempo de fermentação. Lima (2019) aponta que a partir da cinética é possível comparar quantitativamente as diferentes condições de cultivo induzidas por fatores como pH, temperatura, agitação e suplementação mineral durante a fermentação. Assim, a velocidade de transformação de substrato em produto e biomassa é a base dos parâmetros usados nas investigações cinéticas, uma vez que permitem a comparação dos cultivos e o conhecimento das condições mais favoráveis ao processo fermentativo (Vieira e Fernandes, 2016 apud Santos, 2017).

Dentre os parâmetros cinéticos, pode-se citar a eficiência, a produtividade, o fator de conversão de substrato em produtos e o fator de conversão de substrato em biomassa como os mais usuais na avaliação da fermentação.

A eficiência da fermentação (η) é calculada com base no rendimento teórico, proveniente da equação de Gay Lussac, que aponta que para cada grama de glicose são produzidos 0,511 gramas de etanol (Jackman, 1991 apud Ilha et al, 2008). Segundo Ribeiro e Horii (1999), a eficiência é fundamental para compreender a geração do produto e a presença de metabólitos e produtos indesejados no meio.

A produtividade (\emptyset) permite calcular a velocidade de transformação do açúcar em etanol com relação ao tempo total de transformação (Schmidell et al, 2001). Trata-se de um dos principais parâmetros cinéticos, visto que envolve as variáveis que estão intrinsecamente relacionadas ao valor agregado do produto e geralmente, é usada para mensuração do nível tecnológico do processo (Gimenez et al, 2018).

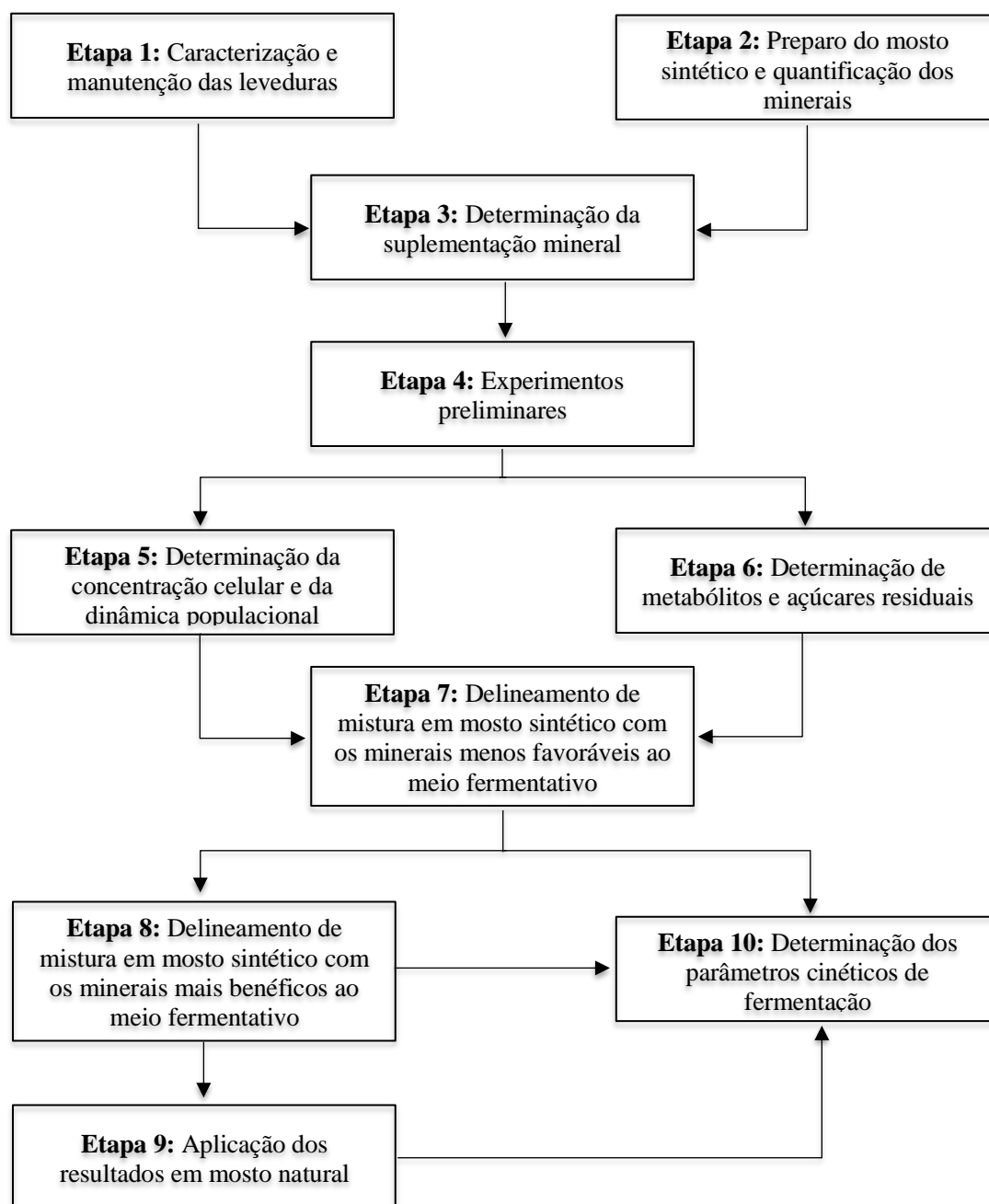
O fator de conversão do substrato em células ($Y_{X/S}$), definido originalmente por Monod, permite calcular a quantidade de massa celular produzida por grama de substrato consumido (Schmidell et al, 2001). Dessa forma, é possível determinar o substrato limitante e avaliar o meio fermentativo quanto às condições para o crescimento das leveduras (Stroppa et al, 2009).

O fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) corresponde a quantidade de substrato consumido por grama de produto produzido (Schmidell et al, 2001). É importante para verificar a inibição da ação das leveduras pela formação dos produtos (De Queiroz et al, 2014).

4. METODOLOGIA

As etapas desenvolvidas na execução do presente trabalho podem ser observadas na Figura 6.

Figura 6 - Fluxograma com as descrições das etapas executadas no presente trabalho.



Inicialmente, foi realizado a caracterização das leveduras utilizadas (Etapa 1), concomitantemente ao preparo, caracterização e quantificação da concentração mineral no mosto sintético (Etapa 2). Logo após, definiu-se a suplementação mineral a ser adicionada (Etapa 3), e as fermentações com e sem suplementação foram realizadas (Etapa 4). Em sequência, avaliou-se a concentração celular e dinâmica populacional (Etapa 5) e a quantidade de metabólitos e açúcares residuais (Etapa 6). Com os resultados obtidos nas Etapas 5 e 6, foi elaborado o delineamento de mistura com os minerais prejudiciais à fermentação (Etapa 7). A seguir, foi identificado o cenário fermentativo menos favorável por meio da análise estatística e dos parâmetros cinéticos de fermentação (Etapa 10). Na sequência foi elaborado um novo delineamento com os minerais que influenciaram positivamente a fermentação (Etapa 8), cujos resultados também foram analisados estatisticamente (Etapa 10). A partir dos resultados obtidos nesta última etapa, fez-se a validação dos experimentos utilizando mosto natural (Etapa 9).

4.1. Caracterização e manutenção das leveduras

Foram usadas 4 linhagens industriais de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e 1 contaminante, disponibilizadas pelo banco de cepas do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal de Goiás e apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Microrganismo utilizados nos ensaios fermentativos.

Tipo de Levedura	Especificação da Linhagem
BG-1	Industrial
CAT-1	
FT-858L	
PF-2	
LFS	Selvagem (com característica floculante)

A cepa selvagem foi isolada por Santos (2021) de amostras coletadas em distintas etapas do processo de produção do etanol em uma usina localizada no estado de Goiás.

Os microrganismos destas etapas foram submetidos a ensaios fermentativos para avaliar o consumo de açúcares, formação de etanol, ácido acético e glicerol. A levedura selvagem isolada do vinho fermentado, chamada de LFS, apresentou mais efeitos prejudiciais no trabalho de Santos (2021), reduzindo a produtividade do etanol e a eficiência do processo. Dessa forma, esta levedura foi usada neste estudo como o microrganismo contaminante.

A manutenção da levedura selvagem e das leveduras industriais foi feita utilizando os meios de cultura estéreis conforme especificado nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Meio de cultura GPY sólido.

Componentes do Meio	Concentração (g.L ⁻¹)
D-(+)-Glicose Anidra P.A	20
Peptona	5
Extrato de Levedura	5
Ágar – Ágar	15

Tabela 3 - Meio de cultura GPY líquido.

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

A preparação dos meios de manutenção (Tabelas 2 e 3) foi feita a partir da solubilização dos componentes em água destilada, transferido para frascos, que foram esterilizados em autoclave por 20 minutos a 120°C. Os frascos foram retirados, sendo aqueles contendo meio líquido mantidos em ambiente estéril, e os meios sólidos foram vertidos em placas de Petri estéreis.

As leveduras foram caracterizadas separadamente a partir do crescimento em placas de Petri estéreis com meio de cultura GPY sólido. As leveduras industriais BG-1, CAT-1, FT-858L e PE-2, foram identificadas da levedura selvagem LFS conforme suas características macro morfológicas no crescimento das colônias em placas, uma vez que, as leveduras industriais e contaminante usadas neste estudo possuem aspectos bem diferentes.

Para garantir a viabilidade celular das cepas foram feitos repiques, técnica que consiste na transferência de microrganismos de um meio de cultura para outro, a cada 3 meses.

4.2. Preparo do mosto sintético e quantificação do teor mineral

Para garantir a reprodutibilidade do experimento, usou-se o mosto sintético nas fermentações.

As concentrações de açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos, vitaminas e sais minerais usadas no preparo do mosto foram obtidas a partir da análise de uma safra de cana-de-açúcar

em parceria com o Instituto de Agroquímica e Tecnologia de Alimentos (IATA), situado na cidade de Valência, Espanha (Oliveira, 2016 apud Carneiro, 2018).

A preparação do mosto sintético foi realizada conforme as especificações de Santos (2017), com aproximadamente 160 g.L⁻¹ de sacarose.

Para preparar 1000 mL de mosto sintético, solubilizou-se os ácidos, açúcares e sais minerais (Anexo A), juntamente com 36,8 mL da solução de aminoácidos, 10 mL dos elementos traços e 1 mL de solução de vitaminas conforme as especificações do Anexo B. Após a solubilização dos nutrientes o pH foi corrigido com NaOH para 4,0 para minimizar a perda de nutrientes no mosto.

Por fim, o mosto sintético foi esterilizado por filtração a vácuo, com filtros de membrana com 0,22 µm de diâmetros dos poros, e conservado a 4°C.

Os cátions para avaliação do teor dos minerais foram determinados pelo tratamento empregado por Silva (2009) a partir da espectrometria de absorção atômica. O fotômetro de chama da marca Corning, modelo 400, foi usado na análise do potássio. O espectrofotômetro de absorção atômica Perkin Elmer, modelo PinAAcle 900F, foi usado na determinação do nitrogênio, cálcio, magnésio, cobre e ferro. Já a determinação do enxofre e fósforo se deu por meio do espectrofotômetro da marca Jenway, modelo 7305.

4.3. Determinação da suplementação mineral

Como a produção do etanol depende de inúmeros fatores, este trabalho relacionou as concentrações de minerais encontrados na quantificação mineral do mosto sintético e os valores sugeridos por Lima (2019) no Quadro 1. A suplementação de cada mineral foi realizada em duas distintas concentrações (Concentração I e II) conforme disposto na Tabela 4 e detalhado no item 5.2.

Tabela 4 - Concentrações de cada mineral suplementado nos experimentos preliminares.

Nutriente Mineral	Concentração I (g.L⁻¹)	Concentração II (g.L⁻¹)
Nitrogênio ((NH ₄ Cl)	2,000	5,000
Fósforo (KH ₂ PO ₄)	0,200	0,400
Potássio (KH ₂ PO ₄)	1,000	2,000
Cálcio (CaO)	0,200	0,300
Magnésio (MgSO ₄)	0,500	1,000
Enxofre (MgSO ₄)	0,300	0,400

Cobre (CuSO ₄ .5H ₂ O)	0,010	0,015
Ferro (FeSO ₄ .7H ₂ O)	0,080	0,100

As soluções minerais foram preparadas para as diferentes concentrações de cada mineral (Tabela 4) a partir da massa molar dos elementos (Apêndice A).

4.4. Experimentos preliminares com suplementação mineral para avaliação do desempenho fermentativo

Inicialmente fez-se o preparo dos inóculos das leveduras BG-1, CAT-1, FT-858L, PE-2 e da levedura selvagem LFS. Cada uma das leveduras foi retirada da sua placa com auxílio de uma alça metálica, e transferidas para respectivos tubos de *ependorfs* com 1 mL do meio GPY líquido.

Os tubos foram agitados em vórtex e incubados por 24 horas a 30°C. Finalizado o tempo de incubação, as diferentes cepas foram centrifugadas a 8000 rpm por 2 minutos, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 1 mL de água destilada estéril, para assim serem transferidas para o meio de fermentação. A concentração inicial foi ajustada em 0,3 g.L⁻¹ a partir do uso da curva padrão que relaciona absorbância (600 nm) e concentração celular (Equação 3).

$$y = 0,5665x^* \quad (3)$$

*Onde y é a concentração celular (g.L⁻¹) e x a absorbância.

Conforme estudos de Santos (2021), a levedura selvagem pode prejudicar significativamente a eficiência e produtividade das fermentações a 30% de contaminação e assim, os experimentos preliminares foram realizados com este percentual de contaminação. Desse modo, a concentração do inóculo foi ajustada para 0,09 g.L⁻¹ da levedura selvagem LFS e 0,0525 g.L⁻¹ de cada uma das leveduras industriais.

As fermentações foram conduzidas em microplacas de cultivo durante 72 horas à temperatura de 30°C, sob agitação de 150 rpm, utilizando volume útil de 2,5 mL de mosto sintético com diferentes concentrações minerais (Tabela 5).

Tabela 5 - Concentração de minerais (g.L⁻¹) utilizadas em mosto sintético para avaliação dos parâmetros fermentativos de produção de etanol na presença de levedura contaminante.

Mine ral	Concentração mineral nos experimentos preliminares (g.L ⁻¹)																
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16	E17
N	0,776	2,000	5,000	0,776	0,776	0,776	0,776	0,776	0,776	0,776	0,776	0,776	0,776	0,776	0,776	0,776	0,776
P	0,170	0,170	0,170	0,200	0,400	0,170	0,170	0,170	0,170	0,170	0,170	0,170	0,170	0,170	0,170	0,170	0,170
K	0,329	0,329	0,329	0,329	0,329	1,000	2,000	0,329	0,329	0,329	0,329	0,329	0,329	0,329	0,329	0,329	0,329

Ca	0,195	0,195	0,195	0,195	0,195	0,195	0,195	0,195	0,200	0,300	0,195	0,195	0,195	0,195	0,195	0,195	0,195
Mg	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,500	1,000	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050
S	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,209	0,300	0,400	0,209	0,209	0,209
Cu	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,010	0,015	0,007
Fe	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060	0,080	0,100

*E1: ensaio denominado controle por conter as concentrações dos minerais presente no mosto sintético; E2 e E3: enriquecido com NH_4CL como fonte de nitrogênio; E4 e E5: enriquecido com KH_2PO_4 como fonte de fósforo; E6 e E7: enriquecido com KH_2PO_4 como fonte de potássio; E8 e E9: enriquecido com CaO como fonte de cálcio; E10 e E11: enriquecido com $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ como fonte de magnésio; E12 e E13: enriquecido com $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ como fonte de enxofre; E14 e E15: enriquecido com $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ como fonte de cobre; E16 e E17: enriquecido com $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ como fonte de ferro.

O ensaio E1 recebeu o nome de fermentação controle por ser realizado sem suplementação mineral. Os resultados deste ensaio foram usados como parâmetros na avaliação da suplementação mineral.

Os experimentos foram conduzidos em triplicata e avaliados quanto a produção de etanol, glicerol e ácido acético e ao residual de sacarose, glicose e frutose.

4.5. Avaliação dos experimentos preliminares

4.5.1. Determinação da concentração celular e da dinâmica populacional

Finalizada as fermentações, determinou-se a absorbância de cada um dos ensaios pelo espectrofotômetro e calculou-se a concentração celular a partir da curva padrão expressa na Equação 3.

Para determinação da dinâmica populacional fez-se e a padronização da concentração celular em $0,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ para cada um dos ensaios e a posterior diluição seriada até 10^{-3} . Uma alíquota de $100 \mu\text{L}$ foi transferida para uma placa estéril com meio GPY sólido. As placas foram incubadas a 30°C durante 48 horas e visualizadas para contagem das colônias.

4.5.2. Determinação de metabólitos e açúcares residuais

Os açúcares residuais e a produção de etanol, glicerol e ácido acético foram quantificados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*).

Foi retirado 1 mL das amostras fermentadas para centrifugação por 2 minutos a 8000 rpm . O sobrenadante foi separado das células e diluído. Após, parte do sobrenadante foi filtrado em filtros Merck Millex-GP Filter com poros de $0,22 \mu\text{m}$ de diâmetro e injetado no HPLC.

O cromatógrafo da marca ©Shimadzu¹, modelo Prominence, com detectores de índice de refração (RID-20A) e UV-VIS (SPD-20A) foi utilizado para as análises em duas colunas Shim-pack SCR-102HG em série, uma para a amostra e outra para proteger a coluna.

4.6. Determinação dos minerais menos favoráveis ao processo fermentativo de produção do etanol utilizando mosto sintético

O planejamento experimental de misturas *simplex-lattice lattice* (Neto et.al., 2010) permite obter modelos cúbicos completos e avaliar os efeitos da interação ternária dos minerais no desempenho fermentativo de produção de etanol. Com isso, esse delineamento foi utilizado para encontrar quais os minerais menos favoráveis ao processo fermentativo em mosto sintético.

Os níveis máximo e mínimo de cada mineral foram estabelecidos a partir dos resultados dos experimentos preliminares, e a matriz de experimentos colocada na Tabela 6 mostra as proporções codificadas e reais para a mistura dos componentes.

Tabela 6 - Matriz real e codificada do delineamento de mistura *simplex-lattice* usando os minerais cálcio, fósforo e ferro para determinar o cenário menos benéfico ao desempenho fermentativo.

Ensaio	Valores reais (g.L ⁻¹) e codificados		
	X ₁	X ₂	X ₃
1	0,300 (1)	0,000 (0)	0,000 (0)
2	0,000 (0)	0,400 (1)	0,000 (0)
3	0,000 (0)	0,000 (0)	0,100 (1)
4	0,200 (1/2)	0,200 (1/2)	0,000 (0)
5	0,200 (1/2)	0,000 (0)	0,080 (1/2)
6	0,000 (0)	0,200 (1/2)	0,080 (1/2)
7	0,166 (1/3)	0,133 (1/3)	0,053 (1/3)
8	0,220 (2/3)	0,066 (1/6)	0,026 (1/6)
9	0,118 (1/6)	0,266 (2/3)	0,026 (1/6)
10	0,118 (1/6)	0,066 (1/6)	0,093 (2/3)

Onde: X₁ = Cálcio, X₂ = Fósforo, X₃ = Ferro.

Por meio da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) os parâmetros estabelecidos foram investigados e a condição mais prejudicial foi determinada.

Os coeficientes de determinação experimental (R²) e de determinação ajustado (R_A²) foram estabelecidos, e a análise estatística foi feita por meio da avaliação das variáveis respostas, tais como, a produção de etanol, o consumo de açúcares e a dinâmica populacional.

¹HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPH APPLICATION SYSTEMS, Shimadzu Corporation. Prominence Application Systems, Kyoto, Japan, 2013. Disponível em: <<http://www.partoz.com/Files/1/product/Liquid-Chromatograph/pdf/Application%20Systems.pdf>> Acesso em 26 abr 2021.

Fez-se a verificação da significância do modelo pela análise de variância, e o teste de falta de ajuste entre os valores observados experimentalmente e os preditos pelo modelo.

4.7. Determinação dos minerais mais favoráveis ao processo fermentativo de produção do etanol utilizando mosto sintético

A partir dos resultados encontrados nos experimentos preliminares e na análise dos minerais menos favoráveis ao processo fermentativo, fez-se a avaliação dos minerais mais benéficos à fermentação, objetivando a redução da contaminação e a produção de etanol.

Com o intuito de avaliar os benefícios dos minerais com potencial de favorecer o crescimento das leveduras industriais, fez-se o delineamento de mistura *simplex-centróide*, com o número de experimentos igual a 2^n-1 , na qual n é o número de minerais identificados como mais favoráveis ao processo, acrescido do ponto central (Neto et al, 2010).

A Tabela 8 mostra as proporções codificadas e reais para a mistura dos minerais Nitrogênio (X_1), Magnésio (X_2), Enxofre (X_3) e Cobre (X_4), totalizando 15 ensaios realizados em triplicata.

Tabela 7 – Matriz real e codificada do delineamento de mistura *simplex-centróide* usando os minerais nitrogênio, magnésio, enxofre e cobre para determinar a composição mais benéfica ao desempenho fermentativo.

Ensaio	Valores reais e codificados (g.L ⁻¹)			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
1	5,000 (1)	0,000 (0)	0,000 (0)	0,000 (0)
2	0,000 (0)	1,000 (1)	0,000 (0)	0,000 (0)
3	0,000 (0)	0,000 (0)	0,400 (1)	0,000 (0)
4	0,000 (0)	0,000 (0)	0,000 (0)	0,015 (1)
5	2,000 (1/2)	0,500 (1/2)	0,000 (0)	0,000 (0)
6	2,000 (1/2)	0,000 (0)	0,300 (1/2)	0,000 (0)
7	2,000 (1/2)	0,000 (0)	0,000 (0)	0,010 (1/2)
8	0,000 (0)	0,500 (1/2)	0,300 (1/2)	0,000 (0)
9	0,000 (0)	0,500 (1/2)	0,000 (0)	0,010 (1/2)
10	0,000 (0)	0,000 (0)	0,300 (1/2)	0,010 (1/2)
11	1,334 (1/3)	0,334 (1/3)	0,200 (1/3)	0,000 (0)
12	1,334 (1/3)	0,334 (1/3)	0,000 (0)	0,006 (1/3)
13	1,334 (1/3)	0,000 (0)	0,200 (1/3)	0,006 (1/3)
14	0,000 (0)	0,334 (1/3)	0,200 (1/3)	0,006 (1/3)
15	1,000 (1/4)	0,250 (1/4)	0,150 (1/4)	0,005 (1/4)

Onde: X₁ = Nitrogênio, X₂ = Magnésio, X₃ = Enxofre, X₄ = Cobre.

Os ensaios foram realizados considerando o cenário fermentativo menos favorável para a produção de etanol, obtido a partir dos resultados do delineamento com 3 componentes (detalhado no item 5.4). Com isso, além das proporções minerais detalhadas na Tabela 8, todas as fermentações foram suplementadas até $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ de cálcio.

Produção de etanol, sacarose residual e dinâmica populacional da levedura contaminante foram utilizadas como variáveis respostas e, a partir da definição da interação principal, os demais efeitos foram usados para determinação do erro experimental.

Os índices de significância dos modelos foram determinados pela análise de variância e teste de falta de ajuste, complementados pela análise da metodologia de superfície de resposta (MSR).

4.8. Determinação do cenário fermentativo mais favorável a produção de etanol utilizando mosto natural

Para verificar a aplicabilidade dos resultados obtidos experimentalmente com mosto sintético, realizou-se ensaios com o mosto natural seguindo todos os protocolos de colheita e extração utilizados na indústria.

Os resultados, obtidos como respostas nos delineamentos com 3 (Item 4.6) e 4 componentes (Item 4.7) respectivamente, foram reproduzidos em mosto natural, considerando a proporção das leveduras usadas nos experimentos preliminares com $0,09 \text{ g.L}^{-1}$ da levedura selvagem e $0,0525 \text{ g.L}^{-1}$ de cada levedura industrial.

Como o mosto foi cedido pela mesma usina sucroalcooleira em que a levedura contaminante usada neste estudo foi identificada e isolada (Santos, 2021), foram realizados ensaios apenas com as leveduras industriais, reajustando a concentração do inóculo de cada levedura industrial para $0,075 \text{ g.L}^{-1}$, para verificar a presença da levedura selvagem LFS.

O mosto natural foi caracterizado por cromatografia líquida de alta performance quanto a quantidade açúcares e os ensaios foram realizados em microplacas de cultivo com volume útil de $2,5 \text{ mL}$ de mosto, durante 72 horas, a temperatura de 30°C e agitação de 150 rpm.

4.9. Determinação dos parâmetros cinéticos de fermentação

A eficiência fermentativa (η), a produtividade (\emptyset), o fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) e fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) foram calculados por meio dos valores de concentração celular, residual de açúcares e concentração de etanol encontrados nas fermentações.

O rendimento teórico da fermentação alcoólica é de $0,511 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{ART consumido}}$ e de $0,538 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{sacarose}}$ (Daré, 2008; Santos, 2021). A partir da relação do rendimento prático pelo teórico

a eficiência fermentativa pode ser calculada considerando as proporções de açúcares usadas no mosto sintético (Anexo A). O rendimento é dado pela Equação 4.

$$\eta = \frac{\text{Rendimento prático}}{\text{Rendimento teórico}} = \frac{P_f / (S_0 - S_f)}{(0,538 * 0,875) + (0,511 * 0,125)} \times 100 = \frac{P_f / (S_0 - S_f)}{0,535} \times 100 \quad (4)$$

Sendo: η = Eficiência fermentativas (%); P_f = Concentração final de etanol (g.L^{-1}); S_0 = Concentração inicial de substrato (g.L^{-1}); S_f = Concentração final de substrato (g.L^{-1}).

A produtividade do etanol é calculada pela relação das concentrações inicial e final de etanol pelo tempo total da fermentação, conforme a Equação 5.

$$\emptyset = \frac{P_f - P_0}{t_f} \quad (5)$$

Sendo: \emptyset = Produtividade ($\text{g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$); P_f = Concentração final de etanol (g.L^{-1}); P_0 = Concentração inicial de etanol (g.L^{-1}); t_f = Tempo total de fermentação (h).

O fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) é calculado pela relação entre a diferença da concentração celular e a diferença da concentração do substrato, conforme a Equação 6.

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_r} \quad (6)$$

Sendo: $Y_{X/S}$ = Fator conversão de substrato a células ($\text{g}_{\text{biomassa}} \cdot \text{g}^{-1}$); X_f = Concentração celular final (g.L^{-1}); X_0 = Concentração celular inicial (g.L^{-1}); S_0 = Concentração inicial do substrato (g.L^{-1}); S_r = Concentração residual do substrato (g.L^{-1}).

O fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) é calculado pela relação entre a diferença da concentração de produto e a diferença da concentração de substrato, conforme a Equação 7.

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \quad (7)$$

Sendo: $Y_{P/S}$ = Fator de conversão de substrato em produto ($\text{g}_{\text{etanol}} \cdot \text{g}^{-1}$); P_f = Concentração final de etanol (g.L^{-1}); P_0 = Concentração inicial de etanol (g.L^{-1}); S_0 = Concentração inicial de substrato (g.L^{-1}); S_f = Concentração final de substrato (g.L^{-1}).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização morfológicas das leveduras

Como as cepas utilizadas neste estudo possuem características macromorfológicas de crescimento distintas, elas foram observadas e identificadas visualmente, conforme disposto na Figura 7, onde são mostradas as placas com as colônias industriais (Figura 7A) e contaminantes (Figura 7B) usadas nos ensaios.

Figura 7 - Leveduras usadas nos ensaios fermentativos sendo, (A) leveduras industriais em proporções iguais de BG-1, CAT-1, FT-858L e PE-2, (B) levedura LFS.



Fonte: O autor (2021)

Moreira et al. (2015) averiguou as características morfológicas de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* e observou que a maioria possuía uma textura brilhante, cor branca, superfície e borda lisa, e aspecto arredondado com elevação côncava, assim como encontrado no presente trabalho (Figura 7A).

Reis (2011), ao avaliar as leveduras selvagens, identificou-as como microrganismos rugosos, de forma indefinida e colônias mucosas assim como mostrado na Figura 7B.

As características observadas nas leveduras contaminantes dispostas na Figura 7B contribuem para a floculação das leveduras, redução do rendimento e maior tempo de fermentação (LNF, 2022). Segundo Santos (2021), 30% de contaminação da levedura LFS pode prejudicar significativamente o processo e reduzir a produção de etanol. Diante desta informação, os ensaios do presente estudo foram conduzidos com este nível de contaminação.

Cabrini e Gallo (1999) apontam ainda que as leveduras contaminantes podem se sobressair às leveduras industriais devido a agressividade na competição pelos nutrientes do meio fermentativo. Assim, experimentos suplementados foram realizados para avaliar a atuação dos minerais nas leveduras LFS.

5.2. Análise da concentração mineral em mosto sintético para determinação da suplementação mineral

As concentrações minerais quantificadas em mosto sintético, mosto natural e as concentrações sugeridas por Lima (2019) estão dispostas na Tabela 8.

Tabela 8 - Concentrações de minerais no mosto sintético, mosto natural e concentrações recomendadas por Lima (2019).

Mineral	N	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Fe
Mosto sintético (g.L ⁻¹)	0,776	0,170	0,329	0,195	0,050	0,209	0,007	0,060
Mosto natural (g.L ⁻¹)	2,282	0,0186	0,362	0,300	0,200	0,012	0,006	0,009
Lima (2019) (g.L ⁻¹)	0,04 a 5,90	0,062 a 0,56	0,7 a 0,8	0,120	0,07 a 0,20	0,002 a 0,28	0,007	0,0002

As concentrações encontradas no mosto sintético foram relacionadas com os valores recomendados por Lima (2019) e quantificados no mosto natural para auxiliar na definição das suplementações minerais.

As concentrações de nitrogênio, fósforo e enxofre encontradas no mosto sintético estão de acordo com os valores médios sugeridos por Lima (2019). Santos et al. (2008) indica que quantidades adequadas de nitrogênio evita a metabolização de outros compostos pela levedura e, conseqüentemente, a formação de substâncias indesejadas. Assim também, o fósforo, como um dos principais fatores responsáveis pela formação do álcool na fermentação, deve estar em concentração adequada para garantir o rendimento do processo (Novaes et al, 1971 apud Santos et al., 2008; Vasconcelos, 1987).

Em comparação com o mosto natural, o nitrogênio quantificado no mosto sintético está abaixo do mosto natural, enquanto as concentrações de fósforo e enxofre estão acima. Para manter valores próximos ao mosto natural, as concentrações de suplementação estabelecidas para o nitrogênio foram de 2 e 5 g.L⁻¹.

As concentrações estabelecidas para a suplementação de fósforo foram de 0,2 e 0,4 g.L⁻¹, mantendo-as na faixa de valores proposta por Lima (2019). Já as concentrações de enxofre foram fixadas em 0,3 e 0,4 g.L⁻¹, pouco acima do valor previsto por Lima (2019), para analisar se o efeito antimicrobiano do sulfito descrito por Góes-Favoni et al. (2018) se reproduzia também na levedura selvagem LFS.

Estudos de Lopes (1989) e Walker (2004) destacam que o cálcio pode substituir o potássio como estabilizador de membrana, ou ainda o nitrogênio substituindo o magnésio na manutenção da integridade estrutural das células. Como objetiva-se avaliar os efeitos da

suplementação mineral, as concentrações a serem suplementadas para potássio e magnésio foram definidos acima dos sugeridos por Lima (2019) e encontrados no mosto natural para analisá-los nos experimentos preliminares e minimizar este comportamento de substituição.

O cobre é o único mineral cujos valores encontrados e sugerido são semelhantes, podendo afirmar que a concentração determinada por Carneiro (2018) e Oliveira (2016) para este elemento no preparo do mosto sintético representa com maior precisão uma constância encontrada na natureza. Como o cobre é um elemento traço descrito para estar presente em baixas quantidades (Walker, 2004), a concentração de suplementação foi definida em 0,01 e 0,015 g.L⁻¹.

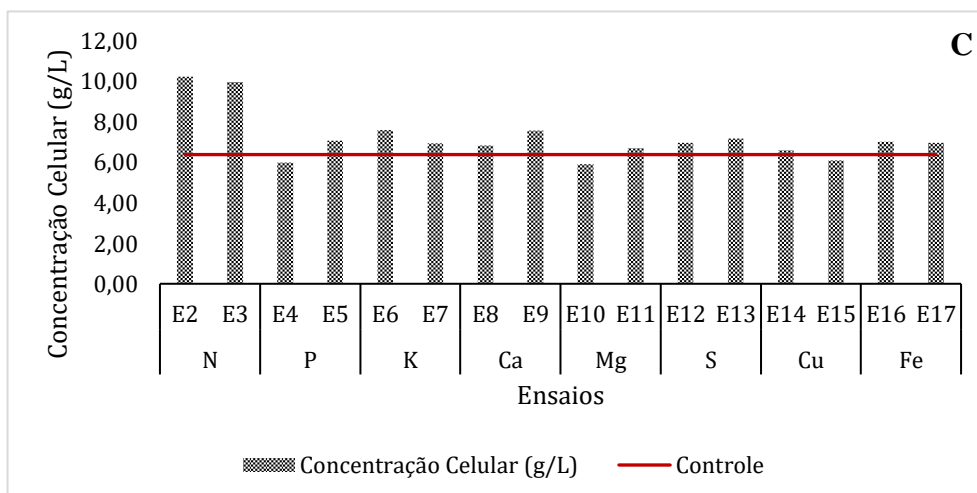
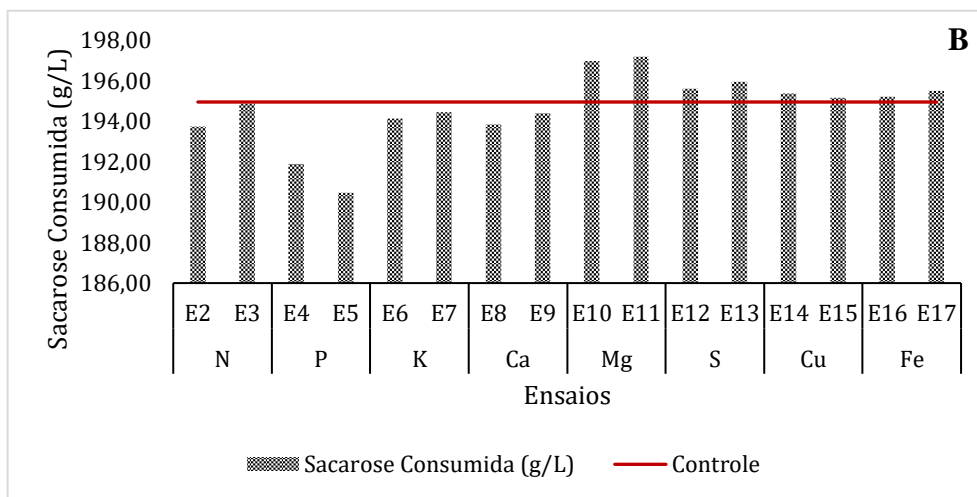
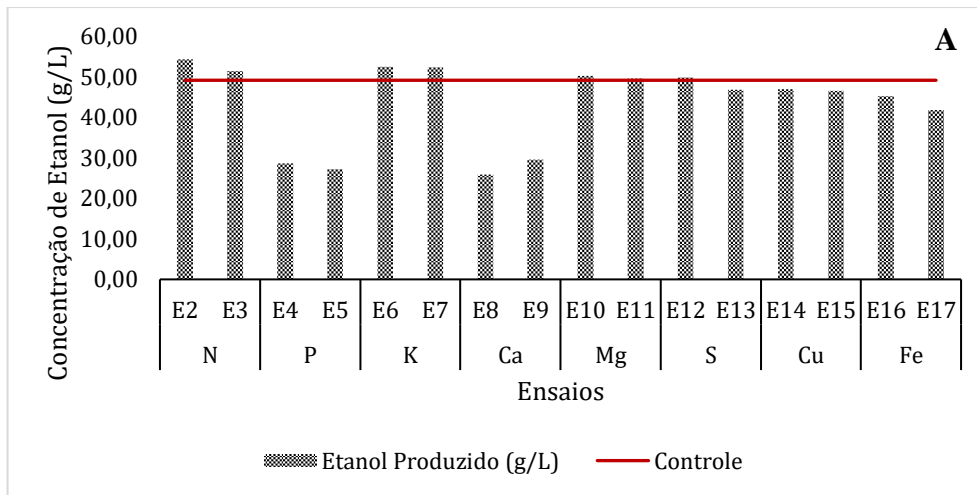
O ferro também é requerido em baixas concentrações para evitar estresse osmótico das leveduras (Stehlik-Thomas et al., 2004), e por isso foi sugerido em baixa quantidade por Lima (2019). No mosto natural a baixa concentração se repete e é menor que a quantificada no mosto sintético. Dessa forma, optou-se por uma pequena variação da concentração de ferro presente no mosto sintético e a suplementação foi estabelecida em 0,008 e 0,01 g.L⁻¹.

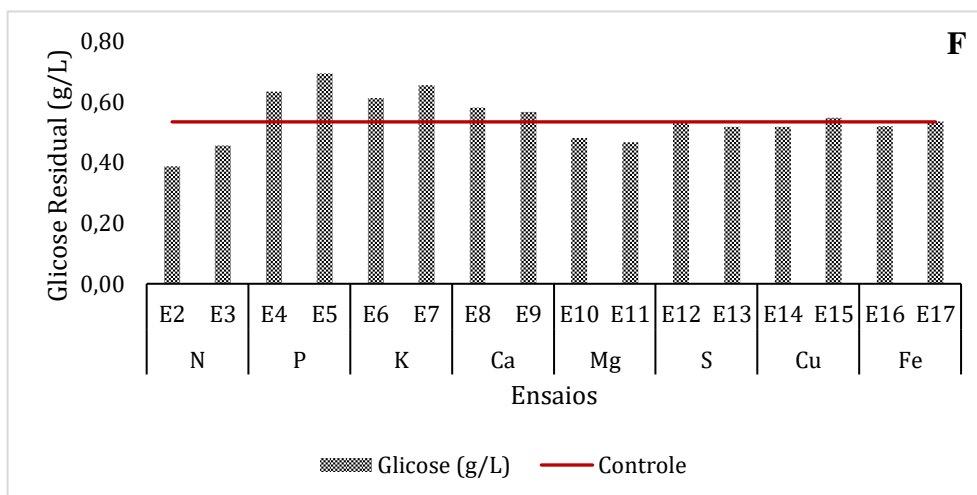
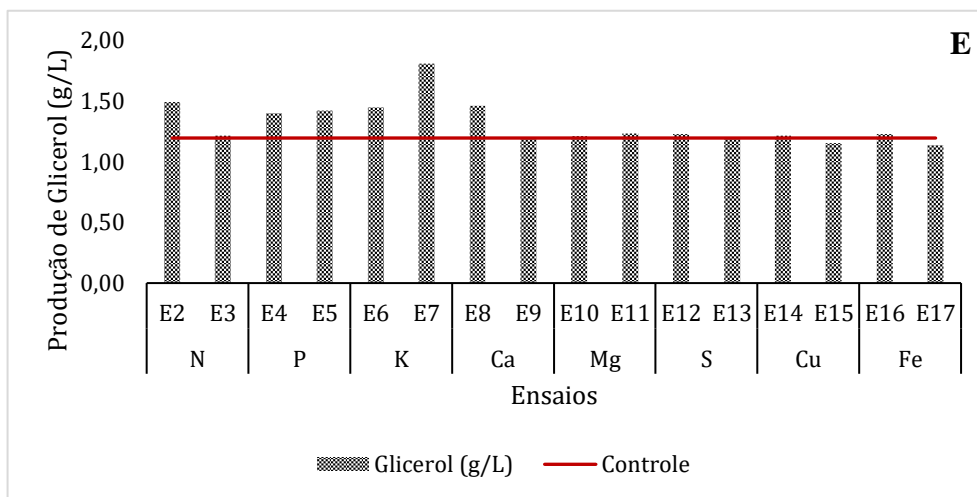
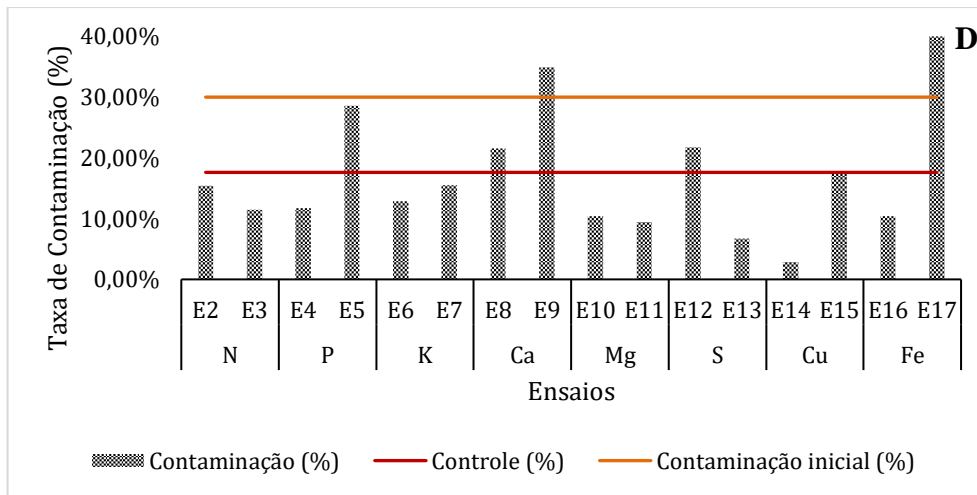
O cálcio na concentração de 0,2 g.L⁻¹ foi prejudicial ao desempenho fermentativo por inibir a produção de etanol nos estudos de Santos (2021). Este resultado foi determinante para a definição da suplementação do cálcio, visto que se trabalhou com a mesma cultura mista de leveduras industriais e selvagem. Sendo assim, a suplementação do cálcio foi estabelecida em 0,2 e 0,3 g.L⁻¹, mesma concentração do mosto natural, para avaliar o comportamento da fermentação com o mineral em excesso.

5.3. Avaliação da produção de etanol e dinâmica populacional nos estudos preliminares de suplementação mineral

O desempenho fermentativo dos experimentos preliminares com suplementação mineral foi avaliado por meio da presença de açúcares residuais, produção de etanol, concentração celular, nível de contaminação e produção de glicerol. Os ensaios realizados com mosto sintético suplementado foram comparados com aqueles não suplementados (controle) e podem ser observados na Figura 8.

Figura 8 - Desempenho fermentativo dos ensaios suplementados com minerais em cultura mista de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e levedura selvagem LFS a partir da (A) produção de etanol, (B) consumo de sacarose, (C) concentração celular, (D) nível de contaminação, (E) produção de glicerol e (F) glicose residual.





Russel (2003) aponta que a adição de fontes de nitrogênio tende a aumentar o rendimento fermentativo e Alves e Del Bianco (1971) destacam que nitrogênio em excesso impulsiona o consumo de açúcares. Nos ensaios suplementados com nitrogênio pode-se observar um efeito semelhante caracterizado pelo aumento da produção de etanol e do consumo de sacarose e glicose em comparação ao controle.

Em contrapartida, o maior consumo de açúcares pode acarretar a formação de subprodutos em reações paralelas, com o glicerol formado correspondendo de 8 a 15% da concentração de etanol (Gutierrez, 1991; Góes-Favoni et al., 2018). Com isso, a maior concentração de glicerol indica um possível desvio dos açúcares para a produção de metabólitos secundários, mas que mantém a produção de etanol.

A presença de nitrogênio também favorece significativamente a concentração celular, conforme visto na Figura 8C, com um aumento de até 60%. Este percentual é semelhante aos estudos de Lopes (1989), que observou 63% de aumento na concentração a partir da adição de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de sulfato de amônio. Similarmente, Vairo (1975 apud Lopes, 1989) observou que a produção de biomassa depende e é impulsionado pelo nitrogênio. Com isto, os experimentos suplementados com nitrogênio corroboram com tais trabalhos e evidenciam a importante ação do nitrogênio na multiplicação das células.

No entanto, pode-se inferir que este aumento da concentração celular é mais pronunciado para as leveduras industriais do que para as leveduras selvagens observando o menor nível de contaminação disposto na Figura 8D. Assim como verificado por Bishop (1971), os compostos nitrogenados mostram-se eficazes para aumentar a resistência das leveduras industriais a infecções, e os ensaios mostram que o mineral pode moderar a ação da levedura LFS.

Oliveira e Souza (1970) apud Lopes (1989) apontam que a presença do fósforo influi no sistema ADP-ATP e no metabolismo nitrogenado, ou seja, um aumento no teor de fósforo pode reduzir o teor de nitrogênio. Desse modo, a produtividade dos ensaios suplementados com fósforo contrapõe-se aos do nitrogênio, e evidenciam a baixa produção de etanol e menor consumo de açúcares em comparação ao controle.

Além disso, Monteiro (2016) destaca que o excesso de íons fosfato no meio fermentativo força o metabolismo respiratório, dificulta a atuação do sistema nitrogenado, compromete a clivagem inicial de sacarose e conseqüentemente a seqüência de reações da via glicolítica. Um comportamento semelhante é observado nos experimentos suplementados com fósforo pelo conseqüente residual de sacarose bem como pela maior produção de produtos secundários como ácido acético e glicerol (Figura 8E).

Contudo, a concentração celular e o nível de contaminação são afetados de maneira distinta nas duas concentrações avaliadas: enquanto a suplementação de $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ reduz a concentração celular e a contaminação, a suplementação de $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ aumenta ambos. Desse modo, sugere-se que $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ de fósforo favorece as leveduras selvagens à vista do aumento da concentração de células acompanhada da maior contaminação, assim como observado por Zago (1982) para concentrações de fósforo acima de $0,15 \text{ g.L}^{-1}$. Tais resultados mostram que a ação do fósforo sobre as leveduras industriais foi prejudicial.

Os distintos resultados dos ensaios suplementados com fósforo e potássio demonstram que, apesar da mesma fonte de enriquecimento, a concentração de potássio presente no mosto sintético pode ser insuficiente para atenuar a atividade do íon PO_4^{3-} assim como colocado em

Lopes (1989). Sendo assim, a suplementação tende a corrigi-la e garantir a absorção do íon fosfato.

Além disso, o potássio induz a ação de conversão do açúcar e pode aumentar seu consumo em até 83% pela reversão do efeito inibitório causado por íons H^+ (Alves, 1994; Borzani et al., 2001; Walker, 2004). Ainda que o consumo de sacarose e glicose sejam inferiores ao controle, a ação de conversão do açúcar pode ser constatada pela maior produção de etanol. De modo semelhante, a maior produção de glicerol dentre os experimentos preliminares, pode contrapor as observações de Rothstein e Demis (1953) e indicar a conversão de açúcares em subprodutos por meio das rotas metabólicas secundárias, conforme descrito por Lopes (1989).

Alves (1994) destaca ainda que o potássio é um elemento de comportamento multifacetado que em excesso mostra-se estressante às leveduras e inibe o crescimento das cepas selecionadas e dos microrganismos contaminantes. Nas Figuras 8C e 8D é possível observar que os ensaios suplementados com potássio aumentam a concentração celular e reduzem a contaminação, sugerindo que as concentrações empregadas estão em quantidades adequadas, de modo a favorecer o crescimento das leveduras industriais frente às leveduras selvagens.

Segundo Chotineerant et al. (2010), o aumento de íons Ca^{2+} inibe a ação da enzima invertase na conversão de sacarose em açúcares invertidos, e um comportamento semelhante pode ter ocorrido nos ensaios suplementados com cálcio visto o menor consumo de açúcares. Além disso, os ensaios mostram menor produção de etanol e maior formação de subprodutos como glicerol e ácido acético, corroborando assim com os estudos de Santos et al. (2021) que observaram um menor desempenho fermentativo com $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de cálcio no meio.

Na avaliação da dinâmica populacional, a contaminação foi superior aos 30% iniciais para ambos os ensaios suplementados com cálcio, indicando que o mineral beneficia a levedura selvagem utilizada e provavelmente a coloca como dominante no processo de fermentação. Resultados similares foram encontrados nos estudos de Teixeira et al. (1995).

Com tal característica, o beneficiamento das leveduras selvagens pode estar relacionado à maior concentração celular. O aumento da disponibilidade de cálcio no meio coíbi a ação das leveduras selecionadas ao ligar-se às paredes celulares de todas as espécies utilizadas na fermentação e favorece a produção de biomassa (Walker, 2004; Trofimova, Walker e Rapoport, 2010), sugerindo assim que a concentração celular superior ao controle pode resultar, em maioria, das leveduras LFS.

Nos ensaios suplementados com magnésio a produção de etanol é semelhante ao controle enquanto o consumo de açúcares mostra-se superior. Este resultado se assemelha aos estudos de Walker et al. (1996) e Rees e Stewart (1997) que atribuem o maior consumo de substrato ao sistema de transporte específico das leveduras que absorvem o magnésio de forma intracelular e fomentam o consumo de açúcares.

Além disso, Walker e Maynard (1996) apontam que a biodisponibilidade do magnésio no meio fermentativo viabiliza diversas reações durante a fermentação, principalmente na

proteção aos estresses gerados pela presença de metabólitos no decorrer do processo. Um efeito semelhante pode ter acontecido nos ensaios, de modo que a produção de etanol e a concentração de glicerol sofressem baixas variações e mantivessem valores próximos ao controle.

A suplementação com magnésio apresenta também significativa redução da contaminação enquanto a concentração celular permaneceu próxima aos valores do controle. Segundo Góes-Favoni et al. (2018) e Li et al. (2020) a adição de magnésio favorece a rápida multiplicação celular assim como o crescimento de microrganismos selvagens como diversas cepas *E. coli*. Os experimentos preliminares do presente trabalho demonstraram um maior crescimento celular para as leveduras industriais, no entanto, o favorecimento das leveduras contaminantes não ocorreu. Esses resultados sugerem que a adição de magnésio inibe o crescimento da levedura selvagens LFS e favorece apenas o crescimento das leveduras industriais.

O enxofre é suplementado a partir da mesma fonte usada para o magnésio, o que impede maior semelhança para a produção de etanol e glicerol nos ensaios E10, E11, E12 e E13.

O sulfito atua na estabilidade das reações, na manutenção da fermentação e, em excesso, pode impulsionar a produção de etanol pelo maior consumo de sacarose (Alves, 1994; Amaral et al., 2009). A estabilidade promovida pelo sulfito pode manter as concentrações próximas ao controle, mas o consumo de sacarose ligeiramente superior ao controle, observado nos ensaios suplementados com íons SO^{2-} , não converge na produtividade do etanol, indicando uma possível tendência do enxofre em formar produtos secundários como o residual de glicose observado na Figura 8F.

A concentração celular 10% superior ao controle demonstra que as células de levedura podem evitar o efeito tóxico e se adaptar em meios suplementados com enxofre conforme relatado por Amaral et al. (2009).

Por outro lado, o ensaio com $0,400 \text{ g.L}^{-1}$ de enxofre (E13) reduz a taxa de contaminação para 6,7% e mostra que o enxofre pode potencializar o crescimento de leveduras industriais e inibir a multiplicação da levedura selvagem LFS. De modo semelhante, Góes-Favoni et al. (2018) mostra que o sulfito atua como um antimicrobiano tanto para bactérias como para leveduras ao ligar-se aos receptores celulares da parede celular dos microrganismos indesejáveis e inibi-los.

Nos ensaios suplementados com cobre, a produção de etanol, a concentração celular e o residual de açúcares possuem resultados próximos ao controle, comportamento semelhante ao encontrado por Naiki e Yamagata (1976) onde leveduras selecionadas - ou industriais - possuem alta tolerância ao cobre e interferem discretamente no meio fermentativo.

A redução da contaminação também pode estar associada ao cobre, chegando a 2,9% de contaminação (E14) com $0,010 \text{ g.L}^{-1}$, e 17,6% (E15) com $0,015 \text{ g.L}^{-1}$. A maior redução observada para a contaminação indica que maiores concentrações podem estar relacionadas à competição com íons SO^{2-} , aumentando a toxicidade e minimizando o efeito inibidor do cobre assim como apontado por Ramos-Alonso et al. (2008).

Assim como nas suplementações com cobre, a presença do ferro não induz o consumo de açúcares, mantendo-o próximo aos resultados encontrados no controle. Segundo Lopes (1989), o ferro possui importância secundária no meio fermentativo quando comparado ao nitrogênio, fósforo e magnésio, indicando assim que sua suplementação não afeta significativamente os parâmetros fermentativos.

Serrano et al. (2004) e Philpott e Protchenko (2008) demonstraram que a adição de ferro não melhora o crescimento das cepas inoculadas, no entanto os resultados dispostos na Figura 8D mostram um crescimento para as leveduras LFS. Tal resultado sugere que o ferro beneficia as leveduras selvagens frente às industriais, e assim, pode provocar reduções na produção de etanol conforme disposto na Figura 9A.

Com os resultados dos experimentos preliminares, tem-se que fósforo, cálcio e ferro são os minerais mais prejudiciais à fermentação, afetando a produção de etanol e atuando no favorecimento das leveduras selvagens.

Nitrogênio, magnésio, enxofre e cobre mostraram-se benéficos ao processo, com destaque ao nitrogênio que fomenta o crescimento celular e a produção de etanol, e o magnésio que reduz consideravelmente a contaminação.

O potássio, apesar de reduzir a contaminação e promover a produção de etanol, utiliza da mesma fonte de enriquecimento que o fósforo. Diante das concentrações estabelecidas e dos experimentos em mistura para determinar o cenário menos favorável a fermentação, optou-se por não utilizar este mineral para evitar interferências na análise e uma possível ação conjunta ou competitiva no meio.

5.4. Determinação do pior cenário fermentativo a partir do delineamento de mistura com os minerais menos favoráveis obtidos nos experimentos preliminares suplementados

Os parâmetros fermentativos obtidos como resultado do delineamento de mistura *simplex-lattice* com as concentrações suplementadas de fósforo, cálcio e ferro estão dispostos na Tabela 9.

Tabela 9 – Valores reais e codificados, contaminação, concentração celular, fator de conversão de substrato a células ($Y_{X/S}$), concentração final de etanol, fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$), produtividade (\emptyset), eficiência fermentativa (η) e sacarose residual, para os ensaios do delineamento de mistura com cálcio, fósforo e ferro.

Ensaio	Níveis das variáveis independentes codificadas e reais			Contaminação Final (%)	Concentração Celular		Etanol			Sacarose Final (g.L ⁻¹)	
	Ca	P	Fe		Final (g.L ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (g.g ⁻¹)	Final (g.L ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (g.g ⁻¹)	\emptyset (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)		η (%)
1	1 (0,300)	0 (0,000)	0 (0,000)	34,45 ± 8,90 ^a	7,88 ± 0,360a	0,068 ± 0,002 ^a	42,508 ± 2,129 ^a	0,366 ± 0,024 ^a	0,590 ± 0,030a	68,45 ± 4,60a	33,487 ± 2,035a
2	0 (0,000)	1 (0,400)	0 (0,000)	38,86 ± 15,80 ^a	7,72 ± 0,583a	0,054 ± 0,004 ^a	41,642 ± 2,342 ^a	0,292 ± 0,016 ^a	0,578 ± 0,033a	54,56 ± 3,00a	7,004 ± 0,150b
3	0 (0,000)	0 (0,000)	1 (0,100)	18,80 ± 4,00a	7,72 ± 0,447a	0,060 ± 0,008 ^a	30,279 ± 16,897a	0,249 ± 0,154 ^a	0,420 ± 0,235a	45,55 ± 28,7b	20,758 ± 17,795ab
4	½ (0,100)	½ (0,200)	0 (0,000)	10,32 ± 13,90 ^a	7,58 ± 0,433a	0,064 ± 0,005 ^a	38,633 ± 3,978 ^a	0,328 ± 0,039 ^a	0,536 ± 0,055a	61,38 ± 7,30a	31,828 ± 2,116a
5	½ (0,100)	0 (0,000)	½ (0,080)	15,15 ± 13,50 ^a	7,76 ± 0,672a	0,065 ± 0,006 ^a	41,101 ± 2,465 ^a	0,345 ± 0,022 ^a	0,571 ± 0,034a	64,47 ± 4,10a	30,471 ± 0,692a
6	0 (0,000)	½ (0,200)	½ (0,080)	13,23 ± 2,20 ^a	7,62 ± 0,312a	0,064 ± 0,003 ^a	42,726 ± 2,553 ^a	0,362 ± 0,023 ^a	0,593 ± 0,035a	67,65 ± 4,20a	31,582 ± 0,485a
7	1/3 (0,166)	1/3 (0,133)	1/3 (0,053)	27,09 ± 23,4 ^a	6,88 ± 1,097a	0,059 ± 0,009 ^a	41,058 ± 2,557 ^a	0,352 ± 0,023 ^a	0,570 ± 0,036a	65,76 ± 4,30a	32,930 ± 0,418a
8	2/3 (0,220)	1/6 (0,066)	1/6 (0,026)	30,76 ± 4,60 ^a	7,74 ± 1,174a	0,073 ± 0,015 ^a	45,801 ± 4,473a	0,431 ± 0,066 ^a	0,636 ± 0,066a	80,61 ± 12,30a	42,851 ± 6,568a
9	1/6 (0,118)	2/3 (0,266)	1/6 (0,026)	23,08 ± 10,30 ^a	7,83 ± 0,469a	0,064 ± 0,008 ^a	42,019 ± 1,286a	0,345 ± 0,037 ^a	0,583 ± 0,018a	64,47 ± 6,80a	26,594 ± 17,526a
10	1/6 (0,118)	1/6 (0,066)	2/3 (0,093)	25,99 ± 13,20 ^a	7,27 ± 0,709a	0,064 ± 0,006 ^a	43,461 ± 3,111a	0,386 ± 0,033 ^a	0,603 ± 0,043a	72,21 ± 6,10a	37,060 ± 1,571a
C*	0 (0,000)	0 (0,000)	0 (0,000)	10,65 ± 2,40 ^a	8,42 ± 0,216 ^a	0,074 ± 0,002 ^a	41,746 ± 2,527a	0,371 ± 0,021 ^a	0,579 ± 0,035a	69,32 ± 3,90a	37,086 ± 0,616a

* Onde C representa o controle, a fermentação com a quantificação mineral presente no mosto e sem suplementação.

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

Os ensaios 1 e 2, suplementados respectivamente com cálcio e fósforo, repetiram os resultados encontrados nos experimentos suplementados (item 5.3). Isto indica uma tendência de prejudicialidade que favorece a levedura selvagem LFS e reduz a formação do etanol quando há suplementação de cálcio ou fósforo.

O ensaio 3, suplementado com ferro, apresentou redução da contaminação e contrapõe-se aos resultados encontrados nos experimentos preliminares que apontaram aumento. Apesar disso, a prejudicialidade ao desempenho fermentativo se repetiu com menor eficiência e produção de etanol. Assim pode-se inferir que a redução da contaminação não é suficiente para melhorar o processo.

As interações de dois minerais nos ensaios 4, 5 e 6 expressam resultados mais favoráveis, em comparação com os demais, visto que houve redução da contaminação. Com isso, os experimentos em mistura demonstraram que a combinação de dois minerais, tidos individualmente como prejudiciais, pode melhorar o desempenho fermentativo. Um efeito semelhante é descrito por Handajani, Gumilar e Syafila (2018) onde magnésio e ferro na proporção de 3/5 promovem maior concentração de etanol.

Para as misturas com três variáveis os resultados apontam uma tendência de prejudicialidade assim como nos ensaios unitários (ensaios 1, 2 e 3). No entanto, o ensaio 8 com maior nível de cálcio, e o ensaio 10 com maior nível ferro, apresentam rendimento e produtividade superiores ao controle. Dessa forma, infere-se que a proporção de cálcio, fósforo e ferro no meio fermentativo é determinante para o desempenho do processo.

Para auxiliar na interpretação dos resultados, usou-se modelos matemáticos para avaliar os ensaios com uma, duas e três variáveis. Em vista dos resultados obtidos com o delineamento, optou-se por avaliar o ajuste dos modelos linear, quadrático e cúbico especial para a produção de etanol e a contaminação, uma vez que são os parâmetros de maior relevância.

A análise de variância ao nível de 5% de significância, o residual quadrático médio (MSR), o coeficiente de determinação experimental (R^2) e o coeficiente de determinação ajustado (R_A^2) são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Residual quadrático médio (MSR), coeficientes de determinação experimental (R^2) e coeficientes de determinação ajustados (R_A^2) para os modelos linear, quadrático e cúbico no delineamento do tipo *simplex-látice*, e avaliados para o grau de contaminação e a produção de etanol.

Variável dependente	Modelo	MSR	R ²	R _A ²
Nível de Contaminação	Linear	0,0079	0,3386	0,1497
	Quadrático	0,0065	0,6898	0,3021
	Cúbico Especial	0,0057	0,7940	0,3820
Produção de Etanol	Linear	3,1410	0,0718	0,0000
	Quadrático	1,7764	0,7000	0,3250
	Cúbico Especial	1,8584	0,7646	0,2939

Os modelos matemáticos expressam a relação entre os minerais e os resultados de contaminação e produção de etanol e, segundo Martins (2018), são significativos quando o coeficiente de determinação (R²) tende a 1 e o residual quadrático médio (MSR) tende a 0.

Para a contaminação, o modelo matemático cúbico especial, em comparação com os modelos linear e quadrático, apresentam menores MSR e R² mais próximo de 1. Assim, o modelo cúbico especial representa com maior precisão a interação dos minerais na avaliação da contaminação.

Para a produção de etanol, o MSR do modelo quadrático é ligeiramente menor do que no modelo cúbico especial, o que pode refletir a presença de *outliers* (alto desvio padrão) assim como apontado por Martins (2018). Como a diferença entre os MSR é pequena e o coeficiente de determinação tende a 1 (modelo cúbico), este modelo foi utilizado para análise da interação dos minerais na produção de etanol.

A Tabela 11 apresenta os modelos matemáticos que descrevem o comportamento do grau de contaminação e da produção de etanol em função da concentração dos minerais cálcio (x₁), fósforo (x₂) e ferro (x₃).

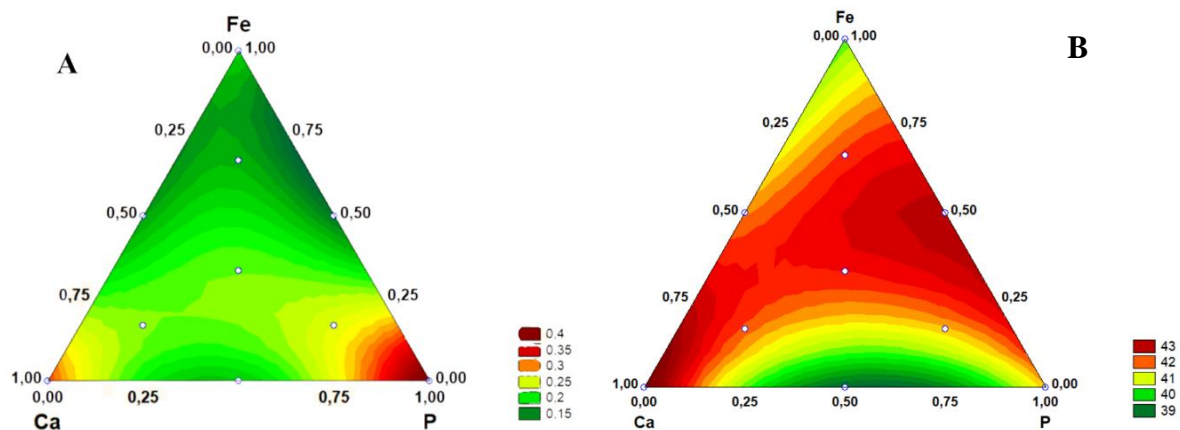
Tabela 11 - Modelos matemáticos para o grau de contaminação e a produção de etanol em função da concentração mineral de cálcio (x₁), fósforo (x₂) e ferro (x₃).

Variável resposta	Modelo cúbico especial
Nível de contaminação	$y = 0,312451x_1 + 0,423073x_2$
Produção de etanol	$y = 43,9989x_1 + 41,4526x_2 + 40,3059x_3$

Os modelos expressos na Tabela 11 corroboram com os experimentos preliminares suplementados e mostram que a contaminação é mais influenciada pela atuação isolada de cálcio e fósforo, enquanto a produção de etanol sofre um efeito unitário dos três minerais usados nos experimentos em mistura.

A atuação do cálcio, fósforo e ferro na contaminação e produção de etanol também foi avaliada pela metodologia de superfície de resposta conforme expresso na Figura 9.

Figura 9 - Curvas de nível para a (A) contaminação e a (B) produção de etanol nos 10 ensaios realizados conforme o delineamento de mistura *simplex-látice* para cálcio, fósforo e ferro.



Na metodologia de superfície de resposta as regiões verdes correspondem às respostas de menor valor numérico, e as regiões avermelhadas são as áreas de maior concentração (Reis e Andrade, 1996).

A Figura 9A é predominada por uma ampla faixa verde, indicando as menores contaminações. As regiões de coloração amarelada e avermelhada limitam-se aos vértices especialmente de cálcio e fósforo, corroborando com o modelo matemático que aponta as variáveis Ca e P como as mais influentes no nível de contaminação. A Figura 9B mostra uma faixa esverdeada para o ferro e para a mistura de cálcio e fósforo. Estes resultados apontam que nestas regiões ocorrem a menor produção de etanol, assim como apontado pelo modelo matemático (Tabela 11) e nos ensaios do delineamento de mistura (Tabela 9).

O comportamento do cálcio, fósforo e ferro na metodologia de superfície de resposta indicam uma atuação individual de cada mineral, assim como apontado pelo modelo matemático (Tabela 11), e os resultados são semelhantes ao encontrado nos experimentos preliminares com suplementação mineral.

Tais resultados assemelham-se, mais uma vez, aos estudos de Santos et al. (2021) e Zago (1982) que apontam redução da eficiência fermentativa quando a concentração de cálcio e fósforo são, respectivamente, $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,15 \text{ g.L}^{-1}$. A contaminação pouco influenciada pelo ferro corrobora com estudos de Philpott e Protchenko (2008) visto que a adição de ferro não favoreceu o crescimento das leveduras selvagens, mas inibiu a produção de etanol.

Para definição do cenário fermentativo menos favorável à produção de etanol, fez-se ainda a comparação entre os resultados previstos pelo modelo e os obtidos nos ensaios. Os dados estão alocados na Tabela 12.

Tabela 12 – Comparação entre os valores experimentais e preditos para o grau de contaminação e a produção de etanol nos ensaios do delineamento *simplex-látice*.

Variável resposta	Mineral	Valor Observado	Valor Predito	Desvio	Erro (%)
Nível de Contaminação	Ca	0,3445	0,3124	0,0321	10,27
	P	0,3886	0,4231	0,0345	8,15
	Fe	0,1880	0,1860	0,0020	1,07
Produção de Etanol	Ca	42,508	43,999	1,491	3,38
	P	41,642	41,453	0,189	0,46
	Fe	30,279	40,306	10,027	24,87

Na Tabela 12, o maior desvio entre o valor observado e predito ocorre para o ferro na produção de etanol. Assim como apontado anteriormente na análise do MSR e do R^2 , o desvio pode representar *outliers*, isto é, dados com expressiva diferença usados para compor a média e que interferem no resultado da análise estatística (Martins, 2018).

Diante dos resultados encontrados, a suplementação com cálcio e fósforo são as mais prejudiciais à produção do etanol, com destaque ao cálcio que, em maiores níveis nas interações binárias e ternárias apresentou desempenho fermentativo inferior aos demais ensaios.

Além disso, a calagem é uma das etapas da produção de etanol e consiste na adição de cal (CaO) para corrigir a acidez do caldo, evitar a degradação da sacarose e aumentar a biodisponibilidade de nutrientes (Rossetto et al, 2004). A calagem pode aumentar os níveis de íons Ca^{2+} na fermentação e ocasionar os problemas verificados no decorrer deste trabalho para suplementações com o cálcio. Além do possível problema real, o favorecimento às leveduras contaminantes é mais pronunciado que para o fósforo, indicando um grave problema para as usinas de etanol.

Estudos como de Barbour e Priest (1988) e Mankanjuola, Tymon e Springham (1992) apontam redução da produtividade e queda do rendimento do etanol em meios com microrganismos contaminantes. Portanto, o favorecimento das leveduras selvagens indica um grave problema para as usinas de etanol e faz do meio suplementado com cálcio o cenário fermentativo mais prejudicial a produção de etanol.

5.5. Solução do pior cenário fermentativo a partir do delineamento de mistura com os minerais mais favoráveis obtidos nos experimentos preliminares suplementados

A partir da definição do cenário fermentativo menos favorável ao processo, fez-se um delineamento de mistura do tipo *simplex-centróide* com os quatro minerais identificados como benéficos nos experimentos preliminares suplementados. Os 15 ensaios sugeridos pelo delineamento foram suplementados a $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ de cálcio para analisar o desempenho do processo com cálcio em excesso, e as condições de fermentação foram mantidas. Os parâmetros obtidos como resultado das fermentações em misturas estão dispostos na Tabela 13.

Tabela 13 - Valores reais e codificados, contaminação, concentração celular, fator de conversão de substrato a células ($Y_{X/S}$), concentração final de etanol, fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$), produtividade (\emptyset), eficiência fermentativas (η) e sacarose residual, para os ensaios do delineamento de mistura com nitrogênio, magnésio, enxofre e cobre.

Ensaio	Níveis das variáveis independentes codificadas e reais				Contaminação	Concentração Celular			Etanol			Sacarose
	N	Mg	S	Cu	Final (%)	Final (g.L ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (g.g ⁻¹)	Final (g.L ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (g.g ⁻¹)	\emptyset (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	η (%)	Final (g.L ⁻¹)
1	1 (5,000)	0 (0,000)	0 (0,000)	0 (0,000)	9,58 ± 4,73 ^a	11,38 ± 2,59 ^a	0,083 ± 0,019 ^a	38,985 ± 1,913 ^a	0,287 ± 0,014 ^a	0,541 ± 0,026 ^a	53,63 ± 2,72 ^a	29,071 ± 0,430 ^a
2	0 (0,000)	1 (1,000)	0 (0,000)	0 (0,000)	26,56 ± 6,03 ^a	8,49 ± 0,58 ^a	0,062 ± 0,004 ^a	41,611 ± 2,178 ^a	0,305 ± 0,018 ^a	0,578 ± 0,030 ^a	57,03 ± 3,33 ^a	28,544 ± 1,131 ^a
3	0 (0,000)	0 (0,000)	1 (0,400)	0 (0,000)	23,09 ± 5,14 ^a	7,22 ± 0,25 ^a	0,053 ± 0,002 ^a	39,723 ± 1,596 ^a	0,290 ± 0,011 ^a	0,552 ± 0,022 ^a	54,27 ± 2,17 ^a	28,144 ± 0,309 ^a
4	0 (0,000)	0 (0,000)	0 (0,000)	1 (0,015)	19,72 ± 10,26 ^a	6,74 ± 0,22 ^a	0,051 ± 0,002 ^a	41,468 ± 1,709 ^a	0,312 ± 0,011 ^a	0,576 ± 0,023 ^a	58,30 ± 2,16 ^a	32,012 ± 1,218 ^a
5	½ (2,000)	½ (0,500)	0 (0,000)	0 (0,000)	13,13 ± 10,08 ^a	11,33 ± 1,68 ^a	0,083 ± 0,013 ^a	40,606 ± 3,809 ^a	0,299 ± 0,027 ^a	0,564 ± 0,053 ^a	56,02 ± 5,11 ^a	29,494 ± 0,360 ^a
6	½ (2,000)	0 (0,000)	½ (0,300)	0 (0,000)	20,52 ± 6,24 ^a	13,06 ± 0,73 ^a	0,095 ± 0,006 ^a	36,780 ± 2,942 ^a	0,269 ± 0,023 ^a	0,511 ± 0,041 ^a	50,41 ± 4,31 ^a	28,539 ± 1,150 ^a
7	½ (2,000)	0 (0,000)	0 (0,000)	½ (0,010)	22,37 ± 3,63 ^a	16,07 ± 3,26 ^a	0,118 ± 0,024 ^a	38,624 ± 5,009 ^b	0,284 ± 0,038 ^a	0,536 ± 0,069 ^a	53,00 ± 7,25 ^a	28,627 ± 1,971 ^a
8	0 (0,000)	½ (0,500)	½ (0,300)	0 (0,000)	11,16 ± 4,69 ^a	7,77 ± 0,67 ^b	0,057 ± 0,005 ^a	40,226 ± 1,995 ^a	0,296 ± 0,015 ^a	0,558 ± 0,027 ^a	55,27 ± 2,82 ^a	28,901 ± 0,221 ^a
9	0 (0,000)	½ (0,500)	0 (0,000)	½ (0,010)	18,75 ± 21,38 ^a	8,23 ± 0,77 ^a	0,062 ± 0,005 ^a	42,768 ± 3,446 ^a	0,321 ± 0,028 ^a	0,594 ± 0,048 ^a	59,90 ± 5,27 ^a	31,432 ± 1,468 ^a
10	0 (0,000)	0 (0,000)	½ (0,300)	½ (0,010)	23,69 ± 16,68 ^a	7,40 ± 0,65 ^a	0,054 ± 0,005 ^a	39,000 ± 7,140 ^a	0,286 ± 0,057 ^a	0,541 ± 0,099 ^a	53,47 ± 10,74 ^a	28,240 ± 3,265 ^a
11	1/3 (1,334)	1/3 (0,334)	1/3 (0,200)	0 (0,000)	7,82 ± 3,59 ^a	12,20 ± 1,16 ^a	0,091 ± 0,009 ^a	43,054 ± 3,190 ^a	0,322 ± 0,025 ^a	0,598 ± 0,044 ^a	60,16 ± 4,68 ^a	31,150 ± 0,949 ^a

12	1/3 (1,334)	1/3 (0,334)	0 (0,000)	1/3 (0,006)	15,58 ± 10,79a	11,80 ± 0,07 ^a	0,087 ± 0,0003 ^a	42,387 ± 2,847 ^a	0,314 ± 0,021a	0,588 ± 0,039a	58,79 ± 4,04a	30,182 ± 0,338a
13	1/3 (1,334)	0 (0,000)	1/3 (0,200)	1/3 (0,006)	6,69 ± 5,07a	10,28 ± 1,20 ^a	0,075 ± 0,008 ^a	40,537 ± 3,428 ^a	0,296 ± 0,026a	0,563 ± 0,047a	55,40 ± 4,97a	28,134 ± 0,860a
14	0 (0,000)	1/3 (0,334)	1/3 (0,200)	1/3 (0,006)	16,59 ± 12,17a	7,42 ± 0,47 ^a	0,054 ± 0,002 ^a	42,992 ± 8,686 ^a	0,318 ± 0,077a	0,597 ± 0,120a	59,48 ± 14,39a	28,884 ± 6,059a
15	¼ (1,000)	¼ (0,250)	¼ (0,150)	¼ (0,005)	17,24 ± 19,02a	11,08 ± 1,23 ^a	0,082 ± 0,009 ^a	40,270 ± 0,752 ^a	0,298 ± 0,005a	0,559 ± 0,010a	55,65 ± 1,08a	29,690 ± 0,187a
*C	0 (0,000)	0 (0,000)	0 (0,000)	0 (0,000)	15,35 ± 5,20a	8,53 ± 0,63 ^a	0,065 ± 0,005 ^a	45,345 ± 2,121 ^a	0,347 ± 0,015a	0,629 ± 0,029a	64,86 ± 2,85a	34,286 ± 0,389a
**CA	0 (0,000)	0 (0,000)	0 (0,000)	0 (0,000)	24,28 ± 21,44a	8,52 ± 0,48 ^a	0,064 ± 0,003 ^a	43,273 ± 3,646 ^a	0,326 ± 0,030a	0,601 ± 0,050a	60,88 ± 5,69a	32,022 ± 1,396a

* C é o ensaio sem suplementação mineral (controle).

** CA é o ensaio suplementado com 0,3 g.L⁻¹ de cálcio.

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

O ensaio 1, suplementado apenas com nitrogênio, reduz em 60% a contaminação do pior cenário fermentativo. Conforme visto nos experimentos preliminares suplementados, o mineral favorece a produção de etanol e Devereux e Tanner (1927) mostraram que, para meios com 100 gramas de sacarose por litro, a adição de $1,88 \text{ g.L}^{-1}$ de NH_4Cl favorece a ação das leveduras. No entanto, a produção do etanol não atinge o obtido para o controle, sugerindo que a presença do cálcio impede a ação do nitrogênio no processo.

Os ensaios 2, 3 e 4, suplementados respectivamente com magnésio, enxofre e cobre, apresentam valores semelhantes ao dos ensaios com excesso de cálcio. Ciesarová, Šmogrovičová e Dömény (1996) destacam que durante a fermentação, o crescimento de leveduras é mais estimulado por magnésio do que por cálcio, enquanto a produção de etanol é mais eficiente quando cálcio e magnésio são adicionados em mistura. Dessa forma, os ensaios 2, 3 e 4 indicam que a proporção desses minerais não é a mais adequada para reduzir os efeitos prejudiciais do meio fermentativo.

As interações entre duas variáveis mostraram baixa produtividade e rendimento, e apresenta valores próximos ao do cenário desfavorável. Segundo Dong, Lin e Li (2015), a contaminação por bactérias ácido láctico inibe o crescimento de células *S. cerevisiae* por competir pelos micronutrientes do meio. Um efeito semelhante pode ter ocorrido especialmente nos ensaios 6, 7, e 10, de modo que as leveduras selvagens se sobressaíram e aumentaram o nível de contaminação.

As misturas com três componentes reduzem significativamente a contaminação, com destaque ao ensaio 11 suplementado com nitrogênio, magnésio e enxofre cuja contaminação é de 7,82%. Segundo Walker et al. (1996), os íons Ca^{2+} antagonizam as funções bioquímicas essenciais catalisadas pelos íons Mg^{2+} e a proporção de 9/10 pode minimizar este efeito. Nos ensaios 11, 12 e 14, a proporção de cálcio e magnésio é superior ao apontado por Walker et al. (1996), o que fundamenta os melhores resultados.

Na mistura com os quatro minerais (ensaio 15), observa-se que as proporções minerais não beneficiam o meio fermentativo, realçando mais uma vez a importância da proporção entre cálcio e magnésio no desempenho fermentativo conforme descrito em Rees e Stewart (1997).

Observa-se ainda que nenhum ensaio demonstra eficiência e produtividade superiores ao controle, corroborando com o concluído anteriormente sobre a prejudicialidade do excesso de cálcio no meio fermentativo.

Assim, as interações dos minerais nitrogênio, magnésio, enxofre e cobre no cenário fermentativo desfavorável foram analisadas segundo modelos matemáticos. O ajuste aos modelos linear, quadrático e cúbico especial para a produção de etanol e a contaminação foram avaliados ao nível de 5% de significância.

O residual quadrático médio (MSR), o coeficiente de determinação experimental (R^2) e o coeficiente de determinação ajustado (R_A^2) são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Residual quadrático médio (MSR), coeficientes de determinação experimental (R^2) e coeficientes de determinação ajustados (R_A^2) para os modelos linear, quadrático e cúbico no delineamento do tipo *simplex-centróide*, e avaliados para o grau de contaminação e a produção de etanol.

Variável dependente	Modelo	MSR	R^2	R_A^2
Nível de Contaminação	Linear	0,00003	0,9941	0,9924
	Quadrático	0,00003	0,9974	0,9927
	Cúbico Especial	0,00001	0,9989	0,9968
Produção de Etanol	Linear	3,0816	0,6218	0,5187
	Quadrático	4,3058	0,7598	0,3275
	Cúbico Especial	4,0848	0,7721	0,3620

Para a contaminação, os coeficientes de determinação dos três modelos matemáticos apresentam tendência a 1. Todos os experimentos, com exceção do ensaio 2, reduzem ainda que pouco a contaminação, o que pode influenciar nos valores observados para R^2 . Com o menor MSR, o modelo cúbico especial foi usado na avaliação dos dados.

Assim como no delineamento *simplex-látice* (item 5.4), os maiores coeficientes de determinação não se ajustam aos menores MSR. Por apresentar o coeficiente de determinação mais próximo a 1, e devido a pequena diferença entre os residuais quadráticos médio, o modelo cúbico especial também foi utilizado para a produção de etanol.

Além disso, experimentos de mistura do tipo *simplex-centróide* são mais eficientes no ajuste a modelos cúbicos por avaliar os efeitos de todas as possíveis interações entre os minerais (Paese, 1997; Cornell, 2011).

Dessa forma, a Tabela 15 apresenta os modelos matemáticos que descrevem o comportamento da contaminação e da produção de etanol em função da concentração de nitrogênio (x_1), magnésio (x_2), enxofre (x_3) e cobre (x_4).

Tabela 15 - Modelos matemáticos para o grau de contaminação e a produção de etanol em função da concentração mineral de nitrogênio (x_1), magnésio (x_2), enxofre (x_3) e cobre (x_4).

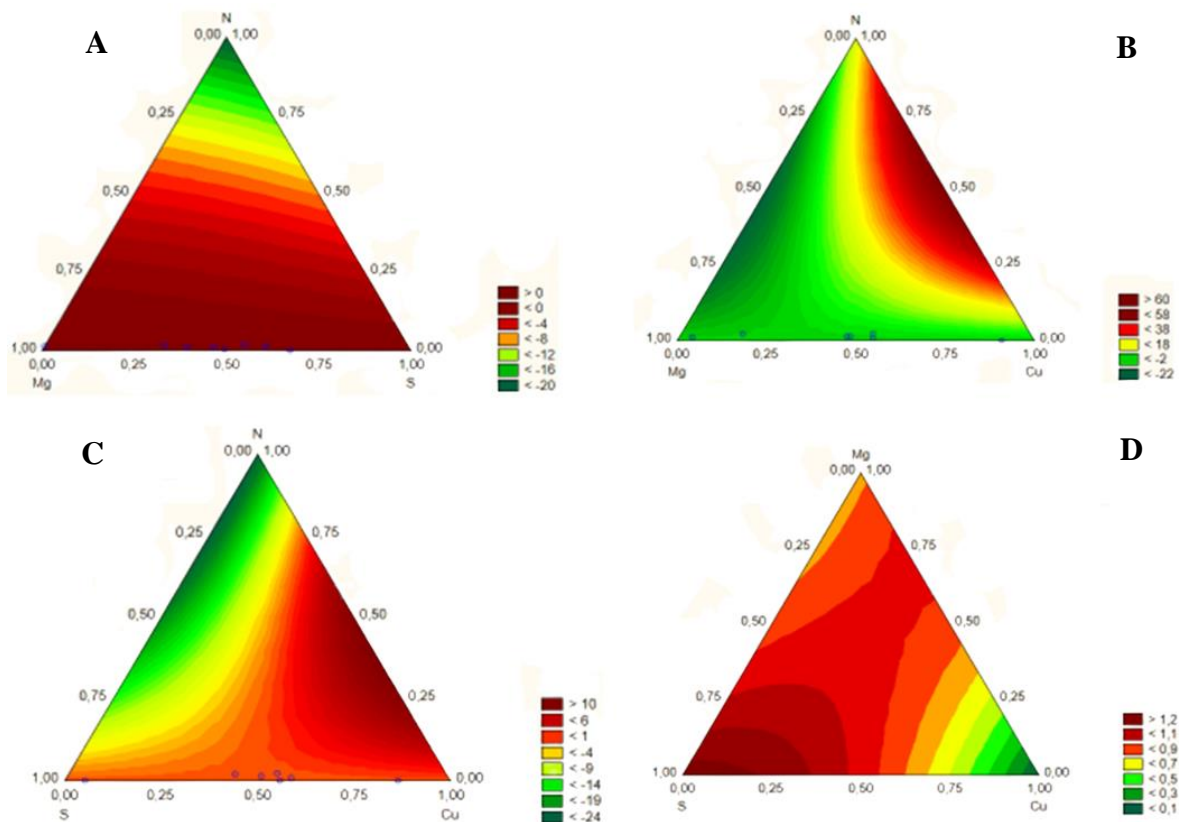
Variável resposta	Modelo matemático
Nível de Contaminação	$y = 0,2145x_2 + 0,2874x_3 + 0,2187x_4 + 25,1074x_1x_2x_4$
Produção de Etanol	$y = 43,45579x_1 + 18,1000x_3 + 45,3895x_1x_2 + 45,0329x_1x_3$

O modelo cúbico para a contaminação aponta que os quatro minerais interferem na variável resposta. Desse modo, nitrogênio, magnésio, enxofre e cobre são relevantes para reduzir o nível de contaminação no cenário fermentativo menos favorável.

Para a produção de etanol o modelo indica que nitrogênio, magnésio e enxofre afetam a produção de etanol. Nos experimentos preliminares suplementados com cobre (item 5.3), os resultados apontaram pouca atuação do mineral na produção de etanol e Naiki e Yamagata (1976) destaca seu discreto papel no meio fermentativo. Sendo assim, o cobre não demonstra atuar na produção de etanol em meio com cálcio em excesso.

A relação entre os minerais também pode ser avaliada pela metodologia de superfície de resposta nas Figuras 10 e 11.

Figura 10 - Curvas de nível para a contaminação nos ensaios do delineamento de mistura *simplex-centróide* para (A) nitrogênio, enxofre e magnésio, (B) nitrogênio, cobre e magnésio, (C) nitrogênio, cobre e enxofre e (D) magnésio, cobre e enxofre.



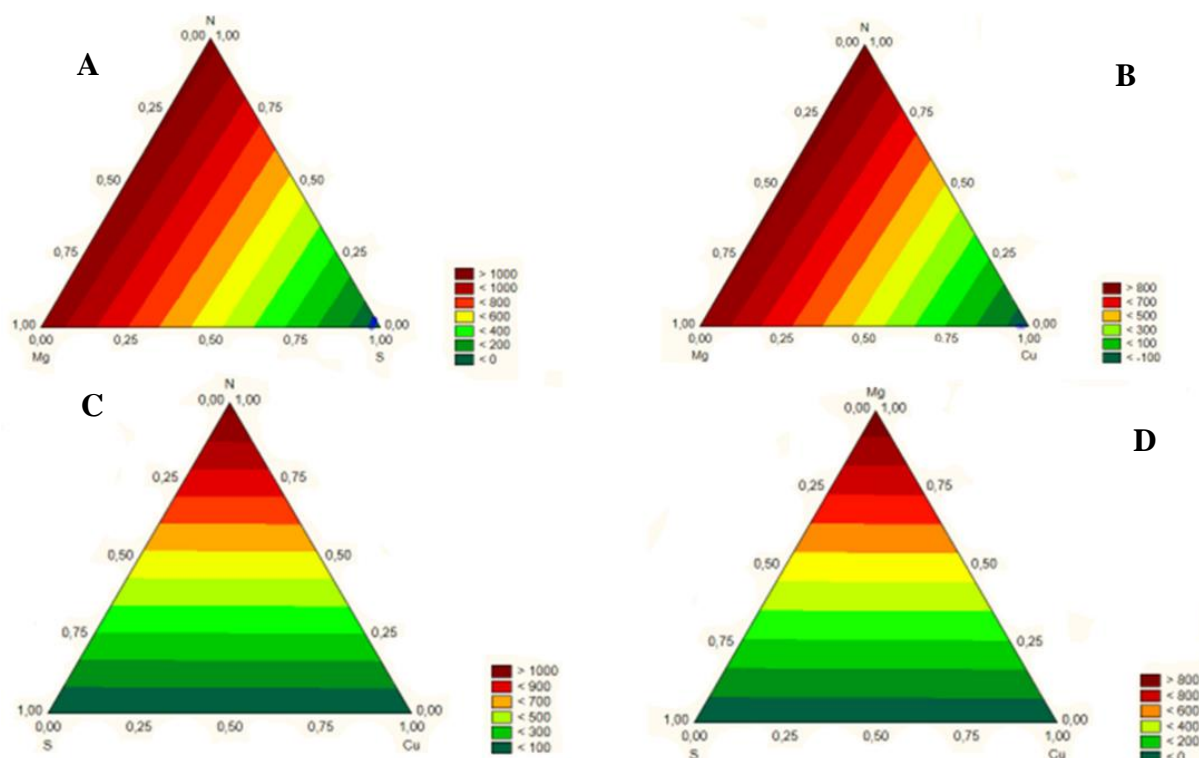
A mistura de nitrogênio, magnésio e cobre (Figura 10B) possui uma ampla região verde, sugerindo assim que a interação destes minerais pode reduzir a contaminação em cenário fermentativo desfavorável.

Nas Figuras 10A e 10C também é possível observar uma faixa esverdeada para o nitrogênio, o que enfatiza a redução da contaminação. Bishop (1971) destaca que a presença de compostos nitrogenados aumenta a resistência das leveduras às infecções, e um efeito semelhante pode ter ocorrido nestes ensaios.

A Figura 10D mostra uma pequena região verde para o cobre, indicando que esse mineral também pode reduzir a contaminação conforme apontado pelo modelo matemático (Tabela 15).

As curvas de nível para a produção de etanol em função do nitrogênio, magnésio, enxofre e cobre estão colocadas na Figura 11.

Figura 11 - Curvas de nível para a produção de etanol nos ensaios do delineamento de mistura *simplex-centróide* para (A) nitrogênio, enxofre e magnésio, (B) nitrogênio, cobre e magnésio, (C) nitrogênio, cobre e enxofre e (D) magnésio, cobre e enxofre.



Na Figura 11 observa-se que a maior produção de etanol está disposta nas regiões avermelhadas do nitrogênio e do magnésio. Os resultados sugerem que, independentemente da presença do cobre ou enxofre, os íons NH_4^- e Mg^{2+} tendem a regular o processo com cálcio em excesso ainda que a presença de íons Ca^{2+} aumente a sedimentação das leveduras. Estudos como de Pasternakiewicz e Tuszyński (1997) mostraram um efeito semelhante para os íons magnésio.

O nitrogênio reduz a contaminação, conforme visto na Figura 10, e incentiva a produção de etanol. O comportamento do mineral se assemelha aos estudos de Monteiro (2016) que sugere crescimento das leveduras selecionadas e maior conversão do açúcar a etanol com a adição de nitrogênio.

Walker (2004) buscou uma concentração de cálcio e potássio para maximizar a produção de etanol a partir de uma concentração fixa de magnésio no melaço. De modo semelhante Walker et al. (1996) avaliaram a proporção entre magnésio e cálcio que prejudica o crescimento das leveduras e a produtividade da fermentação. Dessa forma, uma proporção contrária pode ser observada nos ensaios, de modo que a proporção de magnésio e cálcio no meio fermentativo favoreceu a produção de etanol e o crescimento das leveduras industriais.

Assim, os resultados sugerem que nitrogênio, magnésio e enxofre podem solucionar o cenário fermentativo prejudicado pelo excesso de cálcio. Com 0,3 g.L⁻¹ de cálcio no mosto sintético, os ensaios mostram que 1,33 g.L⁻¹ de nitrogênio, 0,34 g.L⁻¹ de magnésio e 0,2 g.L⁻¹ de enxofre reduzem a contaminação em 67,8% e favorece a produção de etanol.

Os resultados também apontam que a combinação de 0,006 g.L⁻¹ de cobre, 1,0 g.L⁻¹ de nitrogênio, 0,25 g.L⁻¹ de magnésio e 0,15 g.L⁻¹ de enxofre, reduzem 29% da contaminação e pode auxiliar no controle das leveduras selvagens em meios fermentativos com cálcio em excesso.

5.6. Utilização dos minerais benéficos ao desempenho fermentativo em mosto natural com cálcio em excesso e presença de levedura contaminante

O pior cenário fermentativo, definido pelo excesso de cálcio, foi solucionado em mosto sintético pela adição de nitrogênio, magnésio e enxofre (item 5.5). Para atestar os resultados, a mesma solução foi aplicada em mosto natural com cálcio em excesso.

As concentrações dos minerais no mosto natural estão colocadas na Tabela 16 em comparação com as concentrações minerais do mosto sintético.

Tabela 16 - Comparação entre as concentrações minerais do mosto natural e do mosto sintético.

Mineral	N	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Fe
Concentração quantificada no mosto natural (g.L⁻¹)	2,282	0,0186	0,362	0,300	0,200	0,012	0,006	0,009
Concentração quantificada no mosto sintético (g.L⁻¹)	0,776	0,170	0,329	0,195	0,050	0,209	0,007	0,060

A concentração de nitrogênio no mosto natural é três vezes superior ao encontrado no mosto sintético. De Oliveira et al. (2007) destacam que o nitrogênio é o macronutriente mais requerido durante o ciclo de produção da cana-de-açúcar, fundamental para o desenvolvimento vegetativo, nutrição e fisiologia da cultura. Sendo assim, infere-se que o nitrogênio é absorvido em maiores quantidades pela cana-de-açúcar.

As maiores concentrações de potássio, cálcio e magnésio no mosto natural, em relação ao mosto sintético, pode decorrer da colheita e de diversos processos durante o manejo da cana. Alonso-Gómez e Bello Pérez (2018) relatam que a colheita mecanizada de cana-de-açúcar aumenta a presença de compostos inorgânicos como potássio e silício. De Oliveira et al. (2007) destacam ainda o uso de substâncias como silicatos de cálcio e magnésio na correção da acidez

do solo, o uso de vinhaças ricas em potássio e cálcio na fertilização, e a adubação potássica durante o plantio.

Além disso, o mosto natural possui $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ de cálcio, o que corresponde ao cenário menos favorável ao desempenho fermentativo e sugere excesso de cálcio, assim como descrito no item 5.4.

O cobre apresenta valores semelhantes entre o mosto natural, o mosto sintético e a concentração sugerida em Lima (2019), reforçando assim uma tendência de absorção do cobre pela cana. Segundo De Oliveira et al. (2014), a cana-de-açúcar possui uma limitação nutricional ao cobre e o absorve em baixas quantidades. Assim, a concentração do cobre encontrada no mosto sintético e natural ($0,007 \text{ g.L}^{-1}$) pode representar a quantidade máxima do mineral encontrada em mostos.

O enxofre é encontrado na forma de aminoácidos essenciais, proteínas polissacarídeos e compostos não saturados, o fósforo apresenta reatividade na absorção pela cana-de-açúcar e o pH do solo influencia na absorção do ferro (De Oliveira et al., 2007; Campbell, 2007; Stipp e Casarin, 2010; Blum, Melfi e Montes, 2012). Tais mecanismos podem ter influenciado a concentração de fósforo, enxofre e ferro cujas concentrações são menores no mosto natural em comparação ao mosto sintético.

Desse modo, os ensaios em mosto natural foram suplementados conforme destacado na Tabela 17.

Tabela 17 - Concentração mineral dos ensaios realizados em mosto natural (g.L^{-1}).

Concentração dos meios de fermentação (g.L^{-1})				
Minerais	MN1	MN2	MN3	MN4
N	5,128	5,349	2,282	2,282
P	0,018	0,018	0,018	0,018
K	0,362	0,362	0,362	0,362
Ca	0,300	0,300	0,300	0,300
Mg	0,289	0,324	0,200	0,200
S	0,249	0,354	0,012	0,012
Cu	0,008	0,006	0,006	0,006
Fe	0,009	0,009	0,009	0,009

Santos (2021) isolou a levedura selvagem LFS de amostras de caldo coletadas na mesma usina que cedeu o mosto natural utilizado neste trabalho. Para averiguar a presença de

contaminantes no mosto, o ensaio MN4 foi realizado apenas com as leveduras industriais, inoculando 0,075 g.L⁻¹ de cada uma das cepas.

Os ensaios MN1, MN2 e MN3 mantiveram a inoculação inicial de 30% da levedura selvagem LFS e 70% das leveduras industriais BG-1, CAT-1, PE-2 e FT-858L.

O ensaio MN1 foi suplementado com nitrogênio, magnésio, enxofre e cobre para avaliar, principalmente, a contaminação do meio fermentativo. O ensaio MN2 reproduz a solução empregada no meio desfavorável ao desempenho fermentativo, suplementando nitrogênio, magnésio e enxofre assim como apontado no item 5.5. Para comparação, o ensaio MN3 não recebeu suplementação mineral e assemelhou-se a fermentação realizada na indústria.

O resultado dos experimentos em mosto natural está colocado na Tabela 18.

Tabela 18 - Contaminação, concentração celular, fator de conversão de substrato a células ($Y_{X/S}$), concentração final de etanol, fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$), produtividade (\emptyset), eficiência fermentativas (η) e consumo de açúcares, para os ensaios com mosto natural.

Ensaio	Contaminação	Concentração Celular		Etanol			η (%)	Sacarose
	Final (%)	Final (g.L ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (g.g ⁻¹)	Final (g.L ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (g.g ⁻¹)	\emptyset (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Final (g.L ⁻¹)	
MN1	40,01 ± 33,50b	14,91 ± 0,58 ^a	0,091 ± 0,004a	53,02 ± 4,114a	0,324 ± 0,025a	0,736 ± 0,057 ^a	60,51 ± 4,70a	3,648 ± 0,683 ^a
MN2	14,67 ± 10,40b	15,03 ± 0,64 ^a	0,092 ± 0,004b	57,62 ± 4,609a	0,354 ± 0,029a	0,800 ± 0,064 ^a	66,08 ± 5,40 ^a	4,429 ± 0,354 ^a
MN3	28,63 ± 19,30ab	9,31 ± 0,46b	0,059 ± 0,003b	54,01 ± 2,500a	0,347 ± 0,015a	0,750 ± 0,035 ^a	64,79 ± 2,90a	11,62 ± 0,398b
MN4	0,00 ± 0,00a	12,06 ± 0,31b	0,077 ± 0,002a	55,18 ± 2,974a	0,353 ± 0,019a	0,766 ± 0,041 ^a	65,96 ± 3,50a	11,06 ± 0,433b

Diferentemente do apontado no delineamento *simplex-centróide* (item 5.5), a suplementação com nitrogênio, magnésio, enxofre e cobre não reduz a contaminação. A suplementação do cobre pode causar toxicidade às leveduras industriais, mas sem afetar outros microrganismos do meio (Ramos-Alonso et al., 2018). Um comportamento semelhante pode ter ocorrido no ensaio MN1, de modo que as concentrações minerais suplementadas favorecessem as leveduras selvagens LFS.

O ensaio MN2, suplementado com nitrogênio, magnésio e enxofre, atesta a solução proposta para o cenário fermentativo desfavorável à produção de etanol. Os resultados demonstram melhora no desempenho fermentativo, reduzindo a contaminação em 48,7% e aumentando a produção de etanol em 4,4%.

No ensaio sem suplementação (MN3), a contaminação mantém-se próxima aos 30%. Estudos como de Ciane, Maccarelli e Fatichenti (2003) mostram que as leveduras do gênero *Brettanomyces* / *Dekkera* consomem o açúcar do meio e formam subprodutos como ácido

acético e glicerol. Um efeito semelhante pode ter ocorrido para as leveduras selvagens LFS no meio fermentativo.

O ensaio MN4, apenas com leveduras industriais e sem suplementação, não apresenta contaminações pela levedura LFS. No entanto, a produção de etanol é inferior quando comparada ao ensaio MN2 (com levedura contaminante e suplementado com nitrogênio, magnésio e enxofre). Desse modo, constata-se que além de reduzir a contaminação, a suplementação mineral também pode auxiliar na melhora do desempenho fermentativo como observado no ensaio MN2.

Os resultados mostram que a suplementação de nitrogênio, magnésio e enxofre é uma solução eficaz para reduzir a contaminação por leveduras selvagens LFS e favorecer a produção de etanol em mostos com cálcio em excesso.

O mosto natural com excesso de cálcio demonstra um possível problema em escala industrial que afeta o processo e a produção de etanol. Assim, para cada $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ de cálcio no meio fermentativo, é necessário suplementar nitrogênio (NH_4Cl) em $5,349 \text{ g.L}^{-1}$, magnésio (MgSO_4) em $0,324 \text{ g.L}^{-1}$ e enxofre (MgSO_4) em $0,354 \text{ g.L}^{-1}$ para minimizar os efeitos prejudiciais causados pela interação dos íons Ca^{2+} em excesso com as leveduras contaminantes.

6. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados evidenciam a importância de analisar as especificidades do processo para definir concentrações minerais favoráveis à produção de etanol.

A suplementação de cálcio, fósforo e ferro foram prejudiciais ao desempenho fermentativo com destaque ao cálcio em excesso ($0,3 \text{ g.L}^{-1}$) que apresentou o cenário menos favorável à fermentação com 38% de contaminação e diminuição de até 47% na produção de etanol.

Como solução ao excesso de cálcio, a suplementação de nitrogênio, magnésio e enxofre em mosto sintético foi capaz de reduzir os efeitos prejudiciais e melhorar o desempenho fermentativo.

A avaliação dos resultados em mosto natural com cálcio em excesso mostrou que a suplementação de nitrogênio, magnésio e enxofre em $5,349 \text{ g.L}^{-1}$, $0,324 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,354 \text{ g.L}^{-1}$ respectivamente, promoveu um aumento de 61% na concentração celular, de 6% na produtividade e de 2% na eficiência fermentativa.

Além de favorecer a produção de etanol e melhorar o desempenho fermentativo, a suplementação com nitrogênio, magnésio e enxofre também reduziu a contaminação para 14,7% e mostrou que tais minerais podem minimizar a ação da levedura contaminante LFS.

A resposta encontrada no presente estudo mostra-se relevante para solucionar um problema real enfrentado por processos industriais com excesso de cálcio no mosto e leveduras contaminantes no meio fermentativo.

Dada a importância do etanol ao mercado brasileiro, e em vista das perspectivas futuras, a suplementação mineral é uma medida simples, econômica, eficaz, viável e de fácil aplicação para contornar as contaminações indesejadas e aumentar a produção de etanol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, D. A.; INGLEDEW, W. M. **The importance of aeration strategy in fuel alcohol fermentations contaminated with *Dekkera/Brettanomyces* yeasts.** Applied microbiology and biotechnology, v. 69, n. 1, p. 16-21, 2005.

ABREU-CAVALHEIRO, A.; MONTEIRO, G. **Solving ethanol production problems with genetically modified yeast strains.** Brazilian Journal of Microbiology, v. 44, p. 665-671, 2013.

ALMEIDA, C. de S.; DO NASCIMENTO, D. D. **Revisão: leveduras utilizadas na produção de etanol de segunda geração.** Bioenergia em Revista: Diálogos (ISSN: 2236-9171), v. 11, n. 1, p. 99-119, 2021.

ALONSO-GÓMEZ, L. A.; BELLO-PÉREZ, L. A. **Materias primas usadas para la producción de etanol de cuatro generaciones: retos y oportunidades.** Agrociencia, v. 52, n. 7, p. 967-990, 2018.

ALVES, D. M. G. **Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica.** 1994. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ALVES, T. C. F.; DEL BIANCO, V. **Tecnologia dos processos bioquímicos.** 1971.

AMARAL, F. S. et al. **Influência conjunta do pH, temperatura e concentração de sulfito na fermentação alcoólica de mostos de sacarose.** 2009.

AMORIM, H. V. de; BASSO, L. C.; LOPES, M. L. **Sugar cane juice and molasses, beet molasses and sweet sorghum: composition and usage.** The alcohol textbook, 2009.

AMORIM, H. V.; LOPES, M. L. **Ciência e tecnologia na seleção de leveduras para produção de etanol.** Microrganismos em Agroenergia: da Prospecção aos Bioprocessos. Brasília: Embrapa Agroenergia, p. 42-59, 2013.

ANDRIETTA, M. G. S. et al. **Bioethanol-Brazil, 30 years of Proálcool.** International Sugar Journal, v. 109, n. 1299, p. 195-200, 2007.

ARAÚJO, L. M. et al. **A busca da efetividade do Acordo de Paris.** Revista Direito, Estado e Sociedade, n. 54, 2020.

AZENHA, M.; VASCONCELOS, M. T.; MORADAS, P. F. **The influence of Cu concentration on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*.** Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 90, n. 2, p. 163-167, 2000.

BADER, J. et al. **Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology.** Journal of applied microbiology, v. 109, n. 2, p. 371-387, 2010.

- BADOTTI, F. et al. **Switching the mode of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae***. *Microbial Cell Factories*, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2008.
- BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. **Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks**. *Biotechnology advances*, v. 26, n. 1, p. 89-105, 2008.
- BARBOUR, E. A.; PRIEST, F. G. **Some effects of *Lactobacillus* contamination in scotch whisky fermentations**. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 94, n. 2, p. 89-92, 1988.
- BASÍLIO, A. C. M., et al. **Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process**. *Current Microbiology* 56.4, 322-326, 2008.
- BASSO, L. C. et al. **Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation**. *Biofuel production-recent developments and prospects*, v. 1530, p. 85-100, 2011.
- BASSO, L. C. et al. **Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil**. *FEMS yeast research*, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008.
- BECKNER, M.; IVEY, M. L.; PHISTER, T. G. **Microbial contamination of fuel ethanol fermentations**. *Letters in applied microbiology*, v. 53, n. 4, p. 387-394, 2011.
- BERNARDES, J. V. S. et al. **Potassium rates for sweet sorghum cultivated for ethanol production**. *Nativa: Pesquisas Agrárias e Ambientais*, v. 7, n. 1, p. 23-28, 2019.
- BERTOLETTI, A. C. D. **Ação biocida do Poliquilgerm® derivado com óleo de *Ricinus Communis L.* (mamona) sobre bactérias contaminantes da fermentação etanólica**, 2008.
- BISHOP, L. R. **Horace Brown Memorial Lecture a conspectus of brewing progress**. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 77, n. 1, p. 12-24, 1971.
- BLUM, J.; MELFI, A. J.; MONTES, C. R. **Nutrição mineral da cana-de-açúcar irrigada com efluente de esgoto tratado, em área com aplicação de fosfogesso**. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 47, p. 593-602, 2012.
- BORZANI, W. et al. **Biotecnologia industrial - Volume 1: Fundamentos**. Editora Blucher, 2001.
- BREXÓ, R. P.; SANT'ANA, A. S. **Impact and significance of microbial contamination during fermentation for bioethanol production**. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 73, p. 423-434, 2017.
- CABRINI, K. T.; GALLO, C. R. **Identificação de leveduras no processo de fermentação alcoólica em usina do estado de São Paulo, Brasil**. *Scientia Agricola*, v. 56, p. 207-216, 1999.

CAMPBELL, I. B. **Balço de nitrogênio e enxofre no sistema solo-cana-de-açúcar no ciclo de cana-planta**. 113 f. Tese (Doutorado em Agronomia), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2007.

CAMPOS, L. F. A.; AMORIM, L. V.; FERREIRA, H. C. **Aplicação do planejamento experimental no estudo da influência da composição de misturas ternárias de bentonitas sobre o comportamento reológico de dispersões**, 2005.

CARDOSO, L. F. et al. **Produção comparativa de etanol da cana-de-açúcar, batata inglesa e beterraba por fermentação**. Revista Saúde & Diversidade, v. 4, n. 1, p. 45-49, 2020.

CARNEIRO, J. E. D. S. **Evolução adaptativa da *Saccharomyces cerevisiae* e estudo do seu comportamento em co-cultura na produção de bebida fermentada de jabuticaba**. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos.), Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, 2018.

CASPETA, L. et al. **Engineering high-gravity fermentations for ethanol production at elevated temperature with *Saccharomyces cerevisiae***. Biotechnology and bioengineering, v. 116, n. 10, p. 2587-2597, 2019.

CHEN, Y. **Development and application of co-culture for ethanol production by co-fermentation of glucose and xylose: a systematic review**. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 38, n. 5, p. 581-597, 2011.

CHOTINEERANAT, S. et al. **Effect of calcium ions on ethanol production from molasses by *Saccharomyces cerevisiae***. Sugar Tech, v. 12, n. 2, p. 120-124, 2010.

CIESAROVA, Z.; ŠMOGROVIČOVÁ, D.; DÖMÉNY, Z. **Enhancement of yeast ethanol tolerance by calcium and magnesium**. Folia microbiologica, v. 41, n. 6, p. 485-488, 1996.

COMPARINI, A. et al. **Metodologia de superfície de resposta: uma introdução nos softwares R e STATISTICA**. 2012.

COMPEÁN, R. G.; POLENSKE, K. R. **Antagonistic bioenergies: Technological divergence of the ethanol industry in Brazil**. Energy Policy, v. 39, n. 11, p. 6951-6961, 2011.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Brasil alcança a maior produção de etanol da história**. Disponível em: <<https://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2020/04/23/brasil-tem-maior-producao-de-etanol-da-historia-diz-conab.ghtml>> Acesso em 6 mai 2021.

COOPER, G. et al. **Ethanol Industry Outlook**. Renewable Fuels Association, v. 2021, p. 1-40, 2021. Disponível em: <<https://ethanolrfa.org/library/rfa-publications>> Acesso em 15 jul 2022.

CORNELL, J. A. **Experiments with mixtures: designs, models, and the analysis of mixture data**. John Wiley & Sons, 2011.

COSTA, O. Y. A. et al. **Microbial diversity in sugarcane ethanol production in a Brazilian distillery using a culture-independent method.** Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 42, n. 1, p. 73-84, 2015.

CRUZ, M. L. **Avaliação das Condições de Processo na Resistência da Levedura ao Teor Final de Etanol na Fermentação Alcoólica,** 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, 2015.

DARÉ, R. M. **Avaliação de coeficientes de rendimento e modelagem do processo fermentativo de produção de etanol.** 2008.

DE OLIVEIRA, M. W. et al. **Nutrição mineral e adubação da cana-de-açúcar.** Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 28, n. 239, p. 30-43, 2007.

DE OLIVEIRA, M. W. et al. **Produção e qualidade de três variedades de cana-de-açúcar cultivadas no nordeste de Minas Gerais.** Revista Ciência Agrícola, v. 12, n. 1, p. 17-20, 2014.

DE OLIVEIRA, S. M. et al. **Uncertainty effects on production mix and on hedging decisions: The case of Brazilian ethanol and sugar.** Energy Economics, v. 70, p. 516-524, 2018.

DE QUEIROZ, J. C. F. et al. **Produção de hidromel de forma artesanal e avaliação dos parâmetros durante o processo fermentativo.** Revista Saúde & Ciência Online, v. 3, n. 3, p. 321-328, 2014.

DE SOUZA, R. B. et al. **Mineral composition of the sugarcane juice and its influence on the ethanol fermentation.** Applied biochemistry and biotechnology, v. 175, n. 1, p. 209-222, 2015.

DEVEREUX, E. D.; TANNER, F. W. **Observations on the growth of yeasts in pure nutrient solutions.** Journal of Bacteriology, v. 14, n. 5, p. 317-333, 1927.

DONG, S.-J.; LIN, X.-H.; LI, H. **Regulation of Lactobacillus plantarum contamination on the carbohydrate and energy related metabolisms of *Saccharomyces cerevisiae* during bioethanol fermentation.** The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v. 68, p. 33-41, 2015.

EBADIAN, M. et al. **Biofuels policies that have encouraged their production and use: An international perspective.** Energy Policy, v. 147, p. 111906, 2020.

FARAONI, A. S. et al. **Desenvolvimento de um suco misto de manga, goiaba e acerola utilizando delineamento de misturas.** Ciência Rural, v. 42, p. 911-917, 2012.

FAZZI, L. R. et al. **A Regulação de Biocombustíveis no Brasil e nos EUA no Contexto da Mitigação das Mudanças Climáticas e do Correlato Acordo de Paris.** Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental, v. 9, p. 104-119, 2020.

FERNANDES, G. et al. **Evaluation of potential ethanol production and nutrients for four varieties of sweet sorghum during maturation.** *Renewable Energy*, v. 71, p. 518-524, 2014.

FERREIRA, D. S. **Efeito da suplementação mineral com magnésio e cobre no comportamento fisiológico de *Saccharomyces cerevisiae***, 49 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

FURTADO, A. T.; SCANDIFFIO, M. I. G.; CORTEZ, L. A. B. **The Brazilian sugarcane innovation system.** *Energy Policy*, v. 39, n. 1, p. 156-166, 2011.

GILIO, L.; CASTRO, N. R. **Avaliação de aspectos limitantes ao crescimento do etanol e o setor sucroenergético no Brasil.** *Revista Eletrônica de Energia*, v. 6, n. 1, 2017.

GILIO, L.; DE MORAES, M. A. F. D. **Sugarcane industry's socioeconomic impact in São Paulo, Brazil: A spatial dynamic panel approach.** *Energy Economics*, v. 58, p. 27-37, 2016.

GIMENEZ, A. R. et al. **O aumento da produtividade e a busca pela excelência na produção do etanol brasileiro: uma história de sucesso.** *Research, Society and Development*, v. 7, n. 2, p. e1472195-e1472195, 2018.

GÓES-FAVONI, S. P. de et al. **Fermentação alcoólica na produção de etanol e os fatores determinantes do rendimento.** *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*, v. 9, n. 4, p. 285-296, 2018.

GRANCO, G. et al. **Exploring the policy and social factors fueling the expansion and shift of sugarcane production in the Brazilian Cerrado.** *GeoJournal*, v. 82, n. 1, p. 63-80, 2017.

GUO, M.; SONG, W.; BUHAIN, J. **Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective.** *Renewable and sustainable energy reviews*, v. 42, p. 712-725, 2015.

GUO, X.; ZHOU, J.; XIAO, D. **Improved ethanol production by mixed immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* from cheese whey powder solution fermentation.** *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 160, n. 2, p. 532-538, 2010.

GUTIERREZ, L. E. **Efeito da adição de sulfito sobre a produção de álcoois superiores durante a fermentação alcoólica.** *Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz*, v. 45, p. 359-368, 1988.

GUTIERREZ, L. E. **Produção de glicerol por linhagens de *Saccharomyces* durante fermentação alcoólica.** *Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz*, v. 48, p. 55-69, 1991.

HANDAJANI, M.; GUMILAR, A.; SYAFILA, M. **Effect of iron and magnesium addition for ethanol production from the conversion of palm oil mill effluent by anaerobic**

processes. In: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. IOP Publishing, 2018. p. 012111.

HISS, H. **Cinética de Fermentações.** Clube de Autores, 2013.

ILHA, E. C. et al. **Rendimento e eficiência da fermentação alcoólica na produção de hidromel.** Embrapa Pantanal-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E), 2008.

JACKMAN, E. A. **Alcohol industrial.** Biotecnologia Básica, 1991.

JOHNSTON, D. B.; MCALOON, A. J. **Protease increases fermentation rate and ethanol yield in dry-grind ethanol production.** Bioresource technology, v. 154, p. 18-25, 2014.

KARAGÖZ, P.; ÖZKAN, M. **Ethanol production from wheat straw by *Saccharomyces cerevisiae* and *Scheffersomyces stipitis* co-culture in batch and continuous system.** Bioresource technology, v. 158, p. 286-293, 2014.

KIM, J. K. et al. **Statistical optimization of enzymatic saccharification and ethanol fermentation using food waste.** Process Biochemistry, v. 43, n. 11, p. 1308-1312, 2008.

KOHLHEPP, G. **Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil.** Estudos avançados, v. 24, p. 223-253, 2010.

LEAL, M. R. L. V. **Evolução tecnológica do processamento da cana-de-açúcar para etanol e energia elétrica.** Bioetanol de Cana-de-açúcar – P&D para a Produtividade e Sustentabilidade, p. 561-575, 2010.

LI, R. et al. **The Magnesium concentration in yeast extracts is a major determinant affecting ethanol fermentation performance of *Zymomonas mobilis*.** Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, v. 8, p. 957, 2020.

LIMA, U. de A. **Biotecnologia Industrial - Vol. 3: Processos fermentados e enzimáticos.** Editora Blucher, 2019.

LNF - LATINO AMERICANA. **Leveduras Seleccionadas: PE-2, CAT-1, BG-1, FT858L e Fermel.** Disponível em: <https://lnf.com.br/downloads/leveduras_seleccionadas.pdf>. Acesso em 16 jul 2022.

LOPES, C. H.; GABRIEL, A. V. M. D.; BORGES, M. T. M. R.. **Produção de etanol a partir da cana-de-açúcar: tecnologia de produção de etanol.** 2017.

LOPES, J. J. C. **Balanco de nutrientes minerais no processo Melle-Boinot de fermentação alcoólica.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 1989.

LOPES, M. L. et al. **Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry.** Brazilian Journal of Microbiology, v. 47, p. 64-76, 2016a.

LOPES, T. J. et al. **Parametric statistical analysis of operational factors in the fermentation process to obtain cachaça.** REBRAPA - Brazilian Journal of Food Research, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2016b.

MACHADO, C. M. M.; ABREU, F. R. **Produção de álcool combustível a partir de carboidratos.** Área de Informação da Sede-Artigo em periódico indexado (ALICE), 2006.

MACHADO, F. B. **A história da cana-de-açúcar: da antiguidade aos dias atuais.** UDOP - União Nacional da Bioenergia. Disponível em: <<https://www.udop.com.br/noticia/2003/01/01/a-historia-da-cana-de-acucar-da-antiguidade-aos-dias-atuais.html>>. Acesso em: 2 jul 2022, v. 4, 2018.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock-14ª Edição.** Artmed Editora, 2016.

MAKANJUOLA, D. B.; TYMON, A.; SPRINGHAM, D. G. **Some effects of lactic acid bacteria on laboratory-scale yeast fermentations.** Enzyme and microbial technology, v. 14, n. 5, p. 350-357, 1992.

MANOCHIO, C. et al. **Ethanol from biomass: A comparative overview.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 80, p. 743-755, 2017.

MARTINS, E. G. M. **Coefficiente de determinação.** Revista Ciência Elementar, v. 6, n. 1, p. 24, 2018.

MILANEZ, A. Y et al. **O déficit de produção de etanol no Brasil entre 2012 e 2015: determinantes, consequências e sugestões de política.** BNDES Setorial, n. 35, mar. 2012, p. 277-302, 2012.

MONTEIRO, B. M. dos S. **Produção de etanol combustível: efeitos da suplementação nitrogenada na fermentação de mosto de caldo de cana com alta concentração de açúcar.** 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MORAES, M. L. de; BACCHI, M. R. P. **Etanol: do início às fases atuais de produção.** Revista de Política Agrícola, v. 23, n. 4, p. 5-22, 2015.

MOREIRA, C. S. et al. **Análise dos parâmetros morfofisiológicos de linhagens de leveduras industriais com potencial biotecnológico para a produção de etanol.** Ciência e Natura, v. 37, n. 3, p. 55-63, 2015.

MOURA, F. R. **Modelagem, análise estatística e simulação computacional da cinética de produção de biobutanol através de fermentação ABE.** 117 f. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos - Mestrado em Ciências), Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2018.

MUTHAIYAN, A.; LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. **Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations.** *Progress in Energy and Combustion Science*, 37(3), 351-370, 2011.

NAIKI, Nobuo; YAMAGATA, Shuzo. **Isolation and some properties of copper-binding proteins found in a copper-resistant strain of yeast.** *Plant and Cell Physiology*, v. 17, n. 6, p. 1281-1295, 1976.

NEITZEL, T. et al. **Impact of the Melle-Boinot process on the enhancement of second-generation ethanol production by *Spathaspora passalidarum*.** *Renewable Energy*, v. 160, p. 1206-1216, 2020.

NETO, B. B. et al. **Como Fazer Experimentos-: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria.** Bookman Editora, 2010.

NETO, L. G. N. et al. **Efeito da suplementação nitrogenada durante a fermentação alcoólica de vinhos da cv.** Touriga Nacional do Submédio do Vale do São Francisco, 2015.

NOVAES, F. V. et al. **Tecnologia das aguardentes.** 1971.

OECD, F.; NATIONS, A. O. ot U. **Biofuels.** 2021. Disponível em: <<https://www.fao.org/publications/oecd-fao-agricultural-outlook/2021-2030/en/>>. Acesso em 15 jul 2022.

OLIVA-NETO, P. de et al. **The Brazilian technology of fuel ethanol fermentation—yeast inhibition factors and new perspectives to improve the technology.** *Materials and Processes for Energy: Communicating Current Research and Technological Developments*, v. 1, p. 371-379, 2013.

OLIVEIRA, B. M. **Study of glycerol and respiro-fermentative metabolism diversity among *Saccharomyces* yeasts.** 2016.

PAESE, C. **Experimentos com misturas: do planejamento à análise.** 1997.

PARAPOULI, M. et al. ***Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications.** *AIMS microbiology*, v. 6, n. 1, p. 1, 2020.

PASTERNAKIEWICZ, A.; TUSZYNSKI, T. **Effect of calcium, magnesium, cobalt [II], and zinc cations on the *Saccharomyces cerevisiae* growth.** *Polish journal of food and nutrition sciences*, v. 6, n. 4, p. 61-70, 1997.

PATTANAKITTIVORAKUL, S. et al. **Selection of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* for high temperature ethanol production from molasses and increasing ethanol production by strain improvement.** *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 112, n. 7, p. 975-990, 2019.

PAULILLO, L. F. et al. **Álcool combustível e biodiesel no Brasil: quo vadis?.** *Revista de Economia e Sociologia Rural*, v. 45, p. 531-565, 2007.

PAZ, J. E. de M.; GARNICA, A. I. C.; CURBELO, F. D. da S. **Redimensionamento do sistema de resfriamento da fermentação para elevação da capacidade de produção de etanol.** HOLOS, v. 4, p. 1-19, 2019.

PENA, M. M. O.; KOCH, K. A.; THIELE, D. J. **Dynamic regulation of copper uptake and detoxification genes in *Saccharomyces cerevisiae*.** Molecular and cellular biology, v. 18, n. 5, p. 2514-2523, 1998.

PEREIRA, C. N.; SILVEIRA, J. M. F. J. **Análise exploratória da eficiência produtiva das usinas de cana-de-açúcar na região centro-sul do Brasil.** Revista de Economia e Sociologia Rural, v. 54, p. 147-166, 2016.

PHILPOTT, C. C.; PROTCHENKO, O. **Response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*.** Eukaryotic cell, v. 7, n. 1, p. 20-27, 2008.

RAMOS-ALONSO, L. et al. **Molecular strategies to increase yeast iron accumulation and resistance.** Metallomics, v. 10, n. 9, p. 1245-1256, 2018.

REES, E. M. R; STEWART, G. G. **The effects of increased magnesium and calcium concentrations on yeast fermentation performance in high gravity worts.** Journal of the Institute of Brewing, v. 103, n. 5, p. 287-291, 1997.

REIS, C.; ANDRADE, J. C. **Planejamento experimental para misturas usando cromatografia em papel.** Química Nova, v. 19, p. 313, 1996.

REIS, V. R. **Caracterização de linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de processos fermentativos para produção de etanol.** 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2011.

REIS, V. R. et al. **Effects of feedstock and co-culture of *Lactobacillus fermentum* and wild *Saccharomyces cerevisiae* strain during fuel ethanol fermentation by the industrial yeast strain PE-2.** AMB Express, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2018.

Revista Nova Cana. **Produção de Etanol precisa crescer 82% até 2026.** Disponível em: <<https://www.novacana.com/n/etanol/mercado/producao-etanol-precisa-crescer-82-2026-atingir-meta-renovabio-fg-a-300421>>. Acesso em 6 mai 2021.

RFA - RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. **Markets & Statistics: Annual Ethanol Production U.S. and World Ethanol Production. 2021.** Disponível em: <<https://ethanolrfa.org/markets-and-statistics/annual-ethanol-production>>. Acesso em 8 nov 2021.

RIBEIRO, C. A. F.; HORII, J. **Potencialidades de linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação do caldo de cana.** Scientia Agrícola, v. 56, p. 255-263, 1999.

- RIVERA, E. C. et al. **Effect of temperature on sugarcane ethanol fermentation: Kinetic modeling and validation under very-high-gravity fermentation conditions.** Biochemical engineering journal, v. 119, p. 42-51, 2017.
- RODRIGUES, K. C. S. et al. **Modeling and simulation of continuous extractive fermentation with CO₂ stripping for bioethanol production.** Chemical Engineering Research and Design, v. 132, p. 77-88, 2018.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos.** 2005.
- ROSA, C. **Biodiversity and ecophysiology of yeasts.** Berlin: Springer, 2006.
- ROSSETTO, R. et al. **Calagem para a cana-de-açúcar e sua interação com a adubação potássica.** Bragantia, v. 63, p. 105-119, 2004.
- ROTHSTEIN, A.; DEMIS, C.; **The relationship of the cell surface to metabolism. The stimulation of fermentation by extracellular potassium.** Archives of biochemistry and biophysics, v. 44, n. 1, p. 18-29, 1953.
- RUSSELL, I.; **Understanding yeast fundamentals.** The alcohol textbook, v. 4, p. 531-537, 2003.
- SANCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A. **Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks.** Bioresource technology, v. 99, n. 13, p. 5270-5295, 2008.
- SANTOS, A. M. D. et al. **Estudo da Influência da Complementação de Nutrientes no Mosto sobre o Processo de Fermentação Alcoólica em Batelada,** 95 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Unidade Acadêmica Centro de Tecnologia, Universidade Federal de Alagoas, 2008.
- SANTOS, C. O. dos. **Diagnóstico e Avaliação da Influência de Contaminantes Selvagens durante Etapas do Processo Produtivo do Etanol,** 86 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, 2021.
- SANTOS, C. O. dos. et al. **Industrial yeast strains competence in mixed culture with wild flocculent yeast.** Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 36, p. 102144, 2021.
- SANTOS, M. V. **Estudo da competência de *Saccharomyces cerevisiae* em co-cultura para a produção de etanol.** 131 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, 2017.
- SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia Industrial - Volume 2: Engenharia Bioquímica.** Editora Blucher, 2001.

SCHUTZ, F.; MASSUQUETTI, A.; ALVES, T. W. **Demanda e oferta energética: uma perspectiva mundial e nacional para o etanol.** Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental, v. 16, n. 16, p. 3167-3186, 2013

SERRANO, R. et al. **Copper and iron are the limiting factors for growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in an alkaline environment.** Journal of Biological Chemistry, v. 279, n. 19, p. 19698-19704, 2004.

SHARMA, N. et al. **Optimization of fermentation parameters for production of ethanol from kinnow waste and banana peels by simultaneous saccharification and fermentation.** Indian Journal of Microbiology, v. 47, n. 4, p. 310-316, 2007.

SHEN, F.; LIU, R.; WANG, T. **Effects of temperature, pH, agitation and particles stuffing rate on fermentation of sorghum stalk juice to ethanol.** Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects, v. 31, n. 8, p. 646-656, 2009.

SHI, H. et al. **Copper metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: An update.** Biometals, v. 34, n. 1, p. 3-14, 2021.

SHIKIDA, P. F. A.; DE MORAES, M. A. F. D.; ALVES, L. R. A. **Agroindústria canavieira do Brasil: Intervencionismo, Desregulamentação e Neocorporativismo.** Revista de economia e agronegócio, v. 2, n. 3, 2004.

SILVA, F. C. **Manual de Análise Química de Solos, Plantas e Fertilizantes.** 2ª Edição. EMBRAPA, Informações Tecnológicas, Brasília, 2009.

SILVA, J. A. et al. **Aplicação da metodologia de planejamento fatorial e análise de superfícies de resposta para otimização da fermentação alcoólica.** Química Nova, v. 31, p. 1073-1077, 2008.

SMID, E. J.; LACROIX, C. **Microbe–microbe interactions in mixed culture food fermentations.** Current opinion in biotechnology, v. 24, n. 2, p. 148-154, 2013.

SOUZA, R. B. de. **Análise do desempenho fermentativo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em resposta à composição mineral do meio.** 2012. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

STEHLIK-TOMAS, V. et al. **Zinc, copper and manganese enrichment in yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** Food Technology and Biotechnology, v. 42, n. 2, p. 115-120, 2004.

STIPP, S. R.; CASARIN, V. **A importância do enxofre na agricultura brasileira.** Informações agronômicas, v. 129, n. 1, p. 14-20, 2010.

STROPPA, C. T. et al. **Parâmetros cinéticos de linhagens de levedura isoladas de alambiques mineiros.** Ciência e Agrotecnologia, v. 33, p. 1978-1983, 2009.

SULAIMAN, N. et al. **Kinetics of Bio-ethanol production on the molasses-based medium by *Saccharomyces cerevisiae***. 2022.

SZAMBELAN, K.; NOWAK, J.; CZARNECKI, Z. **Use of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed with *Kluyveromyces fragilis* for improved ethanol production from Jerusalem artichoke tubers**. *Biotechnology Letters*, v. 26, n. 10, p. 845-848, 2004.

TEIXEIRA, J. A. et al. **Cell wall surface properties and flocculence of a *Kluyveromyces marxianus* strain**. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, v. 5, n. 3-4, p. 197-203, 1995.

TESFAW, A.; ASSEFA, F. **Current trends in bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*: substrate, inhibitor reduction, growth variables, coculture, and immobilization**. *International Scholarly Research Notices*, v. 2014, 2014.

TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia - 12ª Edição**. Artmed Editora, 2016.

TROFIMOVA, Y.; WALKER, G.; RAPOPORT, A. **Anhydrobiosis in yeast: influence of calcium and magnesium ions on yeast resistance to dehydration–rehydration**. *FEMS microbiology letters*, v. 308, n. 1, p. 55-61, 2010.

ÚNICA - União da Indústria de Cana-de-açúcar. **Histórico de Produção e Moagem**. Disponível em: <<https://observatoriodacana.com.br/>>. Acesso em 15 jun. 2022.

UNREAN, P.; KHAJEERAM, S. **Model-based optimization of *Scheffersomyces stipitis* and *Saccharomyces cerevisiae* co-culture for efficient lignocellulosic ethanol production**. *Bioresources and Bioprocessing*, v. 2, n. 1, p. 1-11, 2015.

VAIRO, M. L. R. et al. **Resposta de um cultivo contínuo de *Saccharomyces cerevisiae* a perturbações por impulsos provocados por adição de sulfato de amônio**. *Rev. Bras. Technol*, v. 6, 1975.

VARGAS BETANCUR, G. J.; PEREIRA JR, N. **Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production: part I: diluted acid pretreatment optimization**. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 13, n. 3, p. 10-11, 2010.

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

VIDAL, M. de F. **Produção e uso de biocombustíveis no Brasil**. Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste - ETENE, 2019.

VIDAL, M. de F. **Produção e mercado de etanol no Nordeste brasileiro**. Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste - ETENE, 2021.

- VIEIRA, D. A. de P.; FERNANDES, N. C. de A. Q. **Microbiologia Geral**. 2016.
- WAITE, A. J.; SHOU, W. **Constructing synthetic microbial communities to explore the ecology and evolution of symbiosis**. In: Engineering and Analyzing Multicellular Systems. Humana Press, New York, NY, 2014. p. 27-38.
- WALKER, G. M. **Metals in yeast fermentation processes**. Advances in applied microbiology, v. 54, p. 197-230, 2004.
- WALKER, G. M. et al. **Magnesium, calcium, and fermentative metabolism in industrial yeasts**. Journal of the American Society of Brewing Chemists, v. 54, n. 1, p. 13-18, 1996.
- WALKER, G. M.; MAYNARD, A. I.; **Magnesium-limited growth of *Saccharomyces cerevisiae***. Enzyme and microbial technology, v. 18, n. 6, p. 455-459, 1996.
- WANG, L. et al. **Simultaneous fermentation of biomass-derived sugars to ethanol by a co-culture of an engineered *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae***. Bioresource technology, v. 273, p. 269-276, 2019.
- WORLEY-MORSE, T. O.; DESHUSSES, M. A.; GUNSCH, C. K. **Reduction of invasive bacteria in ethanol fermentations using bacteriophages**. Biotechnology and Bioengineering, v. 112, n. 8, p. 1544-1553, 2015.
- ZAGO, E. A. **Efeito da concentração de N, P, Mg., Mn e Zn na multiplicação de leveduras industriais**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 1982.
- ZANARDI, M. dos S.; JUNIOR, E. F. da Costa. **Tecnologia e perspectiva da produção de etanol no Brasil**. Revista Liberato, v. 17, n. 27, p. 19-34, 2016.
- ZÖRB, C.; SENBAYRAM, M.; PEITER, E. **Potassium in agriculture—status and perspectives**. Journal of plant physiology, v. 171, n. 9, p. 656-669, 2014.

ANEXOS

Anexo A - Composição química do mosto sintético.

	Componente	Concentração (g.L⁻¹)
Ácidos	D-L Ácido Málico	1,8
	Ácido Cítrico	8
Açúcares	D(+) Sacarose	129,24
	D(+) Glicose	10
	D(-) Frutose	10
Sais minerais	Fosfato de Potássio Monobásico	0,75
	Sulfato de Potássio	0,5
	Sulfato de Magnésio Heptahidratado	0,25
	Cloreto de Cálcio Dihidratado	0,155
	Cloreto de Sódio	0,2

Anexo B - Composição das soluções químicas adicionadas ao mosto sintético

Soluções	Componente	Concentração (g.L⁻¹)
	Tirosina	0,03
	Isoleucina	0,067
	Ácido Aspártico	0,16
	Ácido Glutâmico	0,17
	Arginina	0,07
	Leucina	0,13
	Treonina	0,006
Aminoácidos	Glicina	0,123
	Alanina	0,113
	Valina	0,110
	Metionina	0,014
	Fenilalanina	0,067
	Serina	0,085
	Histidina	0,025
	Lisina	0,046
	EDTA Sal Dissódico	0,015
	Sulfato de Zinco Heptahidratado	0,0045
	Cloreto de Manganês II	0,001
Elementos traços	Cloreto de Cobalto Hexahidratado	0,0003
	Sulfato de Cobre II	0,0003
	Molibdato de Sódio Dihidratado	0,0004
	Cloreto de Cálcio Dihidratado	0,0045

	Sulfato de Ferro	0,003
	Ácido Bórico	0,001
	Iodeto de Potássio	0,0001
<hr/>		
	D-biotina	0,002
	Cálcio d-Pantotenato	0,04
	Ácido Nicotínico	0,04
Vitaminas	Myo-Inositol	0,965
	Cloridrato de Tiamina	0,04
	Cloridrato de Piridoxal	0,04
	Ácido p-Aminobenzóico	0,008
<hr/>		

APÊNDICE

Apêndice A – Cálculos para a suplementação mineral

Elemento	Composto	Massa Molar do Composto (g/mol)*	Massa Molar do Elemento (g/mol)**	Concentração do Composto no Mosto (g/L)	Concentração do Elemento no Mosto (g/L)	Concentração do Composto em 2,5 mL (g/L)	Concentração Desejada do Elemento (g/L)	Concentração Desejada do Composto (g/L)	Concentração do Elemento em 2,5 mL (g/L)	Suplementação no Meio (g/L)	Concentração da Solução Mineral (g/L)
N	NH ₄ Cl	53,5	14	2,967	0,776	0,0074	5,000	19,107	0,0478	0,0404	30,1122
	Extrato de Levedura	50,46	14	2,967	0,823	0,0074	5,000	18,021	0,0451	0,0376	28,0866
P	KH ₂ PO ₄	136	31	0,75	0,171	0,0019	0,400	1,755	0,0044	0,0025	3,7494
K	KH ₂ PO ₄	136	39	0,75	0,215	0,0019	2,000	6,974	0,0174	0,0156	23,2252
Ca	CaO	56	40	0,45	0,321	0,0011	0,200	0,280	0,0007	-0,0004	0,4104
S	MgSO ₄	120	32	0,25	0,067	0,0006	1,000	3,750	0,0094	0,0088	13,0597
Mg	MgSO ₄	120	24	0,25	0,050	0,0006	0,400	2,000	0,0050	0,0044	6,5299
Cu	CuSO ₄ ·5H ₂ O	249,5	63,5	0,03	0,008	0,0001	0,015	0,059	0,0001	0,0001	0,1080
Fe	FeSO ₄ ·7H ₂ O	278	56	0,3	0,060	0,0008	0,100	0,496	0,0012	0,0005	0,7329

* Massa molar de cada elemento analisado, a partir do especificado em tabela periódica.

** Massa molar de composto calculado a partir da relação estequiométrica dos elementos presentes na composição.

A quantidade de composto no mosto foi determinada pelas concentrações presentes nos sais minerais, aminoácidos e elementos traços usados no preparo do mosto sintético. Observando os componentes descritos nos Anexos A e B, somou-se a concentração de cada um deles na composição do mosto sintético.

A concentração do elemento no mosto foi determinada pela relação da quantidade de composto no mosto e da massa molar do elemento com a massa molar do composto, conforme a Equação 7.

$$C_{em} = \frac{Qtdc * MM_e}{MM_c} \quad (7)$$

Sendo: C_{em} = Concentração do elemento no mosto ($g.L^{-1}$); $Qtdc$ = Quantidade de composto no mosto ($g.L^{-1}$); MM_e = Massa molar do elemento ($g.mol^{-1}$); MM_c = Massa molar do composto ($g.mol^{-1}$).

A concentração do composto no volume utilizado nos ensaios, 2,5 mL do mosto sintético, foi determinada pelo cálculo da quantidade de composto no volume fermentado, conforme a Equação 8.

$$C_{cv} = Qtdc * 0,0025 \quad (8)$$

Sendo: C_{cv} = Concentração do composto em 2,5 mL do mosto (g); $Qtdc$ = Quantidade de composto no mosto ($g.L^{-1}$).

A concentração desejada no elemento foi determinada pela comparação da quantificação mineral no mosto sintético e as concentrações sugeridas em literatura, conforme discutido no item 5.2.1.

Com base na concentração desejada do elemento, a correspondente concentração desejada do composto foi determinada pela sua relação e a quantidade de composto no mosto com a concentração do elemento no mosto, conforme a Equação 9.

$$C_{dc} = \frac{C_{de} * Qtdc}{C_{em}} \quad (9)$$

Sendo: C_{dc} = Concentração desejada do composto ($g.L^{-1}$); C_{de} = Concentração desejada do elemento ($g.L^{-1}$); $Qtdc$ = Quantidade de composto no mosto ($g.L^{-1}$); C_{em} = Concentração do elemento no mosto ($g.L^{-1}$).

A partir da concentração desejada do composto, a concentração do elemento no volume utilizado pode ser determinada conforme a equação 10.

$$C_{ev} = C_{dc} * 0,0025 \quad (10)$$

Sendo: C_{ev} = Concentração do elemento em 2,5 mL do mosto (g); C_{dc} = Concentração desejada do composto ($g.L^{-1}$).

A suplementação foi calculada pelas diferenças encontradas entre a concentração do elemento em 2,5 mL do mosto e a concentração do composto no mesmo volume, conforme a equação 11.

$$S_{up} = C_{ev} - C_{cv} \quad (11)$$

Sendo: S_{up} = Concentração a ser adicionada ao mosto (g); C_{ev} = Concentração do elemento em 2,5 mL do mosto (g); C_{cv} = Concentração do composto em 2,5 mL do mosto (g).

Por fim, a concentração da solução mineral foi determinada pela relação da suplementação encontrada na equação 9 pelo volume adicionado na fermentação, que é de 67 μ L, conforme a equação 12.

$$C_s = \frac{S_{up}}{67 * 10^{-7}} \quad (12)$$

Sendo: C_s = Concentração da solução mineral (g); S_{up} = Concentração a ser adicionada ao mosto (g).