

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

UTILIZAÇÃO DO BIORREATOR *AIRLIFT* NA
PRÉ-FERMENTAÇÃO DO MOSTO DE UVA

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Santa Catarina para a
obtenção do título de Mestre em
Engenharia Química

LUIZ SERGIO SCARTAZZINI

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Ribeiro de Souza

Florianópolis, Junho/2001.

Utilização do Biorreator Airlift na Pré-Fermentação do Mosto de Uva

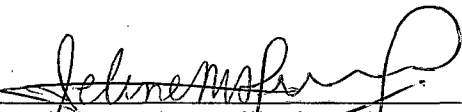
Por

Luiz Sergio Scartazzini

Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**, área de concentração **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos** e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.



Prof. Dr. José Antonio Ribeiro de Souza
Orientador



Profª. Drª. Selene M. A. Guelli Ulson de Souza
Coordenadora do CPGENQ

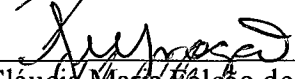
Banca Examinadora:



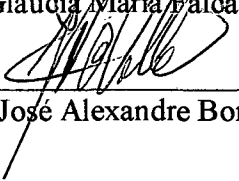
Prof. Dr. José Antonio Ribeiro de Souza



Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.



Profª. Drª. Gláucia Maria Falcão de Aragão



Prof. Dr. José Alexandre Borges Valle

Florianópolis, 28 de Junho de 2001

AGRADECIMENTOS

Aos Professores José Antonio Ribeiro de Souza e Agenor Furigo Jr. pela orientação, compreensão e a grande amizade demonstrada durante o desenvolvimento dos trabalhos.

Aos Professores, Coordenação e Funcionários do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC, pelos ensinamentos que nos passaram e onde fui sempre bem recebido.

Aos colegas e amigos Leandro, Marcio e Carminatti, pela valorosa colaboração e pelos quais tenho grande estima.

À nossa turma Almíria, Amarildo, Carlos, César, Claudimir, Estela, Francisca, Gilson, José Paulo, M.Elizabeth, Mariane, Marta e Sônia pela amizade, incentivo e o grande companheirismo desenvolvido.

Ao FUNCITEC, a UNOESC e ao Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC pela oportunidade.

Para minha esposa Gênia e meus filhos Letícia e Lucas, pela compreensão, incentivo e carinho, meu especial agradecimento.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABELAS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 - A Enologia é uma Ciência Microbiológica	1
1.2 - Processo da Fermentação Alcoólica	1
2. OBJETIVOS	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 - Características Gerais das Leveduras	5
3.2 - Necessidade de Aeração	6
3.3 - Obtenção do Álcool Industrial	8
3.4 - Matérias-Primas	9
3.5 - Composição da Matéria-Prima	10
3.6 - Produção do Álcool	12
3.7 - Anti-sépticos e Antibióticos	13
3.8 - Correção dos Mostos	13
3.9 - Preparo das Leveduras	14
3.10 - Bioquímica das Fermentações	14
3.11 - Prática da Fermentação Alcoólica	16
3.12 - Sistemas de Fermentação	18
3.13 - Fermentação Alcoólica Contínua	19
3.14 - Produtos Secundários da Fermentação Alcoólica	19
3.15 - Salas de Fermentação	19
3.16 - Recipientes de Fermentação	20
3.17 - Leveduras	20
3.17.1 - Morfologia e Estrutura das Leveduras	21
3.17.2 - Ciclo Vital	23
3.17.3 - Fermento Biológico	25

3.18 - Biorreatores	27
3.19 - Biorreatores <i>Airlift</i>	28
3.19.1 - Vantagens dos Reatores <i>Airlif</i>	29
3.19.2 - Aplicações dos Reatores <i>Airlift</i>	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 - Biorreator	35
4.2 - Microrganismo	35
4.3 - Determinação da Concentração Celular	37
4.4 - Açúcares Redutores	37
4.5 - Análises Químicas	38
4.5.1 - Álcool	39
4.5.2 - Massa Específica ou Densidade Relativa	40
4.5.3 - Determinação da Acidez Volátil	41
4.5.4 - Determinação da Acidez Total	42
4.5.5 - Acidez Fixa	43
4.5.6 - Determinação do Anidrido Sulfuroso Livre	43
4.5.7 - Determinação dos Açúcares Redutores (Método de Fehling)	44
4.5.8 - Determinação da Sacarose (Método de Fehling)	46
4.5.9 - Determinação dos Metais Pesados	47
4.5.10 - Ensaios Prévios de Conservação	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 - Influência da Utilização do Biorreator <i>Airlift</i> na Fermentação do Mosto de Uva	50
5.1.1. - Testes Realizados no Ano 2000	50
5.1.2 – Testes Realizados no Ano 2001	56
5.2 - Dados Analíticos dos Vinhos 2001	59
6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXOS	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1 - Desenvolvimento das reações da fermentação alcoólica	15
Figura 3.2 - Reprodução das células por cissiparidade	22
Figura 3.3 - Reprodução de leveduras por esporos endógenos	23
Figura 3.4 - Ciclo da fase haplóide das leveduras	23
Figura 3.5 - Ciclo da fase diplóide das leveduras	23
Figura 3.6 - Ciclo sem predominância de fases	24
Figura 4.1 - Esquema do reator <i>airlift</i>	36
Figura 5.1 - Cinética do aumento da concentração de biomassa da fermentação convencional e da fermentação em reator <i>airlift</i> durante 9 horas	52
Figura 5.2 - Concentração de Açúcares Redutores e de Biomassa na fermentação em biorreator <i>airlift</i> durante 24 horas	53
Figura 5.3 - Concentração de Açúcares Redutores e de Biomassa na fermentação em biorreator <i>airlift</i> durante 8 horas de cultura	57
Figura 5.4 - Concentração de Açúcares Redutores e de Biomassa na fermentação em biorreator <i>airlift</i> durante 6 horas de cultura	59

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1	- Principais produtos formados pela fermentação de 170 g/L de açúcar	03
Tabela 4.1	- Procedimento de Determinação da Glicose	38
Tabela 5.1	- Dados da fermentação do mosto durante 9 horas pelo método tradicional	51
Tabela 5.2	- Dados da fermentação do mosto durante 9 horas em biorreator <i>Airlift</i>	51
Tabela 5.3	- Dados da fermentação do mosto durante 24 horas em biorreator <i>Airlift</i>	52
Tabela 5.4	- Dados obtidos da análise do produto após 8 dias do início da fermentação utilizando o método tradicional e o biorreator <i>airlift</i>	54
Tabela 5.5	- Resultado da análise do produto obtido pelo método tradicional e no biorreator <i>airlift</i> realizada 30 dias após o início da pré-fermentação ...	54
Tabela 5.6	- Resultado da análise do produto realizada 80 dias após o início da pré-fermentação	55
Tabela 5.7	- Resultado da análise do produto realizada 140 dias após o início da pré-fermentação pelo Laboratório da Epagri - Videira/SC	55
Tabela 5.8	- Concentração de Biomassa no biorreator <i>Airlift</i> após oito horas de cultivo	56
Tabela 5.9	- Leituras de Absorbância a 540 nm na Fermentação do Mosto em Reator <i>Airlift</i> com tempo de permanência de 8 horas	57
Tabela 5.10	- Fermentação no Biorreator <i>Airlift</i> com permanência de 6 h	58
Tabela 5.11	- Leituras de Absorbância a 540 nm na Fermentação do Mosto em Reator <i>Airlift</i> com tempo de permanência de 6 horas	58
Tabela 5.12	- Códigos para identificação das amostras analisadas nas Tabelas 5.13 e 5.14	60
Tabela 5.13	- Dados analíticos do vinho fermentado obtidos em laboratório particular	60
Tabela 5.14	- Dados analíticos do vinho fermentado obtidos pelo Laboratório da EPAGRI – Videira/SC	61

RESUMO

O vinho é uma bebida extremamente complexa pela sua composição, pelos fatores naturais e humanos que influem em suas características, por sua constituição química e bioquímica, que o caracterizam como um produto único e atraente. Esta complexidade nos fez testar, pela primeira vez, que se tem conhecimento, o uso de um biorreator não convencional do tipo *airlift* de circulação externa, na pré-fermentação do mosto de uva, para a produção de vinhos.

Este experimento foi desenvolvido em duas etapas, a etapa aeróbia no biorreator *airlift* de circulação externa, para acompanhar o crescimento das leveduras e assim atingir um estágio ótimo de seu desenvolvimento, e a etapa anaeróbia para verificar o tempo de desdobrimento e o rendimento dos açúcares em álcool.

Na etapa aeróbia, vários testes foram acompanhados, com tempos de permanência no biorreator de 6h, 8h, 9h e 24h, nestes períodos foram medidos o desenvolvimento da biomassa e a concentração dos açúcares. Nesta etapa verificou-se que o desenvolvimento dos microrganismos no biorreator apresentou uma velocidade específica de crescimento bem superior às obtidas pelo método convencional.

Na etapa anaeróbia, a seqüência destes testes foi em definir o término da fermentação alcoólica, e avaliar analiticamente o produto final. Esta fase foi desenvolvida em nível de micro-fermentação, com volumes reduzidos, em torno de 5 litros, tanto para o método convencional como para o método em estudo.

Verificou-se, ao final do processo, que o uso do biorreator *airlift*, diminui o tempo total do desdobrimento dos açúcares em aproximadamente 10 dias, que o produto final apresenta açúcares residuais com teores menores que os do método tradicional e com isto provoca uma melhora no fator de conversão de substrato em álcool. Verificou-se também que no término da fermentação é necessário uma adição mais elevada de anidrido sulfuroso, com teores próximos aos do limite permitido pela Legislação Brasileira, para evitar o desenvolvimento da acidez acética, o que ocorre também em muitos casos com os métodos tradicionais. A fermentação se manteve com mais atividade até o final.

Conclui-se que o biorreator, tipo *airlift* de circulação externa, atende às necessidades microbiológicas das leveduras, aumentando sua velocidade de crescimento e pode ser utilizado na indústria vinícola na pré-fermentação, e posterior incubação dos mostos de vinho branco e tintos nas fermentações mantidas em recipientes fechados, e nos demais tipos de vinhos que se quer iniciar com colônias de fermentos já desenvolvidas e em plena atividade.

ABSTRACT

Wine is an extremely complex drink by its composition, natural and human factors that have influence in its characteristics, because of its chemical and biochemical constitution which defines it as a unique and attractive product this complexity made us test, for the first time known, the use of a non-conventional bioreactor with external circulation airlift type on pré-fermentation of grape must to prepare wine.

This experiment was developed in two stages, an aerobic stage on external circulation in airlift bioreactor to accompany leaven growth and get a great phase of development and the anaerobic stage to verify unfolding time and sugar efficiency in alcohol.

Several testes in the aerobic stage were attended with permanency time of 6h, 8h, 9h and 24h in the bioreactor, being analysed biomass and sugar concentration development measures. In this stage was verified that the microorganisms development in the bioreactor showed na especific growth speed, much greater than those obtained in the conventional method.

In anaerobic stage, the sequence of these tests were proposed to define the end of alcoholic fermentation, and evaluate the final product analytically. This stage was developed in a micro-fermentation level with reduced volumes around 5 litres for the conventional method as well as the current method.

At the process end, it was verified that the use of airlift bioreactor decreased the total timing of sugar unfolding in approximately 10 days, and the final product shows smaller residual sugar than the traditional method, improving alcohol efficiency. It was also verified that in the fermentation ending it is necessary to add more sulfurous anhydride with tenors close to allowed limits bry Brazilian Law, to avoid acetic acidity which occurs many times with traditional methods. Fermentation was kept with more activity until the end.

We can conclude that biofermentators, external circulation airlift type, get to leaven microbiologic necessities, increasing the growth speed and can be utilized in wine industry to obtain "pé-de-cuba" to a posterior encubation of white wine musts in fermentations kept in closed recipients, and the other types of wine wanted to be initiated with ferment colonies already developed and in actual activity.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - A ENOLOGIA É UMA CIÊNCIA MICROBIOLÓGICA

Pode-se afirmar que as bases da enologia foram estabelecidas pelo primeiro dos microbiólogos, PASTEUR. Assim a enologia científica nasceu com o aparecimento da microbiologia.

O vinho é o resultado da ação de microrganismos, sendo que os mesmos também podem provocar a sua deterioração.

Os microrganismos que participam na vinificação agem mais ou menos profundamente sobre a composição do vinho, e por isso, são em grande parte responsáveis pelo seu gosto e aromas.

A vinificação e a conservação do vinho são dominadas por problemas microbiológicos. A transformação racional da uva em vinho envolve profundos conhecimentos e boa utilização das leveduras e bactérias lácticas. O sucesso da vinificação está sempre subordinado à condução razoável dos fenômenos microbiológicos.

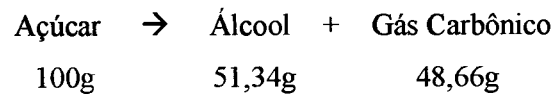
A ciência do vinho é, em grande parte, microbiologia aplicada. Certamente ainda não foram esgotadas todas as possibilidades que o mundo microbiano tem para nos oferecer relativamente aos problemas da vinificação.

1.2 - PROCESSO DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

A fermentação das uvas esmagadas ou do seu sumo, é um fenômeno muito banal e que não espanta quem a pratica. Durante a fermentação, o mosto sofre turvação, aquecimento e ocorre a liberação de CO₂ na forma de bolhas. Esta liberação de gás é comparada com o processo de fervura, sendo que a palavra fermentação vem do latim “fervere”, que significa ferver. Durante o processo fermentativo, o líquido começa a perder o gosto açucarado e a adquirir características de vinho.

Diversos cientistas estudaram o processo fermentativo. LAVOISIER demonstrou que o açúcar transforma-se em álcool e em gás carbônico, que se desprende. Baseado nestes estudos, surgiu o primeiro princípio “Nada se perde, tudo se transforma”. Sobre a

fermentação disse também: “é uma das operações mais surpreendentes e mais extraordinárias de todas as que a microbiologia nos apresenta”. GAY-LUSSAC apresentou uma representação química para a reação de fermentação



Na realidade, o fenômeno é mais complexo, como todas as reações das células vivas. PASTEUR estabeleceu que a equação de GAY-LUSSAC é apenas válida para 90% do açúcar transformado, sendo os outros 10% transformados em glicerina, ácido succínico e ácido acético. Descobriram-se depois outros produtos secundários, como por exemplo, ácido láctico, acetaldeídos, ácido pirúvico, álcoois superiores e um grande número de substâncias presentes em menores quantidades.

Há pouco mais de um século, PASTEUR demonstrou que a fermentação é produzida por leveduras quando privadas de ar. Anteriormente isto era atribuído a uma espécie de decomposição espontânea da matéria orgânica. No entanto, o homem soube utilizar os fenômenos muito antes de os saber explicar, pois diversos povos antigos produziam vinho, sem compreender todos os mecanismos da sua obtenção. Assim, o bom vinho era apenas o resultado de uma série de acasos felizes.

Foi após os trabalhos de PASTEUR, que demonstraram os princípios da fermentação alcoólica, que se pôde estabelecer uma doutrina de vinificação. Através destes conhecimentos, o processo de obtenção foi desvendado, sendo que muitos erros na produção empírica do vinho foram corrigidos.

PASTEUR não descobriu as leveduras, mas sim a relação que existe entre a presença destes fermentos vivos e a transformação do açúcar. A fermentação está relacionada com a vida, e são estes fungos microscópicos unicelulares – as leveduras, que decompõem o açúcar em álcool e gás carbônico.

O catabolismo celular é mantido através da energia liberada na degradação da matéria orgânica. Dois fenômenos podem ocorrer: a respiração, que necessita do oxigênio do ar, e a fermentação, que ocorre na ausência de oxigênio. A respiração produz cisões moleculares bastante fortes, liberando muita energia. Pelo contrário, a fermentação corresponde a uma má utilização da energia, já que a degradação da matéria é incompleta.

Desta forma, as leveduras devem transformar muito açúcar em álcool para assegurar as suas necessidades energéticas.

Tabela 1.1 - Principais produtos formados pela fermentação de 170 g/L de açúcar.

Principais Produtos	Teores Médios (mg/L)
Álcool	80 000
Gás carbônico	76 000
Glicerina	6 000
Ácido succínico	800
Butileneglicol	400
Acido acético	300
Ácido láctico	300
Álcoois superiores	300
Ácido citramálico	80
Ácido pirúvico	80
Ácido acetoglutárico	60
Acetato de etila	40
Acetoína	40
Acetaldeído	10

O mecanismo da fermentação do açúcar é extremamente complexo. O esquema das transformações principais comporta mais de trinta reações sucessivas, jogando com um grande número de enzimas. Pode-se dizer que as enzimas são as ferramentas das leveduras, adaptadas a uma etapa da transformação. Cada etapa necessita de uma ferramenta específica, uma enzima diferente. Os produtos secundários mencionados são um pouco como os restos destas múltiplas reações (PEYNAUD, 1982).

2 - OBJETIVOS

O objetivo principal deste experimento, com o uso de um biorreator não convencional, do tipo *airlift* de circulação externa, foi o de verificar a multiplicação das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* em sua fase exponencial, analisar a velocidade de crescimento abreviando o tempo gasto nesta fase, e com isto, termos uma fermentação alcoólica posterior com maior rendimento da cultura e um total desdobramento dos açúcares na obtenção do etanol, comparados com os métodos utilizados convencionalmente em nossa região.

3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 - CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS LEVEDURAS

As leveduras são os agentes da fermentação. Podem ser cultivadas como pequenos vegetais microscópicos. Juntando vestígios de leveduras a um mosto de uva estéril, vê-se ao microscópio que as células fervilham e reproduzem-se, e no fim da fermentação, podemos obter 2 ou 3 g delas por litro.

Existe um grande número de espécies de leveduras que se diferenciam pela sua morfologia, suas propriedades, sua forma de reprodução e pela forma como transformam o açúcar. As leveduras do vinho pertencem a uma gama de gêneros, cada um deles dividido em espécies. Na classificação botânica, elas designam-se por um nome duplo latino; o primeiro nome correspondendo ao gênero e o segundo a espécie. Por exemplo, *Saccharomyces ellipsoideus* pertence ao gênero *Saccharomyces* (literalmente o cogumelo ou fungo que transforma o açúcar) e à espécie *ellipsoideus* (forma elíptica).

As leveduras encontradas na vinificação podem apresentar uma das quatro formas seguintes: elíptica ou ovóide; alongada (em forma de bastonetes); esférica e apiculada (com uma saliência em cada ponta, como um limão). A maioria delas apresenta, segundo as condições, duas formas possíveis de reprodução: vegetativa por germinação ou reprodução pela formação de esporos, os quais depois de germinados transformam-se em leveduras. As leveduras que não se reproduzem por esporos, pouco numerosas no vinho, reproduzem-se apenas pela forma vegetativa.

Quando uma célula de levedura encontra-se num ambiente nutritivo, aparece em seu contorno uma intumescência com formato celular, que aumenta progressivamente. Logo que as duas partes da célula tenham o mesmo tamanho, elas separam-se e a germinação das duas células continua. Em condições ótimas, é preciso duas horas para que a população das leveduras duplique (PATO, 1982).

Quando as leveduras esgotam o açúcar do meio nutritivo, param de se multiplicar por germinação e algumas assumem a forma de esporos. Estas últimas constituem uma espécie de semente cujo estado de vida retardado permite a resistência a condições desfavoráveis (dessecação, calor, contacto com agentes químicos), que seriam fatais para

as leveduras. A esporulação exige condições especiais e, é muito rara no vinho. As leveduras cheias de granulações, observadas nas ligas, são leveduras mortas cujo protoplasma está coagulado, e só muito raramente ocorre a esporulação. Logo que as condições tomam-se novamente favoráveis, os esporos germinam e dão vida a novas células (VOGT, 1975).

O tamanho das leveduras varia muito segundo a espécie. O seu diâmetro pode variar de 2 a 10 micron (milésimos de mm). A análise das mesmas ao microscópio requer um aumento da ordem de 600 a 900 vezes (ROSA, 1978).

Um dado espantoso é o tamanho da colônia de leveduras que se encontra num mosto em plena fermentação. A população de leveduras é extremamente densa, na ordem de 80000 a 120000 por mm^3 , ou seja, de 80 a 120 milhões por cm^3 . Numa gota de mosto e uva em fermentação podem existir 5 milhões (VOGT, 1975).

As leveduras encontram-se na uva madura no momento da vindima e são trazidas para a cuba e para a prensa com as uvas; outra parte prolifera na própria cuba. O seu "habitat" de inverno é a camada superior do solo. No verão, os insetos transportam para as uvas as leveduras e outros microrganismos que recolhem de outras fontes de fermentação existentes na natureza nessa época do ano. Na fase inicial de desenvolvimento (uvas verdes), não encontram-se leveduras, sendo que apenas depois do início da maturação ocorre o surgimento das leveduras, quando o cacho é visitado por insetos. Não há portanto, na natureza, leveduras específicas da uva (CORTÉS, 1982).

Os microrganismos retidos na película da uva, são variados e numerosos. Não são retidos pela pruína, matéria cerosa em escama que cobre a película, mas sim por secreções de origem indeterminada. Além de leveduras específicas, encontram-se leveduras micodérmicas ou fermento da flor, bolores, bactérias lácticas e bactérias acéticas. Portanto, encontram-se misturados sobre as uvas microrganismos úteis a vinificação e também aqueles que provocam a alteração dos vinhos.

3.2 - NECESSIDADE DA AERAÇÃO

As leveduras têm necessidade de oxigênio para se multiplicarem. Na ausência completa de ar, apenas formam algumas gerações e depois param o seu crescimento. Basta então voltar a dar-lhes um pouco de ar para que tudo volte ao normal. Se o estado de

anaerobiose se prolonga, a maior parte das células morre. PASTEUR definiu a fermentação como “vida sem ar”, porque uma célula de levedura privada de oxigênio, encontra a energia que lhe é necessária nesta transformação do açúcar. Mas para ter uma fermentação prolongada e obter produtos fermentados ricos em álcool, têm que se formar novas gerações de leveduras constantemente, e para isso o oxigênio embora apenas em vestígios, é necessário.

Esta necessidade de oxigênio é de certa forma indireta. As leveduras necessitam de oxigênio para sintetizar os esteróis e assimilar os ácidos graxos de que necessitam. Os esteróis são substâncias orgânicas com vários ciclos de átomos de carbono e com função álcool, fonte de várias hormônas e vitaminas, e cuja importância biológica é considerável. No princípio da fermentação, as primeiras gerações de leveduras se beneficiam das reservas de esteróis das células-mãe, e depois dos esteróis dos meios naturais. Se a fermentação prossegue ao abrigo do ar, os esteróis esgotam-se e não são renovados. O oxigênio é então indispensável à sua síntese e à continuação da fermentação.

O peso das leveduras formadas no decurso de uma fermentação depende muito da proporção de oxigênio de que elas dispõem. Na indústria, quando se quer fabricar muitas leveduras, aera-se fortemente o meio nutritivo. Na vinificação, conduzida geralmente ao abrigo do ar, o oxigênio é o fator limitante na multiplicação das leveduras.

O processo inicial de industrialização das uvas (moagem, desengace, bombeamento ou ainda, para as uvas brancas, a espremedura) assegura a primeira aeração, útil para o desencadeamento da fermentação. Isto ocorre tanto mais rapidamente quanto mais oxigênio as leveduras encontrarem. Da mesma forma, o fim da fermentação de um mosto rico em açúcares depende da quantidade de ar de que as leveduras dispuseram. Mesmo aerações muito fracas têm efeitos sensíveis sobre o desenvolvimento da fermentação.

Num mosto em fermentação, a população das leveduras é mais densa na zona em contacto com o ar. Depois de alguns dias de fermentação, uma contagem de leveduras indica 80 milhões de leveduras por cm^3 a um centímetro da superfície e apenas 48 milhões no interior do recipiente (ROSA, 1978).

Uma experiência simples demonstra igualmente a necessidade de ar das leveduras. Considere um mosto de uvas fermentado no laboratório com a mesma inseminação, em diversos frascos, à mesma temperatura. Um deles é simplesmente rolhado com um tampão de algodão em rama, um outro é fechado por um sistema de imersão em água do gás carbônico liberado, e o terceiro por uma rolha que suporta um tubo de vidro de emanção

finamente afilado. No primeiro frasco o oxigênio penetra livremente através da espessura do algodão em rama, apesar da emissão do gás carbônico; é a fermentação chamada em aerobiose. Nos outros frascos o oxigênio não pode penetrar; é a fermentação em anaerobiose. O frasco rolhado com o algodão em rama entra rapidamente em fermentação e esta prossegue até ao fim; todo o açúcar fermentável é facilmente transformado. Ao abrigo do ar, pelo contrário, a fermentação é mais lenta; pára insensivelmente e não se acaba; o vinho conserva açúcar. Quanto maior for a riqueza do mosto em açúcar, maior é a diferença entre os frascos. O primeiro frasco acusa de 80 a 100 milhões de leveduras por cm^3 , enquanto nos outros apenas de 50 a 60 milhões. Estes números explicam bem o fenômeno: no frasco fechado com algodão as leveduras recebem oxigênio suficiente para se reproduzirem normalmente; nos outros frascos a falta de oxigênio limita a multiplicação das leveduras; sendo menos numerosas, não acabam a transformação do açúcar.

Esta experiência pode ser reproduzida em volumes diferentes, numa escala experimental, em escala semi-industrial ou na prática, dentro de uma grande cuba, com mosto ou vindima pisada, e mostra a importância do arejamento no decurso da fermentação. Este realiza-se seja pelo contato permanente com o ar, seja pela operação de “recalque”. Para evitar a paralisação da fermentação por anaerobiose das leveduras, é necessário aerar quando se opera em cuba fechada, tanto mais quanto mais ricas as vindimas forem em açúcar (PEYNAUD, 1982).

3.3 - OBTENÇÃO DO ÁLCOOL INDUSTRIAL

Obtém-se o etanol por três maneiras gerais: por destilação, por via sintética e por via fermentativa. A destilatória não tem significação econômica no Brasil. Aplica-se esporadicamente em certas regiões vinícolas para controle de preço de determinadas castas de vinhos de mesa. Por via sintética, obtém-se a partir dos hidrocarbonetos não-saturados eteno e etino, de gases do petróleo e da hulha. É uma forma competitiva, ainda de valor potencial para o Brasil. Nos países onde a indústria petroquímica está muito avançada é a forma mais econômica de obtenção do etanol. Com a abertura de novos poços de petróleo, com a exploração dos xistos betuminosos e com o desenvolvimento da indústria petroquímica, é de se esperar que o etanol venha a ser produzido também dessa forma.

Atualmente, no país, a via fermentativa é a mais importante para a obtenção do álcool etílico. O desenvolvimento da indústria petroquímica permite prever uma redução da importância da via fermentativa para a produção de álcool retificado e anidro, mas essa forma de obtenção continuará a ter importância na produção de álcool de boca, sob a forma de aguardentes. As bebidas destiladas possuem características próprias de aroma e sabor, conferidos por impurezas decorrentes do processo fermentativo. A menos que se modifique um hábito arraigado, as aguardentes não serão produzidas por diluição.

Um dos fatores que torna a produção do etanol por fermentação uma das formas mais importantes de sua obtenção é o grande número de matérias-primas naturais existentes em todo o país.

Na obtenção do álcool por via fermentativa distinguem-se três fases distintas: o preparo do substrato, a fermentação e a destilação. O preparo do substrato é o tratamento da matéria-prima para dela se extraírem os açúcares fermentescíveis. Difere para as distintas matérias-primas. A fermentação é um processo comum a todos os substratos, cujo princípio é a transformação dos açúcares em etanol e dióxido de carbono. As variações entre os processos de fermentação são apenas em detalhes. Na destilação, recupera-se o etanol, geralmente em duas operações. Uma para separar do substrato fermentado uma mistura hidroalcoólica impurificada com aldeídos, ésteres, álcoois superiores, ácidos orgânicos e outra, para separar as impurezas do etanol.

3.4 - MATÉRIAS-PRIMAS

Qualquer produto que contenha açúcar ou outro carboidrato pode ser utilizado como matéria-prima para obtenção de etanol. Entretanto, para que seja viável economicamente, é preciso considerar-se seu volume de produção, o rendimento industrial e o custo de fabricação.

Há várias maneiras de classificar as matérias-primas para a produção de etanol, mas qualquer um dos critérios que se adote deixa algo a desejar. Podem-se classificá-las em *matérias açucaradas*, agrupando cana, beterraba, melaços, mel-de-abelhas e frutas; em *matérias amiláceas e feculentas*, agrupando amido de grãos, fécula de raízes e tubérculos; e em *matérias celulósicas*, incluindo palhas, madeiras, resíduos agrícolas e resíduos sulfíticos de fábricas de papel.

Entre as matérias açucaradas, costuma-se distinguir em diretamente fermentescíveis e as não diretamente fermentescíveis. As primeiras são os monossacarídeos existentes nos sucos de frutas. Sua importância industrial reside na produção de etanol em bebidas como o vinho e a cidra. As não diretamente fermentescíveis são os dissacarídeos, que fermentam após uma hidrólise, à qual se dá o nome de inversão e que se realiza normalmente por ação de enzimas do agente de fermentação. A sacarose é o representante mais importante dos componente da cana-de-açúcar e dos melaços. O processo de alcoolização é fácil, não exigindo conhecimentos profundos e a matéria-prima utilizada nas indústrias nem sempre é pura.

As matérias amiláceas e feculentas fermentam após uma hidrólise, que se chama de sacarificação, pela qual o amido infermentescível se transforma em açúcar fermentescível. A alcoolização processa-se através de técnicas industriais mais complexas, em alguns casos, à semelhança de trabalhos de laboratório. Pela necessidade de maiores conhecimentos, pelas dificuldades de conservação e de fermentação da matéria-prima original e pelo custo da fabricação, os álcoois de cereais são produzidos no Brasil em pequena escala, com maior importância para a indústria de bebidas.

As matérias celulósicas não oferecem, para o país, condições econômicas de exploração, porque não há concentrações de indústrias de papel ou de madeira, para que o rendimento seja elevado e o custo de produção suficientemente baixo.

Para o Brasil, enquanto não houver concorrência do álcool de síntese, as únicas matérias-primas de importância econômica imediatas para a produção do etanol industrial são os melaços e a cana-de-açúcar; enquanto que para a preparação de bebidas destiladas utiliza-se a cana-de-açúcar e as matérias amiláceas, particularmente o milho. A mandioca é uma matéria feculenta potencial, que já foi explorada industrialmente e que é utilizada atualmente em pequena escala para a produção de uma aguardente comumente conhecida por tiquira.

3.5 - COMPOSIÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS

A composição de qualquer produto vegetal varia com um grande número de fatores, uns controláveis pelo homem, outros não. Entre eles destacam-se: a variedade, a idade, as regiões e as condições culturais, mesológicas, de maturação, de sanidade, de colheita, de

transporte, de armazenamento e de industrialização. Esses fatores afetam a composição das matérias-primas, que se constituem em subprodutos da industrialização dos vegetais.

As descrições que seguem referem-se principalmente aos materiais suscetíveis de serem transformados em etanol.

Melaços

O melaço é o subproduto obtido da fabricação de açúcar-cristal branco, obtido durante o processo de clarificação, sulfitagem e colagem. De acordo com a proveniência, pode-se ter melaço de primeira, mel rico de primeira, mel pobre de primeira, melaço de segunda, mel rico de segunda ou mel final, também chamado de mel residual ou esgotado.

O melaço, chamado no Brasil de mel final, é o resíduo da turbinagem das massas cozidas para obtenção do açúcar, seguindo para a destilaria, qualquer que seja sua composição. De um modo geral, ele encerra 20% de água, 62% de açúcares, 8% de cinzas, 3% de materiais nitrogenados e 7% de outras substâncias, como gomas e ácidos. Na fração açúcares distinguem-se 32% de sacarose, 14% de dextrose e 16% de levulose. Assim, o melaço é um resíduo rico que encerra 50% de açúcares fermentescíveis.

O mel final é obtido nas usinas em proporções muito variáveis segundo o processo de fabricação, o excesso de cana-de-açúcar e outros fatores. Admite-se comumente uma produção de 25 a 40 litros por tonelada de cana consumida na indústria, podendo atingir de 50 a 60 litros devido a fenômenos como estiagem, geadas e outros (ALMEIDA LIMA *et al*, 1975).

Cana-de-açúcar

Na cana, o açúcar predominante é a sacarose. Os açúcares redutores aparecem em quantidades quase iguais nas canas verdes. À medida que amadurece, diminuem seus teores, podendo desaparecer nas canas completamente maduras. Por influência dos fatores citados, uma cana-de-açúcar pode conter 74,5% de água, 14% de açúcares (12,5% de sacarose, 0,9% de dextrose e 0,60% de glicose), 10% de fibras e o restante dividido entre matérias minerais, compostos nitrogenados, ceras, pectinas e ácidos.

O caldo obtido pela moagem da cana-de-açúcar contém de 78 a 86% de água, 10 a 20% de sacarose, 0,1 a 2% de açúcares redutores, 0,3 a 0,5% de cinzas e entre 0,5 e 1,0% de outros compostos nitrogenados. O pH do caldo varia entre 5,2 e 6,8.

A cana-de-açúcar no Brasil apresenta uma produtividade entre 50 e 100 toneladas por hectare de acordo com a região. A proporção de caldo produzido pela moagem é de 50 a 100% do peso em cana, isto é, uma tonelada pode dar de 500 a 1000 litros de caldo, depende da instalação esmagadora e da embebição. Em geral, admite-se uma média de 850 litros para usinas de açúcar, reduzindo-se nas fábricas de aguardente e álcool.

Milho

A produção média de milho no Brasil é de 1,1 a 3 t de grãos por hectare.

O milho limpo, ventilado e em condições de armazenamento, apresenta um teor de umidade entre 9 a 16%, de 59 a 70% de extrativos não-nitrogenados, 5 a 15% de material protéico, 1,5 a 8,5% de material celulósico e de 1,3 a 4% de cinzas.

Mandioca

As raízes frescas contêm de 67 a 75% de água, de 18 a 23% de fécula e o restante distribuído entre material protéico, celulose, graxas e cinzas.

3.6 - PRODUÇÃO DO ÁLCOOL

Do ponto de vista econômico, as leveduras são os microrganismos mais importantes na obtenção do álcool por via fermentativa. As espécies mais usadas na produção industrial de álcool, vinhos e aguardentes são os *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces uvarum*.

As leveduras são mesófilas. As temperaturas ótimas para a produção industrial de etanol situam-se na faixa de 26-35 °C, com média de 30 °C. Algumas leveduras alcoólicas utilizadas na produção de cerveja e vinhos apresentam bom desempenho em temperaturas inferiores ao mínimo citado.

Os elementos nutritivos mais importantes para estes microrganismos são o carbono, o nitrogênio, fosfatos, sais de magnésio, potássio e cálcio. As fontes mais importantes de carbono são os carboidratos, enquanto o nitrogênio é obtido do material protéico e dos produtos de sua degradação, podendo ser adicionado ao processo na forma de sais amoniacais. Os micronutrientes como manganês e cobalto atuam favoravelmente em suas atividades vitais.

A condição ótima situa-se entre pH 4 e 5, mas algumas fermentações alcoólicas desenvolvem-se bem em níveis mais elevados, em substratos com poder-tampão elevado, como os melaços a pH 5,8 - 5,9.

3.7 - ANTI-SÉPTICOS E ANTIBIÓTICOS

No Brasil os mostos nas destilarias de álcool e de aguardente não são comumente esterilizados. Para controlar o problema das contaminações utilizam-se anti-sépticos para criar um ambiente favorável ao desenvolvimento das leveduras e desfavorável a outros microrganismos. Cada anti-séptico atua de maneira diferente, agindo sobre um ou mais grupos de microrganismos. Alguns agem favoravelmente sobre a levedura, ao mesmo tempo que inibem bactérias e fungos.

Obtêm-se boas fermentações utilizando-se 4 mg de hexaclorofeno por litro de mosto ou pentaclorofenol na proporção de 0,01 a 0,05 g/litro de substrato. O ácido sulfúrico, que se usa para a correção da reação do meio também age como anti-séptico.

Nas fermentações para produção de vinhos de mesa, o único anti-séptico que se usa é o anidrido sulfuroso.

Pela mesma razão por que se empregam os anti-sépticos, usam-se os antibióticos nas fermentações industriais para produção de etanol. Seu emprego generaliza-se dia a dia no país. Sua ação é de agente esterilizante, em virtude de suas propriedades bacteriostáticas. A penicilina revela-se um bom inibidor de contaminações, com o emprego de 500 a 1000 U.I. por litro de mosto com apreciável aumento de rendimento. A aplicação é econômica, não exigindo modificações nas técnicas e nos equipamentos utilizados, tornando as fermentações mais puras e regulares. Pode-se utilizar também cloranfenicol, tetraciclina e clorotetraciclina, mas a penicilina é ainda a mais recomendável economicamente.

3.8 - CORREÇÃO DOS MOSTOS

Conhecendo-se as propriedades biológicas das leveduras e suas exigências nutricionais, torna-se simples fazer o tratamento dos mostos para obter fermentações regulares, homogêneas e puras. Nas fermentações para produção de álcool a correção depende da natureza dos mostos, não sendo corrigidos para a obtenção de cerveja e vinhos.

Os substratos de origem amilácea, pela sua própria preparação, sofrem esterilização e usualmente adicionam-se fosfatos, na forma de superfosfato em sua fração solúvel, na proporção de 1 g por litro de substrato. Se necessário, corrige-se a acidez com ácido sulfúrico.

Para substratos de melação, normalmente faz-se apenas a diluição. Em casos especiais, adicionam-se fosfatos e sais de amônio na proporção de 1 g por litro de mosto.

Quando se trabalha diretamente com caldo de cana, faz-se uma correção mais cuidadosa para oferecer à levedura condições de nutrição que normalmente não se encontram no caldo. Juntam-se fosfatos, sais de amônio e vitaminas. Nas destilarias de aguardente, usualmente adicionam-se superfosfatos, sulfato de amônio e farelo de arroz na quantidade de 1 g por litro de mosto. O farelo de arroz é boa fonte de vitaminas e de proteínas. Melhores rendimentos obtêm-se quando se trata o caldo de cana-de-açúcar com 0,1 g por litro de sais de magnésio e 0,01 g por litro de sais de manganês e cobalto. Além da diluição e dos nutrientes, adicionam-se os anti-sépticos ou antibióticos e ajusta-se a temperatura.

3.9 - PREPARO DAS LEVEDURAS

Após a correção, o mosto pode ser inoculado e inicia-se o processo de fermentação para a produção do etanol. Nas pequenas cantinas e nas pequenas destilarias de aguardente, comumente usam-se os microrganismos selvagens, que acompanham os caldos. Nas instalações de grande capacidade, usam-se leveduras selecionadas com tolerância a altos teores de etanol e com boa velocidade de fermentação. Usam-se também, em grande escala, as leveduras de panificação, prensadas e secas. Nesse caso, obtêm-se, fácil e rapidamente, um inócuo volumoso, partindo-se de 10 a 20 g de leveduras para cada litro de mosto. Essa quantidade é utilizada para volumes de 1000 a 10000 litros iniciais de mosto, à concentração de 13 a 15 °Brix, que serão divididos em diversos recipientes e realimentados com mostos diluídos, até completar-se o volume total das dornas das destilarias.

Quando se parte de leveduras selecionadas, prepara-se o inócuo com a adição das mesmas em quantidades e concentrações de volumes crescentes, na proporção de 1:5 ou 1:10, até atingir o volume útil de fermentação da indústria (ALMEIDA LIMA, 1975).

3.10 - BIOQUÍMICA DAS FERMENTAÇÕES

A fermentação alcoólica desenvolve-se por uma série de reações, que estão resumidas e esquematizadas na Figura 3.1.

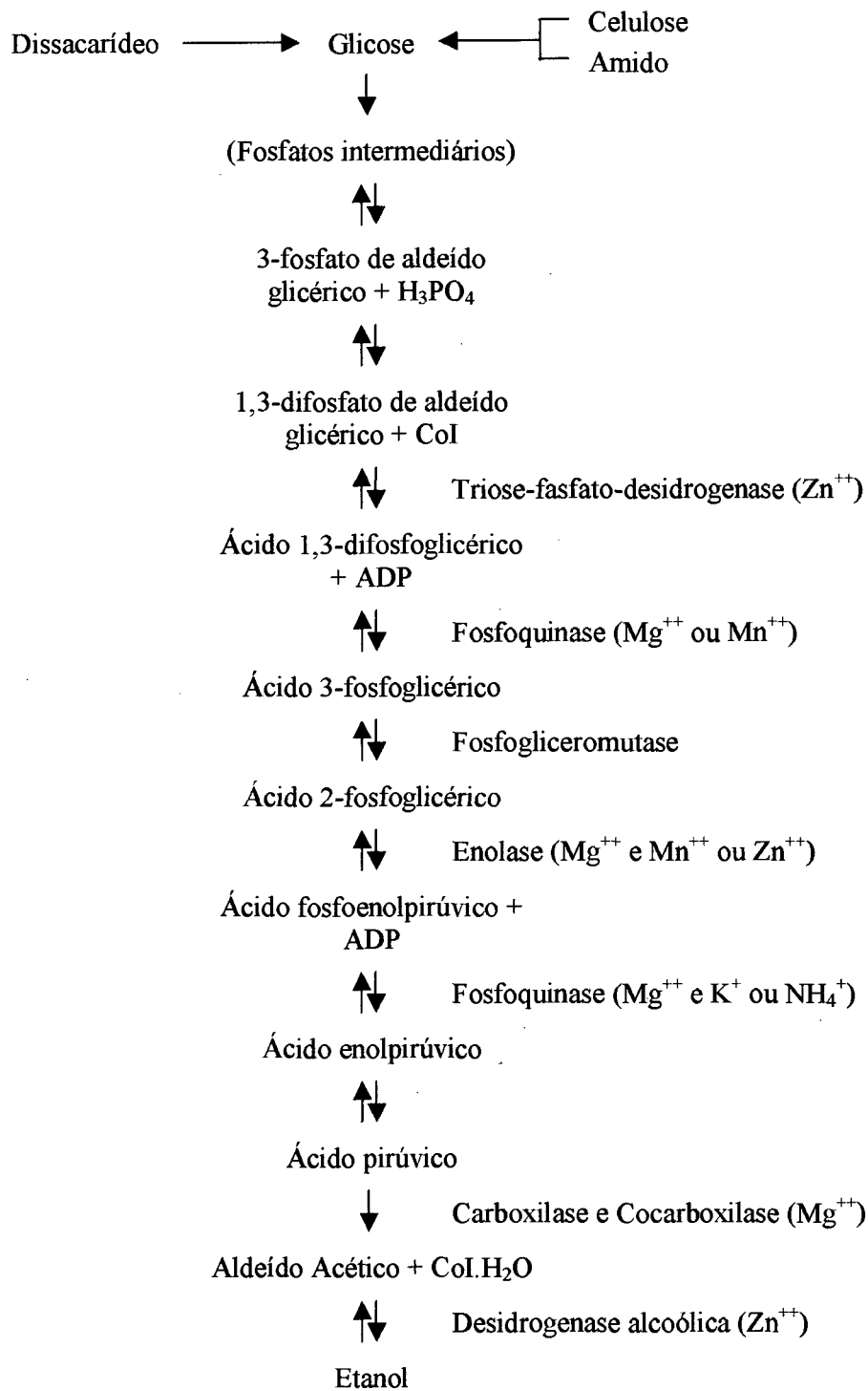


Figura 3.1 - Desenvolvimento das reações da fermentação alcoólica.

Fonte: ALMEIDA LIMA *et al.*, 1975.

3.11 - PRÁTICA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Tão logo se mistura o inóculo ao mosto corrigido, inicia-se o processo de fermentação alcoólica dos açúcares fermentáveis. Embora não se possa estabelecer, com rigidez, os limites de separação entre as fases, pode-se distinguir, numa fermentação alcoólica, uma fase preliminar, uma fase tumultuosa e uma fase final ou complementar.

A fase preliminar inicia-se no momento do contato do levedo com o mosto. Caracteriza-se por uma multiplicação celular intensa, pequena elevação de temperatura e pequeno desprendimento de dióxido de carbono. Nessa fase, garante-se a produção de grande quantidade de células de poder fermentativo máximo, o que se consegue em temperatura baixa e mosto convenientemente preparado. Sua duração é de 4 a 6 h e varia de acordo com o sistema de fermentação que se usa na destilaria.

A fase tumultuosa caracteriza-se pelo desprendimento volumoso e intenso de dióxido de carbono, conseqüência da existência de um número suficiente de células para desdobrar os açúcares fermentescíveis do mosto. A temperatura eleva-se rapidamente, a densidade do mosto reduz-se e elevam-se a percentagem de álcool e a acidez. O substrato agita-se como em ebulição. Os inconvenientes da elevação exagerada de temperatura corrigem-se com refrigeração.

O desprendimento de dióxido de carbono é evidente. O aspecto da espuma difere para cada gênero de levedura e para cada tipo de substrato. No caldo de cana não-clarificado a espuma é espessa, viscosa e volumosa, a ponto de transbordar em domas abertas. Ao contrário das fermentações de substratos de melaço, não reagem bem à adição de anti-espumantes comumente usados na indústria de álcool. Nos mostos de melaço, com óleo vegetal misturado com ácido mineral, às espumas cedem com facilidade. A fase tumultuosa ou principal dura de 12 a 16 h.

A fase complementar, que leva de 4 a 6 h, caracteriza-se pela diminuição da intensidade do desprendimento do dióxido de carbono, maior tranquilidade no líquido e diminuição da temperatura. Nessa fase, a concentração de açúcares diminui ao mínimo.

Embora se note um aumento da proporção dos álcoois superiores do começo ao fim da fermentação alcoólica, é na fase complementar que deve-se ter um maior cuidado para não prejudicar a qualidade final do produto fermentado.

A fermentação alcoólica em pequenas indústrias é um processo fermentativo rústico que ocorre mesmo em condições tecnicamente adversas, embora com desvantagens

econômicas. Graças à capacidade biológica das leveduras essas adversidades são superadas, bastando que existam condições de concentração adequada e nutrientes. Entretanto as contaminações se apresentam com frequência, prejudicando o rendimento econômico. Esse inconveniente contorna-se com uma supervisão constante, a qual permite que se tomem cuidados para evitar ou suprimir as infecções. O controle das fermentações alcoólicas faz-se por tópicos, conforme se discute a seguir.

Tempo de fermentação

A duração média de um processo fermentativo em mosto de melaço ou de caldo de cana-de-açúcar é de 24 h e as de mostos de amiláceos de 36 h. Fixando-se essas bases como normais, a observância do fator tempo é a primeira de que se lança mão e é de relevante importância.

Odor da fermentação

O aroma das fermentações puras é penetrante, ativo, e tende para odor de frutas maduras. Cheiro ácido, a ranço, ácido sulfídrico e outros indicam irregularidades.

Aspecto da espuma

Embora varie com a natureza do mosto, temperatura, espécie e gênero de levedura, apresenta-se com aspecto típico e característico para as mesmas condições. Alterações nas características indicam irregularidades.

Drosófilas

Infalivelmente, quando há infecção acética, aparecem “moscas do vinagre” em quantidade proporcional à contaminação.

Temperatura

Alterações importantes na curva de temperatura, do início ao final da fermentação, alertam para possíveis problemas no processo.

Densidade do mosto

Durante a fermentação, a densidade do mosto decresce segundo uma curva harmônica com as fases da fermentação. De sua observação, percebem-se as alterações da marcha fermentativa.

Açúcares no mosto

Consumem-se de acordo com a curva de densidade.

Acidez no substrato em fermentação

Não deve haver grande alteração entre a acidez final e a inicial. Quando a final for mais que o dobro da inicial, é indicação de má fermentação.

3.12 - SISTEMAS DE FERMENTAÇÃO

Distinguem-se quatro tipos principais de processos de fermentação industrial, que se denominam sistema de cortes, sistema de reaproveitamento do inócuo, sistema com culturas puras e sistemas de recuperação de leveduras.

Sistema de cortes

Depois que se faz a primeira fermentação, divide-se o volume de mosto em dois recipientes, completando-se os mesmos e deixando-se fermentar. Um dos recipientes é enviado para a destilaria, enquanto o outro é novamente dividido, servindo para produzir o inócuo para um novo ciclo.

Sistema de reaproveitamento do inócuo

Após a fermentação as leveduras são decantadas, separando-se o substrato fermentado para a destilação, sendo o resíduo utilizado como inócuo para um novo substrato.

Sistema com cultura pura

É o sistema clássico de fermentação alcoólica industrial, em que cada ciclo inicia-se com uma inoculação de leveduras selecionadas.

Sistema de recuperação de leveduras

Após a fermentação, o substrato é separado através de centrífugas, sendo os resíduos da ordem de 10 a 20% do volume, com a aparência de um creme, a que se denomina leite ou creme de leveduras. Esse leite de leveduras é purificado por um tratamento com água e ácido sulfúrico até pH 2,2 a 3,2, sob agitação durante 4 h, sendo reutilizado nos recipientes de fermentação.

Com o sistema de reaproveitamento de inócuo, comum às indústrias de aguardentes, e com o de recuperação de leveduras, reduz-se substancialmente a fase inicial das fermentações porque o substrato recebe uma concentração ótima de células (próximo de 3×10^6 células por ml), o que permite que se entre rapidamente na fase tumultuosa, com evidentes vantagens econômicas.

3.13 - FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA CONTÍNUA

Na maioria das destilarias Brasileiras de álcool e aguardente, a fermentação se processa de forma intermitente, isto é, enche-se o recipiente de fermentação, inocula-se, fermenta-se, destila-se, lava-se e inicia-se novo processo.

Em sua forma mais simples, a fermentação continua faz-se alimentando uma dorna com fluxo contínuo de substrato, em uma concentração conveniente, retirando-se dela, de forma contínua, o fermentado que é encaminhado para a destilação ou para dornas de espera, onde finaliza o processo e, então, para a destilaria.

3.14 - PRODUTOS SECUNDÁRIOS DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Desde que se tem como objetivo obter etanol na fermentação alcoólica, pode-se considerar como secundário qualquer outro produto que se origine durante o processo fermentativo. Eventualmente, esses subprodutos podem ser convertidos em produtos economicamente viáveis.

Admitem-se, como sendo produtos secundários, o dióxido de carbono, os álcoois superiores, a glicerina, o ácido succínico e o aldeído acético.

Nos substratos encontram-se também outras substâncias como o ácido acético, o ácido tartárico, o ácido butírico, o dextrânio, as cetonas, o gás sulfídrico, as bases nitrogenadas, os ácidos graxos, o furfurool, os aldeídos, os ésteres e outros. A maior parte deriva de fermentações paralelas que se desenvolveram no substrato por efeito de microrganismos contaminantes.

3.15 - SALAS DE FERMENTAÇÃO

São as construções onde se abrigam as dornas, as centrífugas, os pré-fermentadores, os tanques de tratamento do fermento e outros equipamentos ligados ao processo de fermentação. Sua construção se faz segundo conceitos técnicos e de engenharia, variáveis para cada região e tipo de indústria, de acordo com as condições de clima, de tal forma que se obtenha sempre o máximo de higiene, controle de temperatura, iluminação e ventilação adequadas e escoamento dos resíduos.

Deve-se fazer sempre construções suficientemente amplas para que o equipamento seja instalado com suficientes espaços livres à volta, permitindo acesso fácil para assepsia, reparos, substituições e modificações.

3.16 - RECIPIENTES DE FERMENTAÇÃO

Os recipientes utilizados podem ser abertos ou fechados, geralmente cilíndricos, com altura igual a duas vezes o diâmetro, em média. Podem ser utilizados recipientes com refrigeração interna por meio de serpentinas, outros com refrigeração externa e, esporadicamente, recipientes sem refrigeração. Seu volume é variável, porém, tecnicamente, recomenda-se que sejam harmônicas com a capacidade do aparelho de destilação. Na prática, têm-se revelado convenientes volumes de duas a duas e meia vezes à capacidade horária de destilação.

Com base na riqueza em álcool dos vinhos (normalmente 7,5% em volume), torna-se fácil calcular o volume necessário para os recipientes de fermentação. Este varia em função do sistema de fermentação adotado. Para o sistema de recuperação de leveduras, um volume de dornas total na proporção de 1:12 em relação ao álcool produzido pode ser utilizado, enquanto que para o sistema clássico e de cortes, a relação é de 1:24.

As dornas distribuem-se e assentam-se de forma a permitir acesso fácil para reparos, substituições, modificações e higiene (ALMEIDA LIMA et al, 1985).

3.17 - LEVEDURAS

As leveduras constituem um grupo de microrganismos unicelulares, que se reproduzem assexuadamente por brotamento ou por cissiparidade e que desenvolvem a fermentação alcoólica. O conceito de levedura, aqui apresentado é muito vago e admite inúmeras exceções, uma vez que o grupo é constituído de formas primitivas de fungos. São largamente encontradas na natureza, sendo comuns no solo, na superfícies de órgãos de vegetais, principalmente em flores e frutos, no trato intestinal de animais, em líquidos açucarados e numa grande série de outros locais.

Industrialmente, apresentam grande importância sob vários aspectos:

- são agentes de fermentação alcoólica, na produção do álcool industrial e de todas as bebidas alcoólicas destiladas ou não destiladas;
- são utilizadas na panificação;
- são, pelo menos potencialmente, importantes fontes de proteína e de fatores de crescimento, passíveis de serem utilizadas na alimentação animal e, mesmo, humana;
- como agentes de fermentação são prejudiciais à conservação de frutos e de sucos vegetais;
- algumas espécies são patogênicas a plantas, animais e ao homem.

3.17.1 - Morfologia e Estrutura das Leveduras

As leveduras são geralmente unicelulares. *Saccharomyces cerevisiae* e outras leveduras comuns apresentam forma oval ou cilíndrica. Outras formas encontradas no grupo são: apiculada ou em forma de limão, esféricas (*Torulopsis*), elípticas, elipsóides ou filamentosas (pseudo-micélios constituídos por células unidas entre si).

As células vegetativas da maioria das leveduras industriais variam em tamanho, de 4 a 8 micras de largura por 7 a 12 micras de comprimento, havendo, evidentemente, espécies maiores e espécies menores que as citadas. Forma e tamanho das células, mesmo em espécies monomorfas, podem variar de acordo com o nutriente, as condições ambientais, o estado fisiológico ou a idade.

As leveduras apresentam membrana celular bem definida, pouco espessa, em células jovens; rígidas em células adultas, de constituição variável, com predominância de hidratos de carbono e menor quantidade de proteínas e graxas. Internamente, delimitando o citoplasma, existe a membrana citoplasmática, mais evidente em células adultas, por plasmólise. No geral, as leveduras se apresentam sem cápsula, se bem que algumas espécies de *Torulopsis* se apresentem com cápsula, constituída de hidratos de carbono.

O Citoplasma de células adultas apresenta inúmeros vacúolos e granulações variadas. Entre estas, são encontradas:

- a) Grânulos metacromáticos, constituídos de polimetáfosfato inorgânicos, e de função em parte conhecida;

- b) Glicogênio, hidratos de carbono encontrado em células adultas.
- c) Grânulos lipídicos, em quantidade variável com a espécie de levedura, a idade da célula e o substrato.
- d) Mitocôndrios - se apresentam com aspecto filamentosos, constituídos de lipoproteínas com pequena quantidade de ácido ribonucléico, e contendo enzimas respiratórias

O núcleo é bem definido, pelo menos em células em vias de reprodução; pequeno, esférico ou reniforme, de localização variável, associado a vacúolo nuclear.

As leveduras se multiplicam por brotamento, processo pelo qual na superfície da célula adulta (célula mãe) desenvolve-se uma pequena saliência (célula-filha) que se transformará numa nova célula.

Alguns gêneros e espécies se dividem por cissiparidade semelhante às bactérias. Encontramos algumas leveduras que foram blastosporos, pequenos esporos formados na extremidade de um esterigma, ou ainda artrósporos, formado pela fissão de uma célula em vários pontos (Figura 3.2).



Reprodução Assexuada

Figura 3.2 - Reprodução das células por cissiparidade.

As leveduras se reproduzem assexuadamente por esporos endógenos (Ascósporos), contido no interior da célula-mãe, agora transformada em asca. Os ascósporos são geralmente em número de 4 a 8, variando de acordo com a espécie envolvida: são esféricos em *Saccharomyces cerevisiae*, anelados (anel de Saturno) em *Hansenula saturnus* alongadas com flagelos em *Nematospora*, etc (Figura 3.3).

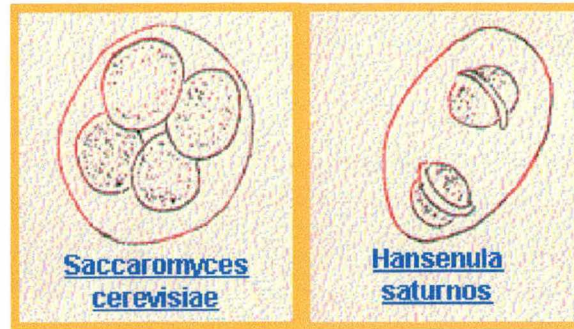


Figura 3.3 - Reprodução de leveduras por esporos endógenos.

3.17.2 - Ciclo Vital

Os fungos, na sua fase vegetativa, a de maior duração, são geralmente haplóides; a fase diplóide, compreendida entre a cariogamia e a meiose é geralmente muito curta. As leveduras, porém, apesar de pertencerem ao grupo dos fungos, comporta-se de maneira variável, a esse respeito, dependendo da espécie envolvida. Entre elas são encontrados vários tipos de ciclo vital, entre os quais são mais comuns os que seguem:

- a) Ciclo com predominância da fase haplóide, encontrado em *Schizosaccharomyces octosporus* (Figura 3.4).

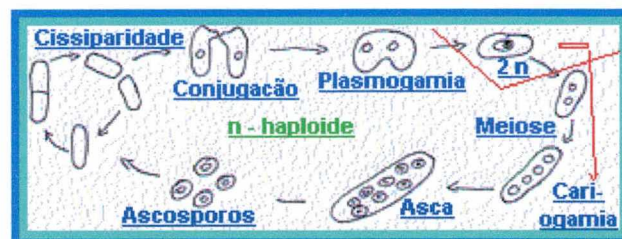


Figura 3.4 - Ciclo da fase haplóide das leveduras.

- b) Ciclo com predominância da fase diplóide, como em *Saccharomyces ludwigii*. Neste caso, a fase vegetativa, reproduzindo-se por brotamento, é constituída de indivíduos diplóides (Figura 3.5)

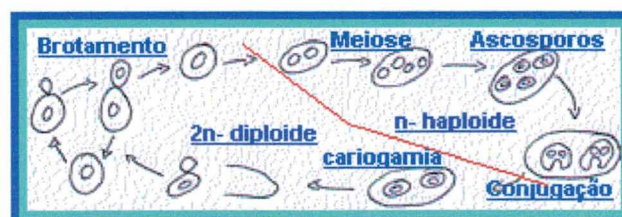


Figura 3.5 - Ciclo da fase diplóide das leveduras.

- c) Ciclo sem predominância de fase haplóide ou diplóide, encontrado em *Saccharomyces cerevisiae*; a reprodução assexuada, por brotamento ocorre tanto em células haplóides como em células diplóides (Figura 3.6)

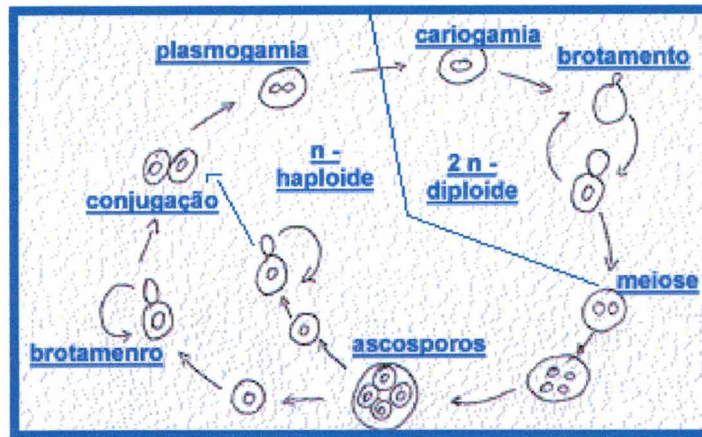


Figura 3.6 - Ciclo sem predominância de fases.

Apresentam maior interesse que os demais, os seguintes gêneros e espécies de leveduras.

- *Saccharomyces cerevisiae*, *S. ellipsoideus* e *S. calbergensis*, agentes normais da fermentação alcoólica.
- *Zygosaccharomyces*, com capacidade de se desenvolverem em líquidos com alta concentração de açúcar. Responsáveis pela deterioração de mel, melaço e xaropes.
- *Endomyces vernalis*, utilizável na síntese de produtos graxos.
- *Endomyces fiberliger*, levedura capaz de produzir amilase.
- *Schizosaccharomyces*, muito comum na superfícies de frutos, no solo, no bagaço e em substratos.
- *Picchia*, *Hansenula* e *Debaryomyces* responsáveis pela formação de filme na superfície de líquidos de origem vegetal, ácidos.
- *Saccharomyces*, leveduras apiculadas, indesejáveis na fermentação da uva para produção de vinho.

3.17.3 - Fermento biológico

Um dos mais fascinantes seres vivos é o fungo unicelular microscópico chamado levedura. Algumas leveduras são cultivadas especificamente para uso no processo de fermentação ou para uso por cientistas em suas pesquisas. A maioria das leveduras, porém, existe como uma parte selvagem do ambiente natural e cresce em plantas e animais ou dispersos pelo ar ou água.

A maioria das leveduras pertence à ordem *Saccharomycetales*, da classe dos *Ascomycetes*. Entre as 350 espécies conhecidas de leveduras a mais comum, *Saccharomyces cerevisiae*, é usada no processo de fermentação para produzir o álcool em vinho e cerveja e o gás carbônico que causam o crescimento do pão. Durante a fermentação, as enzimas das leveduras permitem as células extrair oxigênio de quase qualquer amido ou açúcar para produzir álcool e gás carbônico. As leveduras são ricas em proteínas, sais minerais, carboidratos e vitamina B; por isto também é usada para enriquecer as dietas humanas e animais.

A *Saccharomyces*, como todas as leveduras, vive em colônias de células. Dependendo da quantidade de alimento disponível em seu ambiente, a levedura pode existir como uma célula diplóide (com dois jogos de cromossomos) ou como uma célula haplóide (com um jogo de cromossomos). Há dois processos de divisão da célula básicos associados com estas fases: mitose e meiose.

A mitose acontece quando há bastante alimento disponível. A célula diplóide duplica seus dois jogos de cromossomos e faz a célula temporariamente quadriploide (quatro jogos de cromossomos) e faz crescer um broto. O broto contém um jogo duplo de cromossomos e ainda cresce como uma célula independente presa à célula mãe e eventualmente separa-se deixando uma cicatriz onde os brotos aconteceram. Uma célula que não tem mais nenhuma área sem cicatrizes por onde possa ocorrer o brotamento eventualmente morre. Os brotos podem acontecer continuamente contanto que haja alimento disponível. Assim cadeias e agrupamentos dos minúsculos organismos transformam-se em colônias.

Durante condições de fome a célula diplóide de levedura divide-se através de meiose. A meiose começa com a duplicação de cromossomos e forma uma célula quadriploide temporária. Os dois jogos migram a extremidades opostas da célula e dividem-se novamente resultando em quatro células haplóides minúsculas, cada com um

único jogo de cromossomos. Os haplóides, com gêneros distintos “a” e “α” desenvolvem-se dentro da célula mãe, cercadas por uma camada espessa de açúcar. Neste estado eles podem suportar a falta de alimento. Assim que o alimento está disponível, as células estouram da célula mãe como haplóides individuais, ou esporos. Eles podem reproduzir-se mitoticamente ou podem reproduzir-se sexualmente por fusão. A divisão mitótica neste momento resulta só em mais haplóides.

Uma fase extraordinária de reprodução da célula de levedura envolve a fusão de duas células haplóides. Quando um célula de haplóide α-sexuada está pronta para reproduzir, emite um sinal hormonal. Uma célula assexuada que esteja perto responde imediatamente transformando-se em uma forma pegajosa de pêra e secretando um hormônio diferente que também induz a célula α a ficar pegajosa e na forma de pêra. As duas células estendem-se uma para a outra e fundem-se. Seus núcleos fundem-se e resultam em uma célula diplóide. A partir daí, continua o ciclo haplóide-diplóide. Por causa de seu crescimento extremamente rápido, por seus valiosos subprodutos e pela habilidade de seus cromossomos sofrerem mudanças semelhante aos cromossomos humanos, as leveduras são muito importantes aos cientistas. São usadas leveduras para decompor dejetos e ajudar a limpar derramamentos de óleo e outros poluentes. Pesquisadores estão tentando fazer leveduras aumentar a produção de álcool de grãos para produzir etanol (álcool de grão) que é usado como um combustível. Leveduras são usadas como uma cultura para cultivar bactérias específicas em pesquisas em hepatites e na produção de interferon, uma proteína importante para a pesquisa de cura do câncer. Leveduras são particularmente úteis em análise e mapeamento de genes.

Cada levedura pode expressar toda sua potencialidade somente em um substrato ideal. O trabalho do técnico é o de criar as condições ideais, dando ao mosto bioestimuladores de vários tipos, adaptados a cada caso, evitando assim parada nas fermentações e, a nível de análises sensoriais nos vinhos a melhora é surpreendente (ROSIER, 2000).

Para o desenvolvimento das leveduras são utilizados biorreatores dos mais diversos tipos e modelos, conforme as culturas que se quer desenvolver.

3.18 - BIORREATORES

Os biorreatores podem ser mais ou menos elaborados, conforme o tipo de cultura a que são destinados. Num biorreator, a produção de biomassa ou de metabólitos deve ser realizada com ênfase máxima na segurança e confiabilidade do processo, com um custo mínimo de investimento e operação. Segurança é mais difícil de se conseguir em um processo microbiológico do que em um processo químico, desta forma, os biorreatores são mais caros de se projetar e construir do que os reatores químicos.

A microbiologia deve ser o foco das considerações quando se quer construir um sistema fermentativo. Durante o planejamento do fermentador deve-se decidir se o fermentador será usado em um processo especial para um organismo específico ou para uma variedade de processos com diferentes microrganismos.

Em geral emprega-se o vidro na construção dos biorreatores menores usados para experimentos em laboratório, e o aço inoxidável em biorreatores de maior capacidade. Alguns cuidados devem ser tomados em relação a soldabilidade do aço inoxidável com alto teor de carbono, pois estes são de difícil soldadura. As soldaduras representam um risco potencialmente elevado em instalações de fermentação. As soldaduras de má qualidade podem ser porosas e ásperas, podendo dar origem a contaminações graves e difíceis de serem descobertas.

O primeiro processo fermentativo em escala industrial na indústria farmacêutica, a produção da penicilina, foi desenvolvida em biorreator de tanque agitado. Devido ao alto custo dos biorreatores, a indústria de fermentação prefere modificar os modelos existentes, como por exemplo, mudando o tipo de agitador, do que introduzir um biorreator completamente novo. Além disso, a aplicação de um mesmo biorreator para diferentes processos proporciona uma grande flexibilidade para o fabricante. Esta é a razão porque o tanque agitado é frequentemente a primeira escolha quando um novo processo é desenvolvido. Porém quando existe uma limitação do processo, como por exemplo à necessidade de uma maior transferência de massa gás-líquido, outros tipos de biorreator, tais como os biorreatores *airlift*, são considerados (PEDRINI, 1997).

3.19 - BIORREATORES AIRLIFT

Reatores *airlift* são reatores pneumáticos, diferentes de outro tipo de reator pneumático normalmente usado, o de coluna de bolhas, sendo que estes reatores se dividem em duas zonas de escoamento (uma direcionada para cima e outra direcionada para baixo). As zonas ou canais possibilitam a circulação de líquido em grande escala ao redor do corpo do reator.

A primeira zona de expansão do gás é denominada *riser*, onde o gás é injetado pela base do equipamento através de um distribuidor formando uma dispersão gás-líquido. As bolhas de gás sobem através do líquido contido no tanque contatando-o e deslocando-o. Essa seção tem maior *gas holdup* (fração volumétrica de gás na dispersão) e é onde a transferência de massa é mais significativa. O líquido deixa o topo do *riser* e entra na zona de desprendimento do gás (separador de gás) onde, dependendo do seu desenho específico, maior ou menor quantidade de gás é removida. O líquido, com uma menor quantidade de gás, escoo através do *downcomer*, move-se para o fundo do reator até a base do mesmo e retorna ao *riser*. Assim, a fase líquida circula continuamente no reator.

Apesar de manter algumas características das colunas de bolhas convencionais, a circulação do líquido em grande escala exibida por estes reatores possuem características únicas. A circulação é um efeito causado pela diferença de *gas holdup* entre o *riser* e o *downcomer*. Por sua vez, isto cria uma diferença de pressão entre a base do *riser* e a base do *downcomer* a qual atua como força motriz para a circulação do fluido.

Os *airlifts* são normalmente divididos em dois tipos de reatores, baseados em sua estrutura física. Os *airlift* com circulação interna são tanques divididos, sendo que estas divisões são colocadas dentro da coluna de bolhas para criar zonas de escoamento distintas. Isto pode ser conseguido mediante a inserção de um tubo central separando as zonas de subida e descida das correntes (*airlift* com tubos concêntricos). Nos *airlift* com circulação externa o *riser* e o *downcomer* são conectados por seções horizontais perto do topo e da base do reator para criar a recirculação de líquido.

A principal diferença entre o *airlift* de circulação interna e externa é o desenho do separador de gás. Nos de circulação interna o separador é normalmente uma extensão sem obstáculos sobre o *riser* e o *downcomer*, o que permite pouco desprendimento do gás. Nos

de circulação externa, pode existir uma região de escoamento horizontal que permite o desprendimento total de gás, que segundo o seu grau de desprendimento, tem grande influência no comportamento geral do reator.

Como a força motriz da circulação de líquido é a diferença de densidade média ou da pressão hidrostática entre as seções do *riser* e do *downcomer*, no caso da circulação externa, onde existe um desprendimento quase total do gás no separador horizontal, a velocidade de circulação do líquido é mais alta. Conseqüentemente, o *gas holdup* é menor devido à alta circulação de líquido no *riser*, o que resulta numa menor transferência de massa.

3.19.1 - Vantagens dos Reatores *Airlift*

Tradicionalmente, o reator químico de tanque agitado (STR) tem sido aplicado como biorreator para fermentações aeróbicas. Entretanto este tipo de reator não é o mais adequado para o cultivo de microrganismos. Os reatores pneumaticamente agitados, como o *airlift* e colunas de bolhas, oferecem muitas vantagens em relação ao tanque agitado clássico.

A primeira vantagem é a simples construção, pois a sua manutenção é fácil e barata. Como não há partes mecânicas móveis necessárias para agitação, há redução do perigo de contaminação, pois facilita a limpeza e esterilização. A injeção do gás serve para duas funções, aeração e agitação, eliminando o gasto adicional de energia para a agitação e promovendo um aumento na capacidade de transferência de massa e calor.

Em processos biológicos, uma outra vantagem do *airlift* sobre a coluna de bolhas e os reatores de tanque agitado é relacionada à força de cisalhamento imposta pelo campo turbulento nas células ou “pellets” (no caso de fungos) suspensos no meio. O grau de agitação requerido para a transferência de oxigênio causa, em muitos casos, danos aos microrganismos devido ao alto grau de cisalhamento do agitador (STR) e aerador (coluna de bolhas). Uma região de alto cisalhamento existe perto do agitador ou aerador, o qual decresce com o aumento da distância dos mesmos. A falta de uniformidade na área de cisalhamento expõe os microrganismos a uma variação de meio ambiente e de áreas de *stress* o qual pode afetá-los adversamente. Numerosos estudos tem sido conduzidos investigando os efeitos do cisalhamento nos microrganismos e células no esforço de quantificar o nível de variação do grau de cisalhamento que os microrganismos poderão

tolerar (MERCHUK, 1991). Além disso, a energia mecânica necessária para realizar a transferência de massa em STR é elevada e antieconômica, sendo também dissipada no fluido na forma de calor, que precisa ser removido para o controle de temperatura.

O campo de cisalhamento no *airlift* é homogêneo, o qual é relativamente constante através do reator. Além do mais, há total direcionalidade do escoamento do líquido, mesmo que movimentos randômicos possam ser sobrepostos no mesmo.

Um fluxo menos turbulento parece ter um efeito positivo na produção de células sensíveis ao cisalhamento. Um estudo feito por KESSLER *et al* (1993) mostrou que, mesmo em meio altamente viscoso, pode ser vantajoso o processo em biorreatores *airlift*. Estes autores relataram que a produtividade em seus experimentos foi muito boa em comparação com valores publicados anteriormente obtidos em outros tipos de biorreatores.

Uma característica desejada em um fermentador aerado é que este promova uma boa homogeneização do meio fermentativo e favoreça a transferência de massa entre as bolhas de gás e o meio de cultura líquido. Porém, alguns processos fermentativos, como os de produção de biomassa protéica (SCP) são normalmente realizados em fermentadores de tamanho considerável (20-2000 m³), sendo portanto os custos de agitação importantes para a viabilidade do processo. MALFAIT *et al* (1981) obtiveram um aumento superior a 18% (em peso) na produção do fungo *Monascus purpureus* em um *airlift* com circulação externa (0,055 m³ de volume e com diâmetro do *riser* de 0,15m e diâmetro do *downcomer* de 0,05 m) em relação à produção em um reator de tanque agitado (0,100 m³ de volume, operado a um fluxo de ar de 1 vvm, turbina 3-standard (6-bladed) operada a 300 rpm, com 3-4 kWm⁻³ de potência de agitação). Esta melhora no rendimento foi obtida com a redução de 50% na energia colocada (*power input*) levando a uma redução superior a 50% no custo da produção da biomassa. O aumento da produtividade em reatores *airlift* em relação ao reator de tanque agitado foi associado ao alto coeficiente de transferência de massa obtido no *airlift* (MALFAIT *et al*, 1981). Apesar de não ter sido mencionado, como foi dito anteriormente, possíveis danos nas células devido ao cisalhamento podem ter contribuído com a menor performance nos reatores de tanque agitado.

Os trabalhos realizados vêm confirmando que os fermentadores do tipo *airlift* (coluna de bolhas com recirculação) e suas variações (*loop reactors*), são os mais adequados para o processo de produção de proteínas, onde há a necessidade de uma alta eficiência na transferência de massa. Além da produção de proteína, o uso dos fermentadores do tipo *airlift* na produção de fungos filamentosos e outras células sensíveis

ao cisalhamento tem obtido bons resultados (MALFAIT *et al.*, 1981; KOENIG *et al.*, 1981; MARKL *et al.*, 1987; ERLKSON *et al.*, 1983; KESSLER *et al.*, 1993).

Essencialmente, os fermentadores *airlift* com circulação externa consistem em duas colunas em paralelo (*riser* e *downcomer*) as quais são conectadas no topo e no fundo. Usualmente as duas colunas possuem diferentes diâmetros; uma delas com maior diâmetro o qual será injetado o gás no fundo e serve como *riser*, e a outra será o *downcomer*. As propriedades características dos reatores *airlift* com circulação externa são: 1) retirada do gás dissolvido no topo do reator (isto impede a acumulação de CO₂ no meio de fermentação); 2) inexistência de zonas de fluxo irregular no topo e no fundo do fermentador; 3) fácil remoção de calor do fermentador através da instalação de um trocador de calor no *downcomer*; 4) fácil medida e controle da velocidade do líquido no *downcomer* sem as complicações devido à concentração de gás.

3.19.2 - Aplicações dos Reatores *Airlift*

KAWASE (1990) desenvolveu um modelo simples para prever a velocidade do líquido em biorreatores *airlift* com circulação externa. Correlações teóricas para o fator de fricção de gases não-Newtonianos e para a velocidade do líquido no *riser* foram derivadas utilizando conceitos de difusividade turbulenta (*eddy diffusivity*). O modelo teórico foi comparado com dados experimentais obtidos para o fator de fricção e velocidade do líquido, obtendo um bom fator de correlação.

GODÓ *et al.* (1999) analisaram a influência do tamanho das bolhas de ar injetadas dentro do reator *airlift* e a correspondente transferência de oxigênio para o meio de cultura. Quanto menor for o tamanho das bolhas, maior é a transferência de oxigênio. Pelas experiências realizadas mostra-se que uma das formas de aumentar esta transferência de oxigênio é efetuando mudanças periódicas no fluxo de ar que é injetado dentro do reator, o que provoca uma mudança na velocidade de circulação do gás-líquido.

CHEN *et al.* (1987) desenvolveram um reator *airlift* que utiliza sopradores de ar a baixa pressão para manter e agitar o meio de cultura. As bolhas de ar são mantidas em contato com o caldo de fermentação durante um espaço de tempo maior, obtendo uma melhor transferência de oxigênio para a manutenção do meio de cultura. Desta forma, consegue-se uma economia de energia para a manutenção, agitação e aquecimento das células do *airlift*.

NICOLELLA *et al.* (1998) utilizaram um reator de circulação interna com biofilme suspenso, trifásico, para apresentar uma nova aproximação para a determinação dos coeficientes de transferência de massa em sistemas trifásicos utilizando biofilmes sob condições de reação. O método está baseado na análise do consumo de oxigênio no biofilme em suspensão e no monitoramento do oxigênio biologicamente consumido no sistema, permitindo uma estimativa independente da transferência de massa entre o gás e o líquido e entre líquido e sólido e a taxa de reação do biofilme. A influência de alguns parâmetros de operação (quantidade de sólidos, tamanho das partículas e taxa de fluxo de gás) foram analisados e uma correlação para determinar o coeficiente de transferência de massa foi proposto.

SHAMLOU *et al.* (1995) propuseram um modelo para a predição do coeficiente volumétrico de transferência de massa ($K_L a$) em um reator *airlift* com tubos concêntricos. Os resultados obtidos indicam que o $K_L a$ é fortemente influenciado pela velocidade do gás, pelo gás ascendente (*hold-up*), pela velocidade de circulação do gás, pelo diâmetro das bolhas e pela velocidade das bolhas no *riser*. Através da fermentação de *Saccharomyces cerevisiae*, foram obtidas medidas do coeficiente de transferência de massa como uma função da velocidade superficial do gás e comparadas aos dados obtidos no modelo proposto.

RUSSEL *et al.* (1994) utilizaram a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em um fermentador *airlift* para obter dados de velocidade de circulação, velocidade de ascensão e mistura do líquido sob variadas condições de fluxo de gás, altura do *raiser* e altura do topo. Tanto a velocidade de circulação do líquido e o tempo de mistura aumentam com a altura do *raiser*, enquanto que a altura do topo influencia a mistura do líquido.

SIEGEL & MERCHUK (1991) realizaram experimentos em reatores *airlift* com diferentes volumes líquidos e configurações do separador gás-líquido. Dependendo da configuração do separador, o modo de operação pode ser mudado de um reator de tubo concêntrico com recirculação de gás para um reator com circulação externa sem recirculação de gás. Correlações para a velocidade do líquido no *downcomer*, tempo de circulação e gás *hold-up* foram desenvolvidas como função da força de entrada do gás por unidade de volume líquido e "Disengagement Ratio".

FREITAS *et al.* (2000) analisaram a influência do efeito do diâmetro do orifício do dispersor do gás, da taxa do fluxo de ar, da quantidade de sólidos suspensos e da densidade dos sólidos nas características hidrodinâmicas - gás holdup (fluxo ascendente do gás),

tempo de circulação e velocidade do líquido – em um reator *airlift* trifásico com circulação externa. Foi observado que o distribuidor de gás tem um efeito pequeno na ascensão do gás no *raiser*, no tempo de circulação e na velocidade do líquido no *downcomer*. Por outro lado, a taxa do fluxo de ar, a quantidade de sólidos suspensos e a densidade dos sólidos tem uma influência significativa nas características hidrodinâmicas do reator. Um modelo previamente descrito foi utilizado para calcular o fluxo ascendente de gás através do *riser* e a velocidade do líquido no *downcomer* simultaneamente, apresentando resultados satisfatórios.

GRAVILESCU & TUDOSE (1999) analisaram a distribuição do tempo de residência da fase líquida em um reator *airlift* com circulação interna. Os resultados experimentais revelaram que o reator *airlift* utilizado teve um fluxo mais uniforme que o reator de coluna tubular e de bolhas. Estas conclusões podem ter uma grande importância prática, especialmente, nas aplicações biotecnológicas dos reatores *airlift*, onde as culturas aeróbias podem ser facilmente afetadas por fluxos de gás deficientes.

ALLEN & ROBINSON (1991) determinaram a taxa de cisalhamento em biorreatores *airlift* e de bolhas, devido à importância deste parâmetro na destruição das células e na correlação de parâmetros hidrodinâmicos em fluidos não-Newtonianos. Esta taxa de cisalhamento pode ser utilizada para avaliar a viscosidade efetiva dos fluido não-Newtonianos, que por sua vez, pode ser utilizada para prever o comportamento reológico dos fluidos. Esta aproximação, aplicada em biorreator de bolhas, também pode ser aplicada em reatores *airlift* com circulação externa, substituindo-se a velocidade do gás superficial pela velocidade do gás no *riser*.

ASSA & BAR (1991) determinaram o grau de homogeneidade de biomassa nas várias partes de um biorreator *airlift* de circulação interna. Foi determinado que ocorre uma acumulação gradual de sólidos no fundo do *downcomer* e do *raiser*, de modo que o local mais representativo em termos de concentração de biomassa está localizada na parte mediana do biorreator.

SIEDENBERG *et al.* (1997) compararam o cultivo de *Aspergillus awamori* em reatores em batelada agitados e em reatores *airlift* com circulação externa, utilizando um meio de cultivo complexo formado por farelo de trigo e de soja. No reator *airlift* com circulação externa, filamentos de mycelium foram formados devido à baixa quantidade de energia fornecida. Apesar da alta viscosidade média, foi obtida boa produtividade de xylanase.

ALEKSIEVA & PEEVA (2000) compararam a produção de proteinase ácida pelo fungo filamentoso *Humicola lutea* em um biorreator *airlift* em condições contínuas e em batelada com a produção de proteinase utilizando células do fungo, cultivados em um biorreator de tanque agitado. O desempenho do processo em ambos os dispositivos de fermentação foi semelhante com respeito à utilização de substrato, biomassa, e concentração de enzima. A produtividade alcançada no biorreator *airlift* em condições contínuas foi aproximadamente 3 vezes mais alto que no sistema em batelada.

AL-QODAH & LAFI (2001) desenvolveram um modelo matemático para descrever o desempenho de um reator *airlift* de três estágios utilizando um campo magnético transversal. O modelo foi baseado em um reator de mistura completa e na cinética de Michaelis–Menten. As equações foram resolvidas pelo método de diferenças finitas utilizando condições de regime estacionário e transiente. Os resultados da simulação numérica indicaram que o campo magnético aumenta o grau de bioconversão. O modelo matemático foi verificado experimentalmente em um reator *airlift* de três estágios utilizando *P. chrysogenum* imobilizado em leitos magnéticos.

SANDERS & HUDSON (2000) descreveram uma abordagem específica de um sistema especialista para simular e automatizar reatores *airlift* de alta recirculação. Foram desenvolvidos dois programas protótipos para testar a viabilidade de uma arquitetura abordando sistemas especializados para biorreatores. A aplicação dos dois programas conduziu à criação de um sistema especialista novo que interagiu com programas de projeção industriais. A pesquisa descreveu linhas para reduzir os custos na construção e operação de reatores *airlift* de alta circulação.

HUANG *et al* (2001) desenvolveram uma estratégia de aeração para o controle de espuma em um reator *airlift* com malha de tela dupla. O reator *airlift* foi empregado no cultivo de *Bacillus thuringiensis* para produção de thuringiensin. A produção de thuringiensin baseado na estratégia proposta produziu uma quantidade 70% maior que o método de cultivo convencional com adição de agentes de antiespumantes para controle de espuma.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - BIORREATOR

No presente trabalho foi utilizado um biorreator *airlift* com circulação externa construído de vidro existente no laboratório de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. O biorreator tem um volume de 6,5 litros e razões entre as áreas das seções transversais entre o *downcomer* e o *riser* de 0,14 e comprimento da conexão entre o *riser* e o *downcomer* de 0,20 m. Um desenho esquemático do reator está demonstrado na Figura 4.1

4.2 - MICRORGANISMO

O microorganismo utilizado para a análise no biorreator de circulação externa foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e o meio de cultura foi a própria biomassa da uva (mosto), ao qual foi adicionado um composto pectolítico enzimático.

O mosto utilizado foi obtido através da moagem da uva da variedade Niágara, pré-clarificado por decantação e, após a adição de 0,2 g/l de Metabissulfito de Potássio, armazenado em câmara frigorífica a uma temperatura de $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 dias,

A análise do desenvolvimento das células foi iniciada através da inoculação dos microrganismos no mosto contido no biorreator aerado. Os testes realizados tiveram duração de 6, 8, 9 e 24 horas, com coleta de amostras a cada hora para a análise do desenvolvimento dos microrganismos.

A fase seguinte da fermentação alcoólica foi em regime anaeróbio com acompanhamento constante através de análises químicas e físicas do produto até o total desdobramento dos açúcares.

O vinho, produto final, também foi avaliado através de análises químicas e sensoriais.

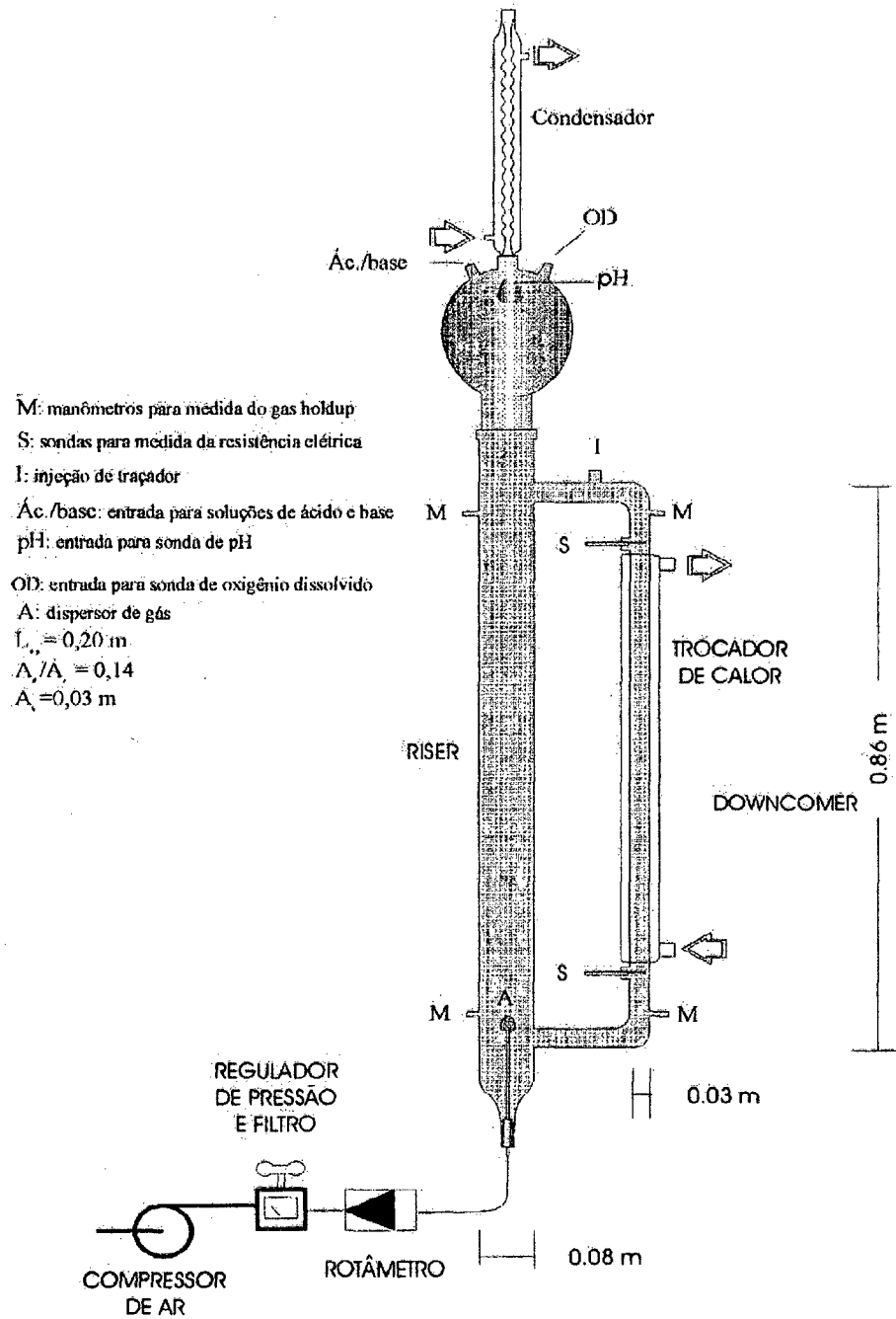


Figura 4.1 - Esquema do reator *airlift*.

Fonte: PEDRINI, 1997.

4.3 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR

A concentração celular durante as fermentações foi determinada por dois métodos: indiretamente por turbidimetria e diretamente por gravimetria.

A determinação gravimétrica da concentração celular expressa como massa de material seco por unidade de volume, se caracteriza em uma das formas mais adequadas de se avaliar uma fermentação, sendo utilizada para confirmar os resultados obtidos pela medida da absorbância.

As medidas de absorbância foram realizadas a um comprimento de onda $\lambda = 550$ nm (após análise da melhor faixa de absorção do fermentado) em espectrofotômetro (modelo E225-D, marca CELM) e convertidas em concentração celular (massa de matéria seca por unidade de volume), através do uso de uma curva de calibração. O procedimento para a construção desta curva é da seguinte forma:

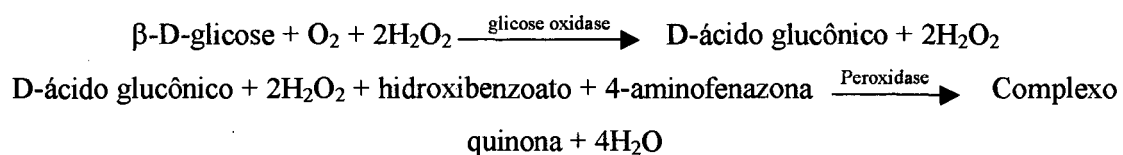
- 50 mL da cultura da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, coletados no final da fermentação, foram filtrados em filtro Millipore com membrana de $0,45 \mu\text{m}$ previamente seca em estufa a 105°C . Após secagem até peso constante (24 h a 105°C), a biomassa é determinada pela diferença de peso seco.
- Aproximadamente 20 mL do fermentado são retirados e realizadas diluições 1:2; 1:4; 1:6; 1:8; e 1:10, lendo-se a absorbância em espectrofotômetro (550 nm).

O peso da amostra obtido após pesagem da membrana dividido pelo volume de filtrado fornece a concentração do número de células. Este valor dividido por cada diluição realizada é a massa seca.

A curva é obtida correlacionando a absorbância com a concentração celular (g/L).

4.4 - AÇÚCARES REDUTORES

O teste usado para a determinação de glicose foi adquirido da empresa “Biodiagnóstica”. O princípio do método “glicose Enz Color” é:



O peróxido de hidrogênio formado reage com a 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase (POD - Doador hidrogênio-peróxidorredutase), através de uma reação oxidativa de acoplamento formando uma antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose na amostra.

Reagentes utilizados

1. Reagente Glicose Enz Color: 0,1 mmol/L 4-aminofenazona, 5 mmol/L hidroxibenzoato, 5.000U/L glicose oxidase, 500 U/L peroxidase em 250 mL de água.
2. Tampão e estabilizador
3. Padrão de glicose: Solução de glicose a 100 mg/dl.

Tabela 4.1 - Procedimento de determinação da glicose.

Soluções	Branco	Padrão	Teste
Reagente cor	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL
Padrão	-	20 µL	-
Amostra (Fermentado)	-	-	20 µL

Homogeneizar suavemente, incubar durante 10 minutos a 37 °C. Ler a absorbância da amostra (A Teste) e da solução padrão (A padrão). A cor é estável por duas horas.

Cálculo

$$\text{mg de glicose por } dL = \frac{A(\text{teste}) * 100}{A(\text{padrao})}$$

As amostras devem ser diluídas, de forma que a concentração se encontre na faixa da curva de calibração.

4.5 - ANÁLISES QUÍMICAS

A análise química é de grande utilidade prática, pois por meio dela podemos determinar a quantidade dos elementos que constituem o vinho. Esta análise também fornece os elementos que permitem julgar o vinho, principalmente no que se refere ao acréscimo de certas substâncias permitidas por lei. Além disto, a análise química é de um valor indiscutível para o estudo das características de uma casta, para verificar a influência e a ação de certos tratamentos executados na vinificação e de outros trabalhos de cantina.

4.5.1 - Álcool

Princípio

°GL é o número de mililitros de álcool etílico absoluto contidos em 100 ml de vinho a 15 °C. Determina-se por destilação simples do líquido alcanizando-o e medindo a densidade do destilado por aerometria.

Material e aparelhos

- aparelho de destilação
- alcoômetro
- termômetro
- proveta de 250 ml
- balão volumétrico de 250 ml

Reagentes

- Solução a 12% de óxido de cálcio (12 gramas de CaO em 100 ml de água), usado para tornar o meio alcalino

Procedimento

Deve-se eliminar previamente o gás carbônico contido nos vinhos jovens ou champanhas, através de um aquecimento.

O procedimento para realizar a destilação é o seguinte:

- medir 250 ml de vinho em um balão volumétrico aferido, anotando a temperatura;
- verter o vinho para o balão de destilação contendo alguns fragmentos de pedra-pome;
- lavar o balão quatro vezes com 5 ml de água destilada;
- acrescentar 10 ml da solução de óxido de cálcio a 12%;
- recolher o destilado no mesmo balão volumétrico inicial contendo 10 ml de água destilada;
- destilar pelo menos 200 ml do volume inicial;
- agitar o balão com a finalidade de homogeneizar o destilado;
- completar o volume inicial do balão com água destilada a mesma temperatura inicial;

- homogeneizar e transferir o destilado para uma proveta para que o alcoômetro possa flutuar livremente. O alcoômetro deverá ser graduado até 1/10 de grau, segundo o sistema Gay-Lussac, aferido a 15 °C. Se a temperatura for diferente de 15 °C, deve-se fazer as devidas correções;
- realizar três leituras do grau alcoólico, utilizando, se necessário, uma lupa;
- o valor obtido será a porcentagem de álcool em volume ou grau Gay-Lussac (GL).

4.5.2 - Massa Específica ou Densidade Relativa

Princípio

Massa específica é a razão entre a massa de um certo volume de vinho ou mosto por seu volume. Expressa-se em gramas por centímetro cúbico. A densidade relativa é a razão entre a massa específica do vinho pela massa específica da água. A massa específica ou densidade relativa de um vinho é determinada à temperatura de 15 °C. Determina-se a massa específica a partir da leitura do aerômetro.

Material e aparelhos

- aerômetro
- termômetro
- proveta cilíndrica de 320 mm de altura e 36 mm de diâmetro.

Aerômetro

O aerômetro utilizado possuía a parte cilíndrica submergível e a haste de seção circular de 3 mm de diâmetro. Para vinhos secos, a graduação é de 0,983 a 1,003 em milésimos. A divisão entre os milésimos é de 5 mm. Neste aparelho a regra é realizar a leitura pela parte superior do menisco.

Procedimento

- colocar na proveta cilíndrica 250 ml do vinho;
- introduzir o aerômetro e o termômetro;
- agitar para uniformizar a temperatura;
- aguardar um minuto e realizar a leitura do termômetro. Corrigir a temperatura se a mesma não estiver a 15 °C;

- realizar a leitura da massa aparente na base do menisco formado na haste do aerômetro.

4.5.3 - Determinação da Acidez Volátil

A acidez volátil é constituída de ácidos graxos pertencentes à série acética que se encontram nos vinhos em estado livre. Determina-se mediante a separação dos ácidos voláteis por arraste com vapor de água e retificando estes vapores. Deve-se evitar como precaução a presença de gás carbônico no destilado. A acidez do anidrido sulfuroso livre e combinado arrastados com o destilado não deve ser considerada na acidez volátil.

Material

- aparelho de destilação Cazenave-Ferré
- bureta de 50 ml
- pipetas de 10 ml e 1,0 ml.
- erlenmeyer de 200 ml

Reagentes

- Hidróxido de sódio N/10
- Indicador - solução alcoólica de fenolftaleína a 1 %.

Procedimento

- Colocar 10 ml da amostra no borbulhador.
- Adicionar água destilada no gerador de vapor do aparelho de destilação Cazenave-Ferré.
- Levar à ebulição com a torneira de vapor aberta, objetivando retirar o ar do interior do aparelho.
- Fechar a torneira forçando a passagem do vapor pelo borbulhador, arrastando assim os ácidos voláteis.
- Recolher 100 ml de destilado.
- Titular a acidez volátil do destilado com solução de hidróxido de sódio N/10 em presença do indicador fenolftaleína.

Cálculo

Seja n o número de ml gastos de hidróxido de sódio na titulação.

$$\text{Acidez volátil expressa em meq/litro} = n \times 10$$

$$\text{Acidez volátil expressa em ácido sulfúrico} = n \times 0,49$$

$$\text{Acidez volátil expressa em ácido acético} = n \times 0,60$$

4.5.4 - Determinação da Acidez Total

Considera-se acidez total de um vinho a soma dos ácidos tituláveis quando se eleva o vinho a pH-7 através da adição de uma solução alcalina titulada. O ácido carbônico, o anidrido sulfuroso livre e o combinado não estão compreendidos na acidez total. Ao determinar a acidez total de um vinho que contenha gás carbônico, deve-se agitar aproximadamente 50 ml da amostra a analisar sob vácuo, a fim de subtrair o CO₂ antes da análise ser iniciada.

Material e aparelhos

- potenciômetro
- agitador magnético
- kitasato
- pipeta de 10 ml
- béquer de 100 ml
- bureta de 50 ml

Reagentes

- Solução de hidróxido de sódio N/10
- Indicador - solução alcoólica de fenolftaleína a 1 %.

Procedimento

- Transferir 10 ml da amostra a analisar para um béquer de 100 ml, contendo 50 ml de água destilada.
- Adicionar 2 ou 3 gotas de fenolftaleína a 1 % (quando não for potenciométrica)
- Titular com solução de hidróxido de sódio N/10 até coloração rósea (ou pH-7 medido potenciometricamente).

Cálculo

Seja n o número de ml gastos de hidróxido de sódio na titulação.

$$\text{Acidez volátil expressa em meq/litro} = n \times 10$$

$$\text{Acidez volátil expressa em ácido tartárico} = n \times 0,75$$

$$\text{Acidez volátil expressa em ácido sulfúrico} = n \times 0,49$$

Fator de conversão

$$\text{Acidez tartárica para sulfúrica} = 0,653 \times \text{acidez tartárica}$$

$$\text{Acidez sulfúrica para tartárica} = 1,530 \times \text{acidez sulfúrica}$$

4.5.5 - Acidez Fixa

Considera-se convencionalmente como acidez fixa a diferença entre a acidez total e a acidez volátil, ambas expressas em uma mesma unidade, geralmente meq/l, seja ela tartárica ou sulfúrica.

4.5.6 - Determinação do Anidrido Sulfuroso Livre

O anidrido sulfuroso livre apresenta uma dupla atividade (antisséptico e antioxidante). A maior parte do SO_2 livre encontra-se no vinho na forma de sais ou bissulfitos. A titulação é realizada por oxidação do SO_2 com iodo, em meio ácido.

Material

- erlenmeyer de 200 ml
- pipeta de 25 ml de duplo aferimento
- pipeta de 2,5 ml de segurança
- bureta de 50ml

Reagentes

- Solução de ácido sulfúrico a 1/3 (duas partes de água e uma de ácido sulfúrico)
- Solução de iodo N/50
- Solução de amido a 1% (Amassar 10 g de amido para análise em 150 ml de água destilada e acrescentar 850 ml de água fervente. Deixar ferver durante 5 minutos).

Procedimento

- Colocar 25 ml de vinho, 2,5 ml de ácido sulfúrico a 1/3 e 1 ml da solução de amido a 1% em um erlenmeyer de 200 ml.
- Titular rapidamente com a solução de iodo N/50, agitando constantemente até o aparecimento de coloração azul intenso.

Cálculo

$$\text{Anidrido sulfuroso Livre (mg/litro)} = n \times 25,6$$

onde n é o número de mililitros gastos de iodo N/50 na titulação.

4.5.7 - Determinação dos Açúcares Redutores (método Fehling)

À temperatura de ebulição, os produtos de resinificação dos açúcares redutores, em meio alcalino, são oxidados pelo cobre do licor de Fehling, no qual o mesmo se encontra formando um complexo (cupro-tartárico-sódico-potássico).

Os resultados obtidos pela utilização deste método variam de acordo com a concentração dos açúcares na amostra e o tempo de análise. A concentração dos açúcares não deve ser superior a 10%, caso contrário, deve-se proceder uma diluição da amostra. O tempo de análise é variável conforme o açúcar a ser determinado. Para determinação da glicose e frutose, este tempo é de no máximo 3 minutos de ebulição da amostra.

Função do licor de Fehling

Os aldeídos aquecidos com o reativo de Fehling formam um precipitado vermelho-tijolo do óxido de cobre. O processo consiste na redução do cobre trivalente a cobre bivalente pelo aldeído oxidado a ácido. A função do sal de Saignette é manter os íons cobre bivalente na presença dos íons hidroxila sem haver precipitação do hidróxido de cobre.

Material

- bureta de 25 ml
- erlenmeyer de 250 ml
- pipetas volumétricas de 5, 10, 20 e 50 ml
- pipeta graduada de 10 ml
- pinça (tipo tenaz)
- funil de \pm 15 cm de diâmetro e papel filtro.

Reagentes

- Fehling A: 69,27 g de sulfato de cobre (CuSO₄) dissolvido em água destilada até completar 1000 ml à temperatura de 20 °C.
- Fehling B: 346 gramas de sal de Saignette e 100g de hidróxido de sódio dissolvidos em água destilada até completar 1000 ml à temperatura de 20 °C.
- Solução de azul de metileno a 1%.

Depuração dos vinhos

- tomar 100 ml de vinho e acrescentar de 0,5 a 2 gramas de carvão descorante;
- homogeneizar e deixar em repouso durante cinco minutos;
- filtrar a mistura.

Para vinhos brancos diminui-se a quantidade de carvão. Deve-se usar quantidades moderadas de carvão na descoloração, pois este retém porcentagens consideráveis de açúcares.

Procedimento (Titulação)

- Encher uma bureta com o vinho diluído e descorado a titular.
- Em um erlenmeyer de 250 ml colocar 40 ml de água destilada, 5 ml de Fehling A e 5 ml de Fehling B.
- Levar o erlenmeyer à chama. Após o início da ebulição, esperar um minuto.
- Titular com o vinho diluído até desaparecer a coloração azul do sulfato de cobre.
- Adicionar 3 gotas de azul de metileno;
- Titular até coloração vermelho-tijolo.

O tempo total de titulação é de aproximadamente 3 minutos, sendo que do início da titulação até a adição do azul de metileno é necessário 1 minuto e da adição do indicador até o final da titulação mais dois minutos.

$$g/L = \frac{50 \times \text{diluições}}{\text{ml da amostra usados na titulação}}$$

A análise deve ser realizada em duplicata quando se desejar uma maior precisão dos resultados obtidos.

4.5.8 - Determinação da Sacarose (método Fehling)

Material

- balão volumétrico de 100 ml
- banho-maria
- pipeta volumétrica de 20 ml
- termômetro

Reagentes

- ácido clorídrico concentrado
- hidróxido de sódio concentrado
- ácido acético glacial
- solução alcoólica de fenolftaleína a 1%.

Procedimento

- Diluir conforme a concentração de açúcares.
- Para uma diluição de 5 vezes, transferir 20 ml da amostra clarificada para um balão volumétrico de 100 ml. Adicionar 3 gotas de ácido clorídrico concentrado e levar a temperatura aproximada de 67 °C em banho-maria.
- Deixar resfriar à temperatura ambiente
- Neutralizar com hidróxido de sódio, usando como indicador umas gotas da solução alcoólica de fenolftaleína a 1 %
- Reacidificar a amostra com ácido acético glacial.
- Completar o volume do balão volumétrico com água destilada.
- Titular a amostra assim preparada da mesma maneira que a titulação dos açúcares redutores.

Cálculo

O resultado é expresso em gramas por litro, segundo a fórmula abaixo. Do resultado obtido diminuem-se os açúcares redutores.

$$\text{g/L} = \frac{50 \times \text{diluições}}{\text{ml da amostra usados na titulação}}$$

4.5.9 - Determinação dos Metais Pesados

O ferro provoca no vinho a chamada casse fêrrica, também conhecida por casse azul. Os vinhos brancos adquirem coloração verde café escura até preto-violácea. Os vinhos tintos enegrecem sensivelmente. Segundo Malvezin há probabilidades de casse fêrrica quando o vinho contém mais de 20 mg de ferro por litro.

O tratamento dos vinhos com ferrocianeto de potássio foi recomendado por Mòslinger em 1922. No entanto, é necessário destacar que a nossa legislação só permite o uso desta substância ao enólogo ou químico autorizado pelo Ministério da Agricultura.

O ferrocianeto forma com certos metais, como o ferro, cobre e zinco, compostos insolúveis, permitindo desta maneira sua eliminação do vinho, motivo pelo qual constitui um tratamento eficaz na prevenção dos enturvamentos fêrricos e cuprosos dos vinhos.

A aplicação deste tratamento exige certas precauções, porque, se a quantidade de ferrocianeto a se acrescentar ao vinho for superior à da que pode precipitar, o ferrocianeto em excesso, em estado livre, não combinado com tais metais, pode decompor-se pela ação dos ácidos e produzir ácido cianídrico, que é um ácido altamente tóxico.

Material

- proveta de 100 ml
- tubos de ensaios de ± 15 ml
- pipeta de 100 ml com duplo aferimento
- pipeta de 1 ml dividida em décimos de decilitro
- pipetas graduadas de 10 ml
- pipetas volumétricas de 10ml
- funis de ± 15 cm de diâmetro
- Conta-gotas

Reagentes

- Solução de ferrocianeto de potássio a 1 %.
- Solução saturada de alúmen fêrrico (40 g de sulfato fêrrico amoniacal em 100 ml de solução).
- Solução de tanino a 0,5%.
- Solução de gelatina a 0,3%.
- Solução de ácido clorídrico a 50%.

Prova preliminar

- Preparar três provetas com exatamente 100 ml do vinho a ser tratado.
- Acrescentar à 1ª proveta 0,5 ml da solução de ferrocianeto a 1%, à 2ª proveta 1,5 ml da solução de ferrocianeto a 1%, à 3ª proveta 2,5 ml da solução de ferrocianeto a 1% e à 4ª proveta 3,5 ml da solução de ferrocianeto a 1%. Estas adições correspondem a 5-15-25 e 35g de ferrocianeto de potássio por 100 litros de vinho.
- Após 15 minutos, acrescentar a cada proveta 1 ml de solução de gelatina e 1 ml da solução de tanino.
- Esperar aproximadamente quatro horas para que o ferrocianeto precipite os metais existentes no vinho.
- Após, filtrar ou centrifugar 20 ml de cada proveta (10 minutos a 5.500 rpm).
- Transferir 10 ml de cada proveta para tubos de ensaio de 15 ml de capacidade.
- Acrescentar duas gotas da solução de alumínio férrico a 1% a cada um dos tubos e 1 ml de ácido clorídrico a 50%.
- O tubo que produzir coloração azul indicará excesso de ferrocianeto de potássio.

Supondo que se tenha encontrado excesso de ferrocianeto nas provetas nº 3 e nº 4 e ausência de ferrocianeto na nº 1 e nº 2, deduz-se que a quantidade de ferrocianeto a se acrescentar está compreendida entre 15 a 25 g por 100 litros de vinho.

Prova principal

- Transferir para quatro provetas 100 ml do vinho analisado anteriormente.
- Acrescentar, misturando cuidadosamente, à 1ª proveta, 1,7 ml da solução de ferrocianeto a 1%; à 2ª proveta, 1,9 ml da solução de ferrocianeto a 1%; à 3ª proveta, 2,1 ml da solução de ferrocianeto a 1% e à 4ª proveta, 2,3 ml da solução de ferrocianeto a 1%. Estas adições correspondem a 17, 19, 21 e 23 g de ferrocianeto de potássio por 100 litros de vinho.
- Proceder a análise como descrito na prova preliminar, de modo a comprovar a quantidade de ferrocianeto a ser empregada.

Se o valor encontrado estiver entre 21 e 23 g, adota-se a média de 22 g para uso prático. Por precaução, o valor encontrado está em excesso, sendo comum utilizar-se um valor 3 gramas menor. No presente caso serão utilizados 18 g de ferrocianeto de potássio por 100 litros de vinho.

Observação

Para determinar os índices dos metais pesados nos vinhos tintos e rosados, acrescenta-se mais 1 ml de ácido sulfúrico puro e 1 ml de cloreto de bário a 10%. Deixa-se em repouso durante quinze minutos e pelo depósito formado identifica-se aquele que possui doses excessivas de ferrocianeto de potássio.

4.5.10 - ENSAIOS PRÉVIOS DE CONSERVAÇÃO

Prova do ar

- a) Quebra tânico-férrica ou fosfato-férrico - Deixa-se o vinho em contato com o ar em um lugar fresco e escuro. Após 12 horas, se o aspecto da amostra estiver turvo ou enegrecido, existe a possibilidade de quebra tânico-férrica.
- b) Quebra oxidásica - Proceda-se da mesma forma que anteriormente, utilizando duas amostras de vinho, uma pasteurizada, com a finalidade de destruir a oxidase, e outra sem a pasteurização. A formação da cor parda e de precipitado escuro é sinal característico da quebra oxidásica.
- c) Quebra cúprica - Coloca-se uma garrafa de vinho fechada em banho-maria a temperatura de 35 °C. Se houver uma quantidade de cobre suficiente, ocorrerá o aparecimento de turvação, característico da quebra cúprica.

Prova do frio

Coloca-se uma garrafa de vinho sob refrigeração durante 5 ou 6 dias e observa-se se há a precipitação dos bitartaratos.

Prova da estufa

Mantém-se em uma estufa uma amostra de vinho durante 3 ou 4 dias a uma temperatura de 25 °C. Em seguida, a amostra é examinada ao microscópio para verificar-se um possível desenvolvimento microbiano, distinguindo, se possível a causa da contaminação (leveduras ou bactérias). Caso seja necessário, contam-se e identificam-se os microrganismos.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, apresentam-se os resultados da fermentação do mosto da uva Niágara em um fermentador não convencional do tipo *airlift*, usando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em experimentos realizados na safra dos anos 2000 e 2001. Foram analisados a produção de biomassa e o desdobramento dos açúcares no mosto, sendo os resultados comparados com a produção de vinho pelo método tradicional.

Os experimentos foram divididos em duas etapas, sendo a primeira iniciada em fevereiro de 2000, época da safra de uvas, e a segunda somente na safra do ano 2001.

5.1 - INFLUÊNCIA DA UTILIZAÇÃO DO BIORREATOR *AIRLIFT* NA FERMENTAÇÃO DO MOSTO DE UVA

5.1.1 - Testes Realizados no Ano 2000

O mosto utilizado para os testes realizados na safra do ano 2000 foi extraído da uva Niágara. O substrato depois de prensado sofreu adição de 0,1 g/L de anidrido sulfuroso, sendo mantido em recipiente plástico numa câmara frigorífica a uma temperatura de 0 °C por dois dias. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, em Florianópolis.

Os experimentos foram realizados para verificar a evolução no crescimento da biomassa e, em consequência, o desdobramento dos açúcares redutores, mantendo-se constantes todas as condições de operação, como:

- Vazão de ar - 0,5 L/min
- Temperatura no biorreator - 24 °C
- pH inicial do mosto - 3,8

A variação da concentração de biomassa é apresentada na Tabela 5.1 para a fermentação do mosto pelo método tradicional e na Tabela 5.2 para a fermentação com a utilização do biorreator *airlift*. O ensaio no biorreator foi realizado sob condições constantes durante 9 horas, sendo as amostras retiradas a cada 3 horas para análise.

Tabela 5.1 – Dados da fermentação do mosto durante 9 horas pelo método tradicional.

Tempo de Coleta (h)	Volume da Amostra (ml)	Massa Seca (g)	Concentração de Células secas (g/L)
Início	60	0,0610	1,02
3	25	0,0545	2,18
6	25	0,0577	2,31
9	25	0,0709	2,84

Tabela 5.2 – Dados da fermentação do mosto durante 9 horas em biorreator *Airlift*.

Tempo de Coleta (h)	Volume da Amostra (ml)	Massa Seca (g)	Concentração de Células secas (g/L)
Início	60	0,0610	1,02
3	25	0,0704	2,82
6	25	0,0775	3,10
9	25	0,0865	3,46

Analisando os dados das Tabelas 5.1 e 5.2, podemos concluir que a cinética de crescimento das leveduras mostrou-se maior no biorreator *airlift* do que no método tradicional (fermentação comum), pois, para um mesmo período de ensaio, ocorreu uma produção maior de massa celular na fermentação do mosto com a utilização do biorreator.

A Figura 5.1 apresenta o comportamento no aumento da biomassa em termos de concentração de células secas em g/L para a fermentação tradicional e a fermentação no biorreator *airlift*.

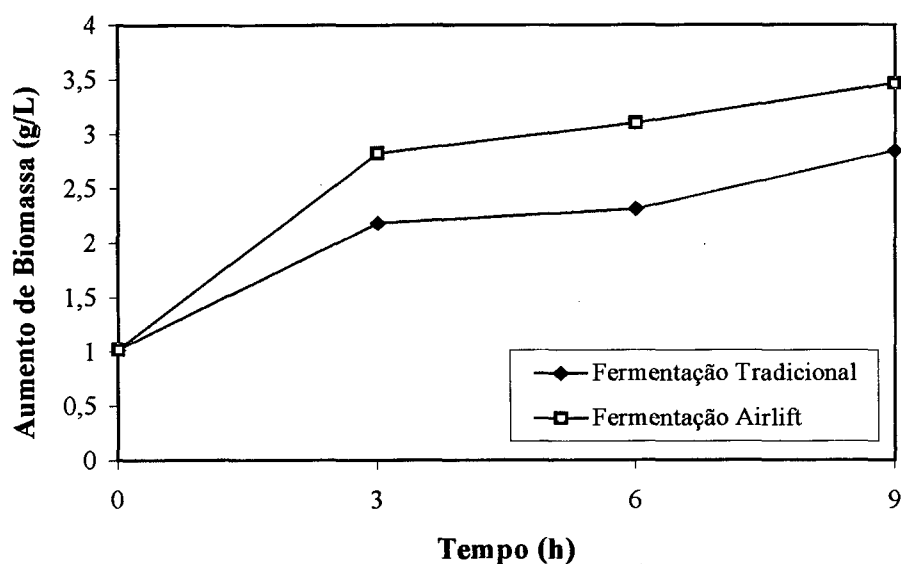


Figura 5.1 – Cinética do aumento da concentração de biomassa da fermentação convencional e da fermentação em reator *airlift* durante 9 horas.

A Tabela 5.3 apresenta os dados relativos à fermentação do mosto de uva no biorreator *airlift* com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O experimento foi realizado durante 24 horas, sendo as amostras retiradas a cada 3 horas. Para cada fração coletada foi determinado o valor da massa seca e a concentração dos açúcares redutores.

Tabela 5.3 – Dados da fermentação do mosto durante 24 horas em biorreator *Airlift*.

Tempo de Coleta (h)	Volume da Amostra (ml)	Massa Seca (g)	Concentração de Células (g/L)	Açúcares Redutores (g/L)
Início	25	0,0493	1,97	181,33
3	25	0,0929	3,72	156,57
6	25	0,1171	4,68	147,11
9	25	0,1188	4,75	144,80
12	25	0,1215	4,86	132,06
15	25	0,1276	5,10	125,74
18	25	0,1508	6,03	123,80
21	25	0,1631	6,52	118,47
24	25	0,1678	6,71	95,77

A Figura 5.2 apresenta os dados relativos a concentração de leveduras e dos açúcares redutores. Em relação as leveduras, a análise da velocidade de crescimento demonstra um aumento significativo da sua concentração no início da fermentação. A velocidade específica de crescimento nas primeiras 6 horas foi de 0,45 g/L.h; entre 6 e 15 horas, foi de 0,047 g/L.h, enquanto que nas 9 horas finais, a velocidade ficou em 0,18 g/L.h.

A concentração de açúcares diminui seu valor com o tempo, pois o mesmo é convertido em energia para o aumento da biomassa. A queda dos valores da concentração de açúcar não é constante, pois em cada fase do processo ocorre a degradação de tipos diferentes de açúcar presentes no mosto.

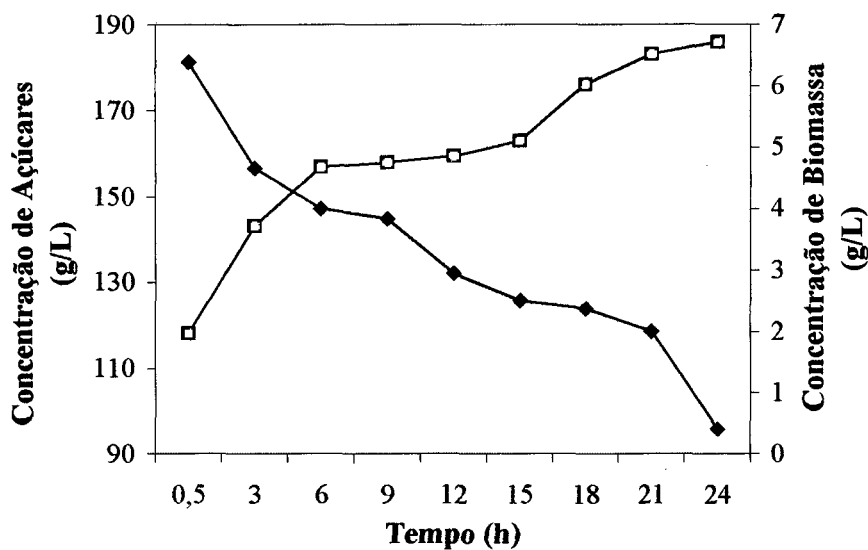


Figura 5.2 – Concentração de Açúcares Redutores e de Biomassa na fermentação em biorreator *airlift* durante 24 horas.

Os ensaios de pré-fermentação em reator *airlift* foram acompanhados através de análises em sua fase anaeróbia (segunda fase de fermentação), para verificar sua evolução fermentativa e também dos parâmetros de controle de qualidade. Através da análise dos dados da Tabela 5.4, percebe-se que após 8 dias do início da fermentação (fase anaeróbia), a quantidade de biomassa é menor que os valores encontrados durante a fermentação aeróbia, mas a quantidade de açúcares degradados aumentou, produzindo uma quantidade de álcool maior durante esta fase.

As amostras que foram fermentadas no biorreator apresentaram uma evolução superior em relação a amostra fermentada pelo método tradicional, tanto na concentração de biomassa como na concentração de açúcares desdobrados. Estes resultados indicam que a pré-fermentação do mosto no biorreator *airlift* produz uma evolução fermentativa mais regular e mais eficiente do que a obtida pelo método tradicional.

Tabela 5.4 – Dados obtidos da análise do produto após 8 dias do início da fermentação utilizando o método tradicional e o biorreator *airlift*.

Amostra	Biomassa	Açúcares residuais
Testemunha	2,20 g/L	15,0 g/L
<i>Airlift</i> 9 h	4,35 g/L	9,5 g/L
<i>Airlift</i> 24 h	4,50 g/L	5,0 g/L

A Tabela 5.5 apresenta os valores das análises realizadas no produto da fermentação do mosto pelo método tradicional e pelo biorreator *airlift* após 30 dias do início da pré-fermentação. Examinando os valores da concentração de açúcares redutores nas amostras, observa-se que o produto obtido pela fermentação no reator *airlift* alcançou teores inferiores a 2 g/L, o que indica que o produto já pode ser considerado como um vinho seco. Os valores residuais - 1,4 e 1,5 g/L, indicam a presença de açúcares não fermentescíveis, como por exemplo arabinose e frutose. Já o valor obtido na análise da amostra testemunha, indica que a mesma continuava sua fermentação.

Tabela 5.5 – Resultado da análise do produto obtido pelo método tradicional e no biorreator *airlift* realizada 30 dias após o início da pré-fermentação.

Amostra	Testemunha	<i>Airlift</i> (9 h)	<i>Airlift</i> (24 h)
Densidade (20 °C)	0,9926	0,9940	0,9948
Açúcares (g/L)	5,2	1,4	1,5
Álcool (°GL)	11,1	10,9	10,9
Acidez Total (meq/L)	9,6	11,8	13,8
Acidez Volátil (meq/L)	1,1	1,5	1,7
Extrato Seco (g/L)	16,400	18,800	20,400
Relação Álcool /Extr. Seco Reduzido	5,41	4,64	4,27

As análises realizadas no produto final estão apresentadas nas Tabelas 5.6 e 5.7. Analisando os dados, verifica-se que a amostra utilizada como testemunha permaneceu com uma concentração de açúcares residuais mais elevada (2,10 g/L) em relação aos produtos obtidos no biorreator *airlift* (1,4 e 1,5 g/L), porém seu rendimento em álcool foi melhor, chegando a um teor de 11,3 °GL em comparação a um teor alcoólico de 10,9 °GL para as amostras do *airlift*. Quanto ao valor para a acidez total, no método tradicional obteve-se 9,4 meq/L, enquanto que foi de 11,5 meq/L para a amostra que permaneceu por 9 h e 13,2 meq/L para a amostra que permaneceu durante 24 horas no biorreator.

Tabela 5.6 – Resultado da análise do produto realizada 80 dias após o início da pré-fermentação.

Amostra	Testemunha	<i>Airlift</i> (9 h)	<i>Airlift</i> (24 h)
Densidade (20 °C)	0,9923	0,9936	0,9940
Açúcares (g/L)	2,10	1,40	1,50
Álcool (°GL)	11,3	10,9	10,9
Acidez Total (meq/L)	9,4	11,5	13,2
Acidez Volátil (meq/L)	1,2	1,5	1,7
Extrato Seco (g/L)	16,200	17,800	18,800
Relação Álcool /Extr. Seco Reduzido	5,58	4,90	4,64

Tabela 5.7 – Resultado da análise do produto realizada 140 dias após o início da pré-fermentação pelo Laboratório da Epagri - Videira/SC.

Amostra	Testemunha	<i>Airlift</i> (9 h)	<i>Airlift</i> (24 h)
Densidade (20 °C)	0,9923	0,9937	0,9940
Açúcares (g/L)	2,10	1,40	1,46
Álcool (°GL)	11,3	10,9	10,9
SO ₂ Livre (mg/L)	35,2	28,8	12,8
SO ₂ Total (mg/L)	99,2	128,0	112,0
Acidez Total (meq/L)	9,4	11,6	13,6
Acidez Volátil (meq/L)	1,3	1,6	1,8
Extrato Seco (g/L)	14,850	16,950	18,550
Cinzas (g/L)	1,408	1,552	1,592

Os valores obtidos para a acidez volátil, representada pela quantidade de ácido acético presente na amostra, indicam que a maior aeração ocorrida no biorreator *airlift* diminuiu a quantidade de anidrido sulfuroso dissolvido na amostra. Esta diminuição da concentração de SO₂ possibilitou um maior desenvolvimento das bactérias acéticas, o que provocou o aumento do valor da acidez volátil em relação à amostra fermentada pelo método tradicional.

5.1.2 - Testes Realizados no Ano 2001

A constatação do aumento da acidez volátil no biorreator *airlift* determinou a repetição de parte das análises para a safra do ano 2001. Foram realizados ensaios pelo método tradicional e utilizando o biorreator, sendo analisados os tempos de permanência de 6 e 8 horas. Na Tabela 5.8 estão apresentados os dados relativos à evolução do crescimento da biomassa, que apresentou curva crescente e contínua até o final do teste no biorreator. As amostras foram retiradas de hora em hora.

Tabela 5.8 – Concentração de Biomassa no biorreator *Airlift* após oito horas de cultivo.

Tempo (h)	Amostra	Massa Seca (g)	Concentração de Biomassa (g/l)
0	10	0,0340	1,70
1	11	0,0359	1,80
2	12	0,0388	1,94
3	13	0,0424	2,12
4	14	0,0620	3,10
5	15	0,0648	3,24
6	16	0,0660	3,30
7	17	0,0718	3,59
8	18	0,0726	3,63

Para obter a concentração de açúcares redutores, amostras foram retiradas a cada hora de permanência do mosto em fermentação no biorreator, diluídas 500 vezes (1:500) e realizadas leituras de Absorbância a 540 nm. As leituras foram feitas em triplicata, tirando-se uma média, que aplicada a curva de calibração (Anexo 2) forneceu o valor da concentração de açúcares para a amostra com 8 h de permanência no *airlift*, apresentados na Tabela 5.9.

Tabela 5.9 – Leituras de Absorbância a 540 nm na Fermentação do Mosto em Reator *Airlift* com tempo de permanência de 8 horas.

Tempo (h)	Amostra	Diluição	Absorbância	Açúcares (g/L)
0	10	1:500	0,203	136,793
1	11	1:500	0,195	132,087
2	12	1:500	0,184	126,064
3	13	1:500	0,182	124,558
4	14	1:500	0,175	120,981
5	15	1:500	0,172	119,099
6	16	1:500	0,168	116,840
7	17	1:500	0,159	111,569
8	18	1:500	0,154	108,934

Na Figura 5.3 pode-se verificar o crescimento da biomassa (Tabela 5.8) e a concentração de açúcares redutores (Tabela 5.9).

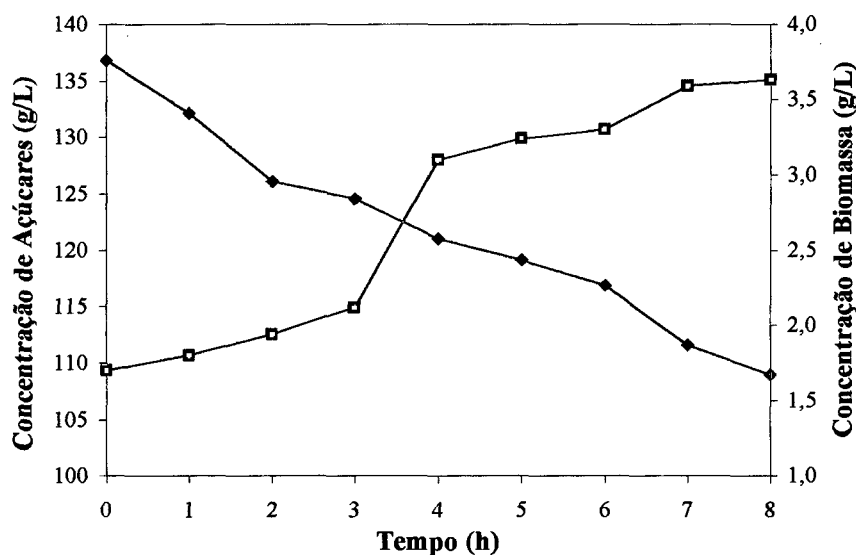


Figura 5.3 – Concentração de Açúcares Redutores e de Biomassa na fermentação em biorreator *airlift* durante 8 horas de cultura.

Outro teste foi feito com permanência de 6 h no biorreator, com leituras a cada hora e os resultados aparecem na Tabela 5.10, acompanhada pela Figura 5.4.

Tabela 5.10 – Fermentação no Biorreator *Airlift* com permanência de 6 h.

Tempo (h)	Amostra	Massa Seca (g)	Concentração de Biomassa (g/l)
0	19	0,0203	1,015
1	20	0,0401	2,005
2	22	0,0431	2,155
3	23	0,0444	2,220
4	24	0,0451	2,255
5	25	0,0467	2,335
6	26	0,0591	2,955

Para obter a concentração de açúcares redutores para o ensaio de fermentação em biorreator durante 6 horas, amostras foram retiradas a cada hora de permanência do mosto, diluídas 500 vezes (1:500) e realizadas leituras de Absorbância a 540 nm. As leituras foram feitas em triplicata, tirando-se uma média, que aplicada a curva de calibração (Anexo 2) forneceu o valor da concentração de açúcares, apresentadas na Tabela 5.11.

Tabela 5.11 – Leituras de Absorbância a 540 nm na Fermentação do Mosto em Reator *Airlift* com tempo de permanência de 6 horas.

Tempo (h)	Amostra	Diluição	Absorbância	Açúcares (g/L)
0	19	1:500	0,183	125,499
1	20	1:500	0,175	120,793
2	22	1:500	0,173	119,663
3	23	1:500	0,164	114,393
4	24	1:500	0,155	109,499
5	25	1:500	0,148	105,357
6	26	1:500	0,130	95,569

Na Figura 5.4 pode-se verificar o crescimento da biomassa (Tabela 5.10) e a concentração de açúcares redutores (Tabela 5.11)

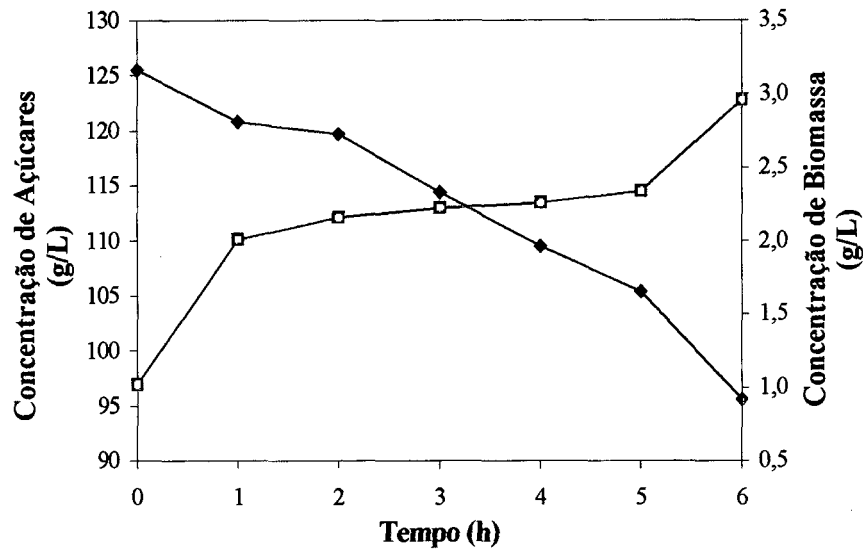


Figura 5.4 – Concentração de Açúcares Redutores e de Biomassa na fermentação em biorreator *airlift* durante 6 horas de cultura.

5.2 - DADOS ANALÍTICOS DOS VINHOS 2001

Com 20 dias de fermentação anaeróbia, os vinhos, que passaram pelo biorreator, desdobraram quase que totalmente seus açúcares, permanecendo pequena quantidade de açúcares residuais, o que é muito normal em vinhos, enquanto que as amostras testemunhas continuaram sua fermentação por mais 10 dias.

Com o término da fermentação, tanto as amostras fermentadas no biorreator *airlift* como as amostras testemunhas, foram trasfegadas para garrafas, recebendo a adição de 0,1 g/L de anidrido sulfuroso (SO_2), com o objetivo de manter o teor elevado de anidrido sulfuroso livre e assim impedir o desenvolvimento de bactérias e fungos.

Na Tabela 5.12, apresentamos os códigos para a identificação das amostras analisadas nas Tabelas 5.13 e 5.14

Tabela 5.12 – Códigos para identificação das amostras analisadas nas Tabelas 5.13 e 5.14.

Amostra	Descrição
1 A	Mosto fermentado em <i>airlift</i> durante 6 h
1 B	Testemunha do mosto fermentado em <i>airlift</i> durante 6 h
2 A	Mosto fermentado em <i>airlift</i> durante 6 h
2 B	Testemunha do mosto fermentado em <i>airlift</i> durante 6 h
3 A	Mosto fermentado em <i>airlift</i> durante 8 h
3 B	Testemunha do mosto fermentado em <i>airlift</i> durante 8 h
4 A	Mosto fermentado em <i>airlift</i> durante 6 h
4 B	Testemunha do mosto fermentado em <i>airlift</i> durante 6 h

A Tabela 5.13 apresenta os resultados das análises dos vinhos fermentados pelo método tradicional e pelo biorreator *airlift* realizados em laboratório particular após 30 dias do término da fermentação.

Tabela 5.13 – Dados analíticos do vinho fermentado obtidos em laboratório particular.

Amostra	1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B
Densidade (g/cm ³)	0,9910	0,9920	0,9922	0,9930	0,9916	0,9930	0,9912	0,9922
Açúcares (g/l)	0,87	2,34	0,64	3,54	0,58	3,42	0,68	2,34
Álcool (°GL)	10,1	10,0	10,3	10,1	10,6	10,2	10,9	10,5
SO ₂ Livre	144,2	148,5	126,2	128,6	148,4	138,3	128,6	122,8
Acidez Total (meq/l)	7,4	7,8	8,4	7,8	8,8	8,6	9,0	8,8
Acidez Vol. (meq/l)	1,3	1,2	1,3	1,1	1,3	1,0	1,0	1,0
Extrato Seco (g/l)	12.700	12.800	13.800	13.000	15.200	13.200	16.400	14.400
Relação Álcool / Extr. Seco Reduzido	6,36	6,25	5,97	6,22	5,58	6,18	5,32	5,83

A Tabela 5.14 apresenta os resultados das análises dos vinhos fermentados pelo método tradicional e pelo biorreator *airlift* realizados no laboratório da EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina SA), na cidade de Videira/SC, após 45 dias do término da fermentação.

Tabela 5.14 – Dados analíticos do vinho fermentado obtidos pelo Laboratório da EPAGRI
– Videira/SC.

Amostra	1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B
Densidade (g/cm ³)	0,9910	0,9910	0,9918	0,9920	0,9910	0,9916	0,9912	0,9916
Açúcares (g/l)	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
Álcool (°GL)	10,1	10,1	10,3	10,3	10,6	10,3	10,9	10,6
SO ₂ Livre	236,0	245,6	234,4	240,2	207,6	239,2	201,2	192,0
Acidez Total (meq/l)	7,6	8,0	8,3	8,1	9,1	8,8	9,0	8,8
Acidez Vol. (meq/l)	1,3	1,0	1,3	1,1	1,3	1,1	1,0	1,0
Extrato Seco (g/l)	12.720	12.720	13.100	13.500	16.060	16.510	17.350	17.660
Cinzas (g/l)	1,312	1,264	2,126	2,068	1,956	2,066	2,368	2,456
Relação Álcool / Extr. Seco Reduzido	6,35	6,35	629	6,10	5,28	4,99	5,03	4,80

6 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Os objetivos do experimento com a utilização do biorreator não convencional do tipo *airlift* de circulação externa para a pré-fermentação do mosto de uvas brancas, pré-clarificado, foram satisfatoriamente atingidos, uma vez que com um período de 6 h a 9 h de permanência do mosto no biorreator, verifica-se uma diferença significativa na quantidade de biomassa em todos os testes. Analisando o Gráfico 5.1, percebe-se que o crescimento da biomassa é maior através da utilização do biorreator *airlift*, pois o mesmo apresenta um valor de 3,46 g/L contra 2,84 g/L para o método tradicional nas primeiras 9 horas de fermentação do mosto. Este aumento da quantidade de biomassa no biorreator *airlift*, melhora a segunda etapa da fermentação alcoólica, a etapa anaeróbia, implicando em um desdobramento melhor e mais constante dos açúcares.

O maior desenvolvimento da biomassa no reator *airlift* possibilitou um desdobramento mais rápido dos açúcares redutores, reduzindo o tempo total da fermentação em aproximadamente 10 dias quando comparada as amostras testemunhas, fermentadas pelo método convencional.

Pelas análises do vinho, produto final, foram constatadas quantidades de açúcares residuais menores nas amostras que passaram pelo biorreator. Quanto ao teor alcoólico final, verificou-se que as amostras ficaram iguais a 10,1 °GL para as amostras 1A (*airlift* 6h) e 1B (testemunha); 10,3 °GL para as amostras 2A (*airlift* 6h) e 2B (testemunha); 10,6 °GL para a amostra 3A (*airlift* 8h); 10,3 °GL para a amostra 3B (testemunha); 10,9 °GL para a amostra 4A (*airlift* 6h) e 10,6 °Gl para a amostra 4B (testemunha), portanto nas amostras 3 e 4, o teor alcoólico obtido no *airlift* foi 0,3 °Gl superior ao processo convencional (testemunha). Estes resultados demonstram que não houve diferenças significativas entre as amostras analisadas em relação ao teor alcoólico dos vinhos.

Na indústria vinícola, o período de fermentação para um vinho era de até 60 dias a alguns anos atrás. Atualmente, com o uso de fermentos selecionados e cuidados mais adequados, este tempo foi reduzido para 30 a 40 dias. No experimento, com a pré-fermentação no biorreator *airlift* com circulação externa, o tempo para o total desdobramento dos açúcares foi de exatamente 20 dias nos 4 experimentos conduzidos

desta maneira, conforme dados obtidos pela análise dos vinhos. As amostras do método convencional continuaram sua fermentação por mais 10 dias.

Através dos dados obtidos nos experimentos, conclui-se que o biorreator *airlift* atende às necessidades fisiológicas das leveduras, aumentando sua velocidade de crescimento e mantendo sua atividade posterior a um bom nível fermentativo até o final do processo, provocando o desdobramento dos açúcares em um tempo menor em relação ao método de fermentação convencional. Assim, biorreatores do tipo *airlift* de circulação externa podem ser utilizados na indústria vinícola para o preparo do fermento (“pé-de-cuba”), para posterior incubação dos mostos de vinho branco e tinto nas fermentações mantidas em recipientes fechados, e nos demais tipos de fermentação que se quer iniciar com colônias de fermentos já desenvolvidas e em plena atividade.

Como sugestões para novos experimentos, propomos:

- Pré-fermentação com maceração submersa para vinho tinto;
- Fermentação acética do vinho para obtenção de vinagre;
- Desenvolvimento de leveduras com diferentes dosagens de Anidrido Sulfuroso;
- Otimização do tempo de permanência no biorreator *airlift* para o maior desenvolvimento das leveduras;
- Estudo da influência da vazão de ar no crescimento das leveduras.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLE N, GRANT; ROBINSON, CAMPBELL – **On The Calculation of Shear Rate and Apparent Viscosity in Airlift and Bubble Column Bioreactors** - *Biotechnology and Bioengineering* – Vol 38 – Pag. 212 a 216, 1991.
- ALMEIDA LIMA, URGEL DE; AQUARONE, EUGÊNIO; BORZANI, VALTER – **Tecnologia das Fermentações** – Volume 1 – Editora Edgard Blucher Ltda – São Paulo, 1975.
- AL-QODAH, Z; LAFI, W – **Modeling of Antibiotics Production in Magneto Three-Phase Airlift Fermenter.** – *Biochemical Engineering Journal* – Nº 7 – Pag 7 a 16, 2001.
- ASSA, AMIR; BAR, RAPHAEL - **Biomass Axial Distribution in Airlift Bioreactor With Yeast and Plant Cells** - *Biotechnology and Bioengineering* – Vol 38 – Pag. 1325 a 1330, 1991.
- BYUN, S.Y.; PEDERSEN, HENRIK – **Two-Phase Airlift Fermentor Operation With Elicitation For The Enhanced Production of Benzophenanthridine Alkaloids in Cell Suspensions of *Escherichia Californica*** - *Biotechnology and Bioengineering* – Vol 44 – Pag 14 a 20, 1994.
- CATALUÑA, ERNESTO – **Uvas e Vinhos** – Rio de Janeiro: Editora Globo, 1984.
- CHAO, Y.; ISHIDA, T.; SUGANO, Y.; SHODA, M. - **Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* in a 50-L Internal-Loop Airlift Reactor** - *Biotechnology and Bioengineering* - Volume 68, Pag. 345 a 352, 1999.
- CHEN, N.Y.; KONDIS, E.F.; SRINIVASAN, S. – **Low-Pressure Airlift Fermenter for Single Cell Protein Production: I. Design and Oxygen Transfer Studies** - *Biotechnology and Bioengineering* – Vol. 29 – Pag. 414 a 420, 1987.

- CHISTI, M.Y. – **Airlift Bioreactors** – London: Elsevier Applied Science, 1989.
- CHISTI, YUSUF - **Pneumatically agitated bioreactors in industrial and environmental bioprocessing: hydrodynamics, hydraulics, and transport phenomena**, Applied Mechanics Reviews, Volume 51, Pag. 33 a 112, 1998.
- CORTÉS, ILDEFONSO MARECA – **Enología Enfoques Científicos y Técnicos sobre la Vid y el Vino**, Editorial Alhambra S.A. Madrid – Espanha, 1975.
- DOMINGUES L.; DANTAS M.M.; LIMA N.; TEIXEIRA J.A. - **Continuous Ethanol Fermentation of Lactose by a Recombinant Flocculating *Saccharomyces cerevisiae* Strain**, Biotechnology and Bioengineering, Volume 64, Pag 692 a 697, 1999.
- FREITAS, CARLA; FIALOVÁ, MARIA; ZHRADNIK, JINDRICH; TEIXEIRA, JOSÉ A. – **Hydrodynamics of a Three-phase External-loop Airlift Bioreactor** - Chemical Engineering Science, Vol 55 – Pag. 4961 a 4972, 2000.
- GAVRILESCU M.; ROMAN R.V. - **Application of an Airlift Bioreactor to the Nystatin Biosynthesis** - Acta Biotechnologica- Volume 16, Pag. 303 a 314, 1996.
- GAVRILESCU M.; ROMAN R.V. - **Performance of Airlift Bioreactors in the Cultivation of Some Antibiotic Producing Microorganisms**, Acta Biotechnologica, Volume 18, Pag. 201 a 229, 1998.
- GUPTA, J. C.; PANDEY, G.; MUKHEJEE, K.J. – **Two-stage Cultivation of Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* to Enhance Plasmid Stability Under Non-selective Conditions: Experimental Study and Modeling** – Enzyme and Microbial Technology – Vol 28 – Pag. 89 a 99, 2001.
- HUANG, T.K.; WANG, P.M.; WU, W.T. – **Cultivation of *Bacillus thuringiensis* in an Airlift Reactor With Wire Mesh Draft Tubes** - Biochemical Engineering Journal – Vol. 7 – Pag. 35 a 39, 2001.

- HÜLSCHER, M.; SCHEIBLER, U; ONKEN, U – **Selective Recycle of Viable Animal Cells by Coupling of *Airlift* Reactor And Cell Settler** - Biotechnology and Bioengineering,- Vol 39 – Pag 442 a 446, 1992.
- JIN, YU-LAI; SPEERS, ALEX – **Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*** – Food Research International – Vol 31 – Pag. 421 a 440, 1998.
- KAWASE, YOSHINORI – **Liquid Circulation in External-Loop *Airlift* Bioreactor** - Biotechnology and Bioengineering, Vol. 35 Pag. 540 a 546, 1989.
- KAWASE, YOSHINORI; HASHIMOTO, NORIHISA - **Gas Hold-up and Oxygen Transfer in Three-Phase External-Loop *Airlift* Bioreactors: Non-Newtonian Fermentation Broths** - Journal of Chemical Technology and Biotechnology, Volume 65, Pages 325 a 334, 1996.
- MERCHUK, JOSE C.; SIEGEL, MARC – **Hidroynamics in Rectangular *Airlift* Reactors: Scale-up And The Influence of Gas-Liquid Separator Design.** – The Canadian Journal of Chemical Engineering – Vol 69 – Pag 465 a 473, 1991.
- MCMANAMEY, W.J.; WASE, D.A.J. – **Relationship Between The Volumetric Mass Tranfer Coefficient And Gas Holdup in *Airlift* Fermentors** – Biotechnology and Bioengineering – Vol 28 – Pag. 1446 a 1448, 1986.
- NICOLLELA, C; VAN LOOSDRECHT,M.C.M.; HEIJNEN, J.J. – **Mass Transfer and Reaction in a Biofilm *Airlift* Suspension Reactor** - Chemical Engineering Science – Vol 53 Pag. 2743 a 2753, 1998.
- ROSIER, JEAN PIERRE – **Novas Perspectivas das Exigências Nutricionais das Leveduras** – Epagri de Videira (SC) – Brasil, 2000.
- PATO, OCTÁVIO – **O Vinho sua Preparação e Conservação**, 7ª Edição, Livraria Clássica Editora – Lisboa – Portugal, 1982.
- PEDRINI, MÁRCIA REGINA DA SILVA – **Desenvolvimento e Aplicações de Um Biorreator *Airlift* com Circulação Externa** - Dissertação de Mestrado – Florianópolis, 1997.

- PEYNAUD, EMILE – **Conhecer e Trabalhar o Vinho** – Editora Portuguesa de Livros Técnicos e Científicos Lda – Lisboa – Portugal, 1982.
- POLLARD D.J.; ISON A.P.; SHAMLOU P.A.; LILLY M.D. - **Reactor heterogeneity with Saccharopolyspora erythraea airlift fermentations**, Biotechnology and Bioengineering, Volume 58, Pag. 453 a 463, 1998.
- POPOVIC, MILAN; ROBINSON, CAMPBELL W. – **External-Circulation-Loop Airlift Bioreactors: Study of The Liquid Circulating Velocity in Highly Viscous Non-Newtonian Liquids** - Biotechnology and Bioengineering, - Vol 32 – Pag 301 a 312, 1988.
- RAJA RAO, T.B.M.L.; SONOLICAR, R.L.; SAHEB, S.P. – **Influence of Magnetic Field on The Performance of Bubble Columns And Airlift Bioreactor With Submersed Microorganisms** – Chemical Engineering Science.- Vol 52 - Nº 21/22 - Pag 4155 a 4160, 1997.
- RATTI, RENATO – **Como Degustar os Vinhos** – Edições AEB Latino Americana – Bento Gonçalves – Brasil, 1984.
- ROSA, TULLIO DE – **Tecnología dei Vini Bianchi**, Edizioni AEB – Brescia, Itália, 1978.
- RUSSELL, A.B.; THOMAS, C.R.; LILLY, M.D. – **The Influence of Vessel Height and Top-Section Size on The Hydrodynamic Characteristics of Airlift Fermentors**, Biotechnology and Bioengineering – Vol 43 – Pag. 69 a 76, 1994.
- SANDERS, D.A.; HUDSON, A.D. – **A Specific Blackboard Expert Sistem to Simulate and Automate the Design of HIGH Recirculation Airlift Reactor** – Mathematics And Computers in Simulation – Vol. 53 – Pag. 41 a 65, 2000.
- SANTOS, SERGIO DE PAULA – **Vinhos** – T. A. Queiroz, Editor – São Paulo, 1982.
- SHAMLOU, P. AYAZI; POLLARD, D.J.; ISON, A.P.; LILLY, M.D. – **Gas holdup and liquid circulation rate in concentric-tube airlift bioreactors**, Chemical Engineering Science, Volume 49, Pages 303 a 312, 1994.

SHAMLOU, P.A.; POLLARD, D.J.; ISON, A.P. – **Volumetric Mass Transfer Coefficient in Concentric- Tube *Airlift* Bioreactors** - Chemical Engineering Science – Vol 50 – Nº 10 – Pag 1579 a 1590, 1995.

SNAPE, J.B.; ZAHRADNIK, J; FIALOVA, M. THOMAS, N.H. – **Liquid-Phase Properties And Sparger design Effects In An External-Loop *Airlift* Reactor** - Chemical Engineering Science – Vol 50 – Nº 20 – Pag 3175 a 3186, 1995.

SONSBEEK, H.M.; VERDURMEN, R.E.M.; VERLAAN, P.; TRAMPER, J. – **Hydrodynamic Model For Liquid-Impelled Loop Reactors.** - Biotechnology and Bioengineering – Vol 36 – Pag 940 a 946, 1990.

VOGT, ERNST – **Fabricación de Vinos**, Editorial Acribia, Zaragoza – Espanha, 1982.

YUGUO, Z.; ZHAO, W.; XIAOLONG, C. – **Citric Acid Production From The Mash of Dried Sweet Potato With its Dregs by *Aspergillus niger* in an External-loop *Airlift* Bioreactor.** – Process Biochemistry – Vol 35 - Pag 237 a 242, 1999.

ANEXOS

ANEXO I

PADRÕES DE IDENTIFICAÇÃO E QUALIDADE PARA O VINHO

PORTARIA Nº 410, de 27 de setembro de 1974.

1. Objeto

Os presentes padrões têm por objeto estabelecer as normas de identidade e qualidade as quais deverá obedecer o vinho.

PADRÕES DE IDENTIDADE

2. Descrição

2.1 - Definição

Vinho é a bebida obtida da fermentação alcoólica do mosto da uva fresca, sã e madura.

2.2 - Classes de Vinho

- Vinho de mesa seco ou doce
- Vinho espumante natural ou champanha
- Vinho espumante gaseificado
- Vinho licoroso
- Vinho composto

3. Vinho de mesa

3.1 - Designação

Vinho de mesa seco é a bebida que contém no máximo 3 g/l de matérias redutoras, calculadas em glicose, e graduação alcoólica compreendida entre 10° e 13° GL a 20 °C.

Será também considerado vinho de mesa a bebida que apresentar sabor levemente ou fracamente adocicado, com teor de açúcar de 3 g/l, calculado em glicose.

PADRÕES DE QUALIDADE

4. Ingredientes

4.1 - Ingredientes básicos

Uvas frescas, sãs, maduras e isentas de terra, sujeiras e parasitas.

4.2 - Ingredientes opcionais

Sacarose (açúcar refinado ou cristal) que poderá ser substituída total ou parcialmente por um ou mais dos seguintes açúcares: açúcar invertido, frutose e glicose.

4.3 - Composição

O vinho de mesa deverá obedecer aos limites a seguir fixados:

	Máximo	Mínimo
Álcool etílico em graus GL a 20 °C	13,00	10,00
Acidez total em meq/l	130,00	55,00
Acidez volátil (corrigida) em meq/l	20,00	--
Sulfatos totais em g/l de Sulfato de Potássio	1,00	--
Anidrido Sulfuroso total em g/l	0,250	--
Cloretos totais em g/l de Cloreto de Sódio	0,500	--
Cinzas em g/l	--	1,500
Relação álcool em peso — extrato seco reduzido		
Para vinhos tintos comuns	4,7	--
Para vinhos tintos finos de vitiviníferas engarrafados na origem	4,8	--
Para vinhos rosados	6,0	--
Para vinhos brancos	6,5	--

5. Critérios de qualidade

Os vinhos não poderão apresentar alterações nas suas características organolépticas normais, salvo as suas alterações biológicas naturais.

Serão interditados os vinhos atacados por enoxidases, fermentos, bactérias e outros agentes que provocam moléstias, turvações e transformações nas suas propriedades biológicas, tais como: azedume e outras doenças.

O vinho e o mosto não poderão apresentar substâncias ou produtos estranhos aos seus constituintes naturais, salvo os previstos nestes padrões.

Os vinhos não poderão ser obtidos por uma segunda fermentação de bagaço.

Vinhos finos são os vinhos provenientes de vitiviníferas que sofreram processo de amadurecimento (envelhecimento) e que apresentam um completo e harmônico conjunto de qualidades organolépticas próprias.

Vinhos especiais são os vinhos que apresentando condições organolépticas semelhantes aos vinhos finos, demonstram características de cortes com vinhos de híbridos.

Vinhos de consumo corrente são os vinhos entregues ao consumo, ano a ano, pouco depois de terminado a sua elaboração.

6. Práticas enológicas lícitas

6.1 - Para melhorar os constituintes naturais do mosto e do vinho

- Adição de Ácidos: Tartárico, Metatartárico, Cítrico, Ascórbico e seus sais, Sórbico e seus sais, Láctico, Anidrido Carbônico, Anidrido Sulfuroso e seus sais, Tartarato de Potássio, Carbonato de Cálcio.
- Tratamento pelo frio e calor.
- Emprego de leveduras, carvão ativo, goma arábica, enzimas e resinas intercambiadoras de íons.
- Emprego do Nitrogênio (N₂) na conservação dos vinhos.
- Emprego do mosto concentrado ou sacarose na elaboração dos vinhos suaves.
- Misturar dois ou mais vinhos provenientes de qualquer colheita.

- Emprego de clarificantes inertes (colas) que não transmitam ao vinho sabores ou aromas estranhos e não deixem resíduos tóxicos e não sirvam como veículos de enfermidades.
- Emprego de Ferrocianeto de Potássio (colagem azul), desde que o estabelecimento possua técnico habilitado e autorizado, e se faça registrar no Ministério da Agricultura; mantenha em dia documentos (notas fiscais etc.), estatística; atenda às exigências de que toda empresa que tratar os vinhos brancos, rosados ou tintos pelo Ferrocianeto de Potássio, deve ter à disposição do serviço de fiscalização dois registros: um indicando as quantidades de Ferrocianeto de Potássio recebidas e empregadas. e de outro, indicando o nome do técnico, enumerado para cada tratamento, endereço, autorização de permissão fornecida pelo órgão fiscal, identificação de cada vasilhame tratado, a quantidade de ferrocianeto de potássio empregado por vasilhame, data do tratamento e da filtração, data da ordem de serviço do órgão fiscal autorizando a livre disposição do vinho.

6.2 - Para os mostos em fermentação somente na zona de produção.

- Concentração.
- Adição de mosto concentrado ou sacarose.
- Emprego de enzimas e resinas intercambiadoras de íons.
- Correção com Álcool Vínico e nos casos previstos, correção com Álcool Etilico potável.
- Adição de Ácidos Tartárico, Cítrico, Lático e Sórbito.
- Emprego de Fosfato e Carbonato de Amônio, Carbonato de Cálcio. Anidrido Sulfuroso e seus sais, Ácido Sórbito e Sorbato de Potássio.
- Tratamento pelo frio ou pelo calor.
- Uso de leveduras.
- Emprego de clarificantes inertes (colas), que não transmitam ao mosto, sabores e aromas estranhos que não deixem resíduos tóxicos e que não sirvam como veículo de enfermidade.
- Cortes com vinhos em casos previstos.
- Uso de carvão ativo.

6.3 - Para estabelecimentos engarrafadores e standardizadores

- Filtração.
- Colagem, excluindo-se azul.
- Pasteurização.
- Emprego de anidrido sulfuroso, ácido sórbico e seus sais.
- Os estabelecimentos standardizadores poderão efetuar cortes de vinhos de procedências diversas.
- Os estabelecimentos engarrafadores, pertencentes ao produtor, poderão efetuar a suavização ou adoçamento dos vinhos, mediante a adição do mosto concentrado ou sacarose.

ANEXO II

CURVA DE CALIBRAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES

Para a medida dos açúcares redutores foi construída uma curva de calibração, partindo-se de uma amostra padrão, com os dados obtidos por absorvância, que aparecem na Tabela 1 e a curva traçada na Figura 1

Tabela 1 – Leitura de Absorbância em amostras padrão para a obtenção da curva de calibração e valor da concentração padrão de açúcares redutores.

Amostra	Concentração de Glicose (g/L)	Absorbância
1	0,3	0,093
2	0,8	0,299
3	1,0	0,412
4	1,5	0,664
5	1,8	0,729

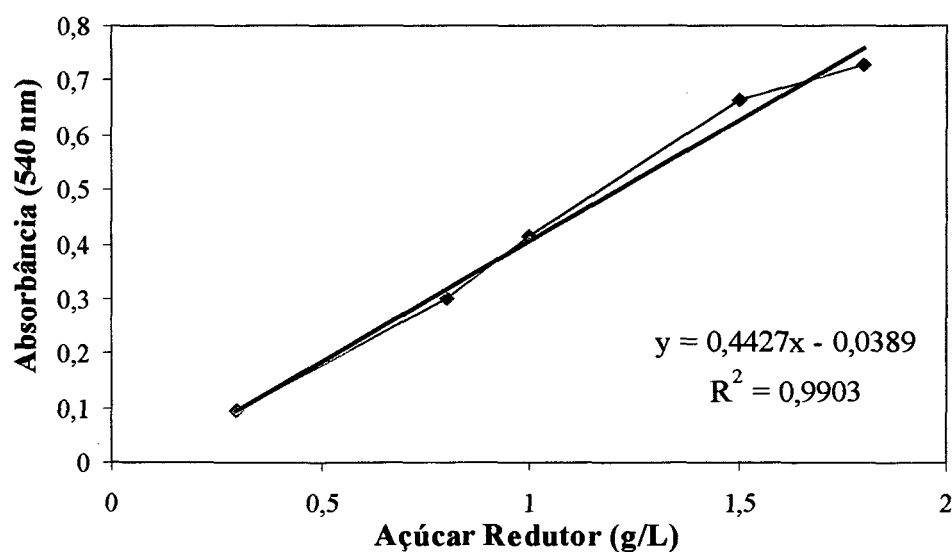


Figura 1 – Curva de Calibração para a análise de açúcares redutores.