EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO E DA DEFECAÇÃO SIMPLES DO CALDO DE CANA SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE N, P E A FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA

ILA MARIA DE AGUIAR OLIVEIRA

Orientador: Prof. Dr. JORGE HORII

Dissertação apresentado à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção de título de MESTRE EM AGRONOMIA. Área de Concentração: Tecnologia de Alimentos.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Março - 1986

Aos meus pais, irmãos e avô,
com carinho,
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Jorge Horii pela orientação competente, atenção e apoio prestados na realização deste trabalho.

À Universidade do Amazonas que possibilitou a nossa participação no Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos.

Ao Departamento de Tecnologia Rural - ESALQ-USP, pela colaboração na presente pesquisa.

À CAPES, pela bolsa concedida.

Ao Prof. Dr. Décio Barbin e Dr.^a Marinêia de Lara Haddad, pela orientação nas análises estatísticas.

À estagiária Eliane Lafрата, pela colaboração na condução do experimento.

À bibliotecária Lúcia Vasconcellos de Arruda Botelho, pela orientação bibliográfica.

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação pela convivência e incentivo.

EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO E DA DEFECÇÃO SIMPLES
DO CALDO DE CANA SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE N,P
E A FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA

AUTORA: ILA MARIA DE AGUIAR OLIVEIRA

ORIENTADOR: PROF. DR. JORGE HORII

RESUMO

Caldos de cana-de-açúcar foram submetidos a aquecimento a 100°C por 5 e 60 minutos e à defecção simples, também pelos mesmos períodos, e analisados, após tratamento e centrifugação, quanto aos teores de nitrogênio total, amoniacal, protéico, não protéico, fosfato inorgânico e contagem microbiana. Esses caldos foram a seguir submetidos à fermentação alcoólica por cerca de 24 horas, mediante a inoculação de uma suspensão acidulada a pH 2,5, contendo 25 g/100 ml de fermento prensado Fleischmann. Com a análise do vinho resultante, calcularam-se as eficiências de fermentação e de conversão. A remoção de nitrogênio total do caldo tratado e centrifugado, em ambos os tratamentos, foram de 20,78 a 26,14%. O nitrogênio amoniacal praticamente não é removido pelo aquecimento e o nível de redução, na defecção simples, é muito pequeno a pH 6,0. Ocorreu acréscimo de nitrogênio na fração não protéica do caldo submetido somente

a aquecimento, embora permanecesse estável nos caldos tratados por defecação simples. Houve redução de fosfato inorgânico da ordem de 3,0 a 30,0%, respectivamente, para os tratamentos. O aquecimento reduziu drasticamente a população microbiana, em cerca de 99,9%. As variações na composição do caldo resultante dos tratamentos não influíram, todavia, nas eficiências fermentativa e de conversão, demonstrando que, aos níveis ensaiados, não ocorre prejuízo à qualidade do mosto que possa se refletir na eficiência do processo.

EFFECT OF SUGAR CANE JUICE THERMAL TREATMENT AND SINGLE
LIME DEFECATION ON THE ALCOHOLIC FERMENTATION
AND NITROGEN PHOSPHORUS CONTENTS

AUTHOR: ILA MARIA DE AGUIAR OLIVEIRA

ADVISER: PROF. DR. JORGE HORII

SUMMARY

Sugar cane juices were submitted to heating at 100°C and single lime defecation for 5 and 60 minutes. Samples of the treated juices were centrifuged and their total, ammoniacal, proteic and non-proteic nitrogen and inorganic phosphorus contents were determined as well as the total microbiological count. These treated juices submitted to alcoholic fermentation for 24 hours by the inoculation with Fleischmann pressed yeast suspension containing 25 g/100 ml (yeast/water) acidulated at pH 2.5. The fermentation and conversion efficiencies were calculated from the results of the wine analysis. The total nitrogen removal of the treated and centrifuged juices in both treatments varying from 20.78% to 26.24%. Ammoniacal nitrogen is not removed by heating and the reduction level during single lime defecation is very low at pH 6.0. There has been an increase in the non-proteic nitrogen fraction of the juices submitted

to single lime defecation. Inorganic phosphorus was also reduced in 3% and 30% in the juices treated by heating and single lime defecation, respectively. Heating has drastically reduced the microbiological population in 99.9%. The variations in the treated juices composition did not influence in the fermentation and conversion efficiencies, showing that at the tested levels there is no harm to the wort quality that may reflect on the process efficiency.

Í N D I C E

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Composição do Caldo de Cana.....	3
2.1.1. Nitrogênio	9
2.1.2. Fósforo	14
2.2. Clarificação	16
2.2.1. Proteínas e Aminoácidos	20
2.2.2. Fosfatos	37
2.3. Microorganismos	42
2.3.1. Leveduras	42
2.3.2. Microflora do Caldo Tratado Termicamente	52
3. MATERIAL E MÉTODOS	58
3.1. Matéria-prima	58
3.2. Preparo do Mosto	59
3.3. Preparo do Inóculo	59
3.4. Condução do Experimento	59
3.4.1. Aquecimento	60
3.4.2. Defecação Simples	61
3.5. Métodos Analíticos	61
3.6. Fermentação Alcoólica	63
3.7. Delineamento Experimental e Análise Estatística	64

	Página
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.1. Composição	66
4.2. Tratamento Térmico	71
4.2.1. Nitrogênio	72
4.2.2. Fósforo	81
4.2.3. Contagem de Microorganismos	83
4.3. Defecação Simples	86
4.3.1. Nitrogênio	86
4.3.2. Fosfatos	94
4.3.3. Contagem de Microorganismos	98
4.4. Fermentação	100
4.4.1. Nitrogênio	100
4.4.2. Fosfatos	102
4.4.3. Massa Celular	107
4.4.4. Eficiência de Fermentação e de Conver- são	109
5. CONCLUSÕES	122
6. LITERATURA CITADA	125
APÊNDICE	147

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Teor de nitrogênio total, amoniacal, não protéico e protéico contido nos caldos testemunhas	70
Tabela 2 - Composição dos caldos de cana em relação aos teores de nitrogênio, fosfato inorgâni co e açúcar total	71
Tabela 3 - Teor de nitrogênio total, protéico, amonia cal e não protéico contidos no caldo em função do tratamento térmico	73
Tabela 4 - Remoção de nitrogênio total durante o tra tamento térmico do caldo	75
Tabela 5 - Remoção de nitrogênio protéico durante o tratamento térmico do caldo	78
Tabela 6 - Teor de fosfato inorgânico contido no cal do em função do tratamento térmico	82
Tabela 7 - População microbiana do caldo de cana.....	83
Tabela 8 - Teor de nitrogênio total, protéico, amonia cal e não protéico contidos no caldo em função da clarificação por defecação simples..	87

Tabela 9 - Remoção de nitrogênio total do caldo, durante o processo de defecação simples.....	89
Tabela 10- Remoção de nitrogênio protéico do caldo, durante o processo de defecação simples.....	91
Tabela 11- Teor de fosfato inorgânico contido no caldo, em função da clarificação por defecação simples	94
Tabela 12- Remoção de fosfato inorgânico do caldo, durante processo de defecação simples.....	97
Tabela 13- População microbiana do caldo, após clarificação por defecação simples	99
Tabela 14- Teor de nitrogênio total, amoniacal, não protéico e protéico contidos no caldo e vinho, em função do tratamento térmico	104
Tabela 15- Teor de nitrogênio total, amoniacal, não protéico e protéico contidos no caldo e vinho, em função da clarificação por defecação simples	105
Tabela 16- Teor de fosfato inorgânico contido no vinho e consumido em função do tratamento térmico	106

Tabela 17 - Teor de fosfato inorgânico contido no vinho e consumido em função do processo de defeca- ção simples	106
Tabela 18 - Influência do tratamento térmico na produ- ção de massa celular	108
Tabela 19 - Influência da defecação simples na produção de massa celular	109
Tabelas 20 a 25 - Parâmetros das fermentações de caldos testemunha, tratamento térmico e defecação simples	112 a 117
Tabela 26 - Eficiências de fermentação e de conversão em caldos com tratamento térmico.....	118
Tabela 27 - Eficiências de fermentação e de conversão em caldos com defecação simples	119

LISTA DE QUADROS

Página

Quadro 1 - Efeito do tratamento térmico do caldo no teor de nitrogênio total	74
Quadro 2 - Efeito do tratamento térmico do caldo no teor de nitrogênio protéico	76
Quadro 3 - Efeito do tratamento térmico do caldo no teor de nitrogênio amoniacal	79
Quadro 4 - Efeito do tratamento térmico do caldo no teor de nitrogênio não protéico.....	80
Quadro 5 - Teor de fosfato contido no caldo em função do tratamento térmico	82
Quadro 6 - Efeito do tratamento térmico do caldo na população microbiana	85
Quadro 7 - Efeito da defecação simples do caldo no teor de nitrogênio total	89
Quadro 8 - Efeito da defecação simples do caldo no teor de nitrogênio protéico	91
Quadro 9 - Efeito da defecação simples do caldo no teor de nitrogênio não protéico	92

	Página
Quadro 10 - Efeito da defecação simples do caldo no teor de nitrogênio amoniacal	93
Quadro 11 - Teor de fosfato contido no caldo em função da clarificação por defecação simples	95
Quadro 12 - Efeito da defecação simples do caldo na população microbiana	99
Quadro 13 - Eficiência de fermentação em caldos com tratamento térmico	120
Quadro 14 - Eficiência de conversão em caldos com tratamento térmico	120
Quadro 15 - Eficiência de fermentação em caldos com defecação simples	121
Quadro 16 - Eficiência de conversão em caldos com defecação simples	121
Quadro 17 - Efeito do tratamento térmico do caldo na população microbiana - Amostra 1	148
Quadro 18 - Efeito do tratamento térmico do caldo na população microbiana - Amostra 2	148
Quadro 19 - Efeito do tratamento térmico do caldo na população microbiana - Amostra 3	149

Quadro 20 - Efeito do tratamento térmico do caldo na população microbiana - Amostra 4	149
Quadro 21 - Efeito do tratamento térmico do caldo na população microbiana - Amostra 5	150
Quadro 22 - Efeito do tratamento térmico do caldo na população microbiana - Amostra 6	150
Quadro 23 - Efeito do tratamento térmico do caldo na população microbiana - Amostra 7	151
Quadro 24 - Efeito da defecação do caldo na população microbiana - Amostra 1	151
Quadro 25 - Efeito da defecação do caldo na população microbiana - Amostra 2	152
Quadro 26 - Efeito da defecação do caldo na população microbiana - Amostra 3	152
Quadro 27 - Efeito da defecação do caldo na população microbiana - Amostra 4	153
Quadro 28 - Efeito da defecação do caldo na população microbiana - Amostra 5	153
Quadro 29 - Efeito da defecação do caldo na população microbiana - Amostra 6	154

Página

Quadro 30 - Efeito da defecação do caldo na população microbiana - Amostra 7	154
Quadro 31 - Efeito da defecação do caldo na população microbiana - Amostra 8	155
Quadro 32 - Efeito da defecação do caldo na população microbiana - Amostra 9	155
Quadro 33 - Efeito da defecação do caldo na população microbiana - Amostra 10	156

1. INTRODUÇÃO

Desde a criação do PROALCOOL, a instalação de destilarias autônomas e ampliações de usinas para produção de álcool têm sido realizadas sem que sigam critérios técnicos, principalmente no que tange ao setor de tratamento do caldo de cana. Mais que as Instituições públicas ou privadas, as próprias indústrias vêm desenvolvendo pesquisas e adotando critérios segundo a conveniência particular de cada empresa. São conhecidos mais de uma dezena de processos de tratamento e inúmeros equipamentos modificadores desses processos, atualmente em uso. Todavia, a maior parte deles considera que o objetivo maior da clarificação é a eliminação da quantidade máxima de impurezas do caldo, procurando não afetar a composição química do mosto resultante.

Os agentes básicos mais utilizados na clarificação são o calor e a cal, e a aplicação em processo tem sido feita por analogia à clarificação do caldo para fabricação de

açúcar, somente em caráter mais brando em relação a cal, pois os efeitos destas operações na indústria do açúcar, são bem estudados. Por inexistirem trabalhos, nesta área, para fabricação de álcool, no tocante a alterações de composição química e, principalmente, remoção ou destruição de substâncias consideradas nutrientes para a fermentação alcoólica, este assunto vem sendo considerado dos mais polêmicos entre os técnicos do setor.

Quanto ao sucesso dos tratamentos térmicos e da defecação simples a pH em torno de 6,0, em relação à formação de espumas, consumo de antiespumantes, redução de microorganismos contaminantes, corrosão e abrasão em equipamentos, parece já haver quase um consenso de sua validade.

O objetivo do presente trabalho foi mostrar a influência do tratamento térmico e da defecação simples sobre as substâncias nitrogenadas e fosfatos, considerados principais nutrientes do caldo, bem como a qualidade microbiológica e todos estes fatores em relação à eficiência de fermentação e conversão.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Composição do Caldo de Cana

O caldo de cana apresenta composição extremamente variável em função da variedade, idade, estágio de maturação, sanidade da cultura, condições climáticas, natureza do solo, adubação, etc., o que torna imprescindível a determinação de sua composição química para uma boa condução do processo fermentativo.

Segundo PAYNE (1969), o caldo cru extraído das moendas é um dispersóide constituído de materiais em todos os graus de dispersão, desde partículas grosseiras até íons.

O material grosseiro disperso no caldo consiste principalmente de terra, partículas de bagaço e cera, e segundo a classificação de Von Weimarn e Ostwald, citados por PAYNE (1969), apresentam diâmetros superiores a 0,0001 mm.

A fração intermediária entre as dispersões grosseiras e os dispersóides moleculares e iônicos é constituída pelas proteínas, gomas, ceras, lipídios, pectina, taninos e materiais corantes que permanecem em solução coloidal. Também uma quantidade variável de matéria coloidal pode ser introduzida no caldo devido ao crescimento e ação dos microorganismos. A quantidade de matéria coloidal situa-se entre os limites de 0,05 e 0,30% do caldo, cujas partículas têm um diâmetro de 0,0001 a 0,000 001 mm.

Ainda de acordo com PAYNE (1969) as dispersões iônicas e moleculares incluem o açúcar e os constituintes das cinzas apresentando partículas de 0,000 001 mm e menores.

Segundo BENNETT (1957b), o caldo de cana é um sistema coloidal natural contendo muito material em suspensão e rico em proteínas e polissacarídeos solúveis; havendo, contudo, poucas referências concernentes à relação física entre estes vários constituintes.

As partículas suspensas no caldo de cana podem ser vistas ao microscópio e têm diâmetros acima de 6μ , estão presentes em densidades entre $2,5 \times 10^8$ e $1,2 \times 10^9$ partículas/ml. Um estudo do sedimento e do líquido sobrenadante obtido pela centrifugação de amostras do caldo a 1000g tem mostrado que cerca de 85% das partículas presentes apresentam diâmetros em torno de 2μ , enquanto somente 5% têm

diâmetros de 4μ ou maiores.

Quanto à natureza das partículas suspensas, BENNETT (1957b), classificou-as em dois tipos principais: (1) partículas cerosas, compostos principalmente de uma mistura de ésteres de álcool ceril com longas cadeias de ácidos graxos, mas contendo também apreciáveis quantidades de ácidos livres e alcoóis, alguns esteróis, fosfolipídeos, e resinas não identificadas, tendo a mistura um peso específico (1,2) maior que o meio de dispersão. (2) cloroplastos e polissacarídeos - ou gomas - contendo plastídeos lisados a partir da ruptura das células de cana. Partículas sedimentadas com $4-6\mu$ de diâmetro têm um alto conteúdo mineral (principalmente silicato) e devem formar um terceiro tipo de partículas presentes no caldo de cana, embora em pequena quantidade. Foi evidenciado que 50 a 75% de todas as partículas do caldo cru são do tipo cerosa.

A quantidade total da fase dispersa é pequena (0,25% p/p) e coloca o caldo de cana entre as "suspensões diluídas" ou soluções em que não é necessária a adição de estabilizador para prevenir a floculação espontânea. O sistema de partículas heterogêneas no caldo de cana é, contudo, eletroforéticamente homogêneo.

Além da diferença entre caldos de diferentes variedades de cana, a mesma cana pode produzir caldo de composição variável, segundo o grau de moagem (GEERLIGS, 1924

e SPENCER e MEADE, 1945). Este fenômeno é facilmente explicável pelos diferentes graus de dureza dos tecidos e pelos diferentes tipos de albúmen presentes na cana.

Segundo SPENCER e MEADE (1945) em moagens mais extensivas é maior a extração de não açúcares em relação aos açúcares. Contudo, estas variações na composição são mais quantitativas que qualitativas, mas em proporções variáveis.

Os sólidos do caldo podem ser divididos em açúcares, não açúcares inorgânicos (cinzas), e não açúcares orgânicos, mas segundo Fort e Mckaig, citados por SPENCER e MEADE (1945), não há uma divisão precisa entre os dois últimos. A quantidade de cinzas não é uma medida do teor de sal já que alguns sais estão presentes em combinação com não açúcares orgânicos.

DAVIES (1936) apresenta os seguintes limites de composição do caldo cru:

Constituintes

Água	-	77 - 88 %
Sacarose	-	8 - 21 %
Açúcares Redutores	-	0,3 - 3,0%
Outros compostos orgânicos	-	0,5 - 1,0%
Compostos inorgânicos	-	0,2 - 0,6%

Browne, citado por SPENCER e MEADE (1945) re-

lata a composição, dos colmos da cana de Louisiânia na época de colheita, novembro-dezembro.

Composição da Cana-de-Açúcar em Louisiânia, USA

Água.....	74,50%	74,50%
Cinzas.....	0,50	
	Óxido de sílico, SiO_2	0,25
	Óxido de potássio, K_2O	0,12
	Óxido de sódio, Na_2O	0,01
	Óxido de cálcio, CaO	0,02
	Óxido de magnésio, MgO	0,02
	Óxido férrico, Fe_2O_3	-
	Anidrido fosfórico, P_2O_5	0,07
	Anidrido sulfúrico, SO_3	0,02
	Cloro	-
Fibra.....	10,0	
	Celulose	5,50
	Pentosanas xilana	2,00
	(gomas) Arabana	0,50
	Lignina	2,00
Açúcar	14,00	
	Sacarose	12,50
	Dextrose	0,90
	Luvulose	0,60

Compostos

Nitrogenados..... 0,40

Albuminóides 0,12

Amidas (asparagina) 0,07

Aminoácidos (aspártico) 0,20

Ácido nítrico 0,01

Amônia -

Corpos xânticos -

Lipídeos e ceras.. 0,20 0,20

Pectina (gomas)... 0,20 0,20

Ácidos livres..... 0,08 0,08

Ácidos combinados. 0,12 0,12

Segundo GUPTA e PRASAD (1967), a qualidade da cana depende de muitos fatores tais como: variedade, tipo de solos, clima, adubação, irrigação, etc., tendo a variedade da cana um importante papel na absorção de minerais do solo. A absorção de vários nutrientes é em grande parte uma característica específica da variedade da cana que é influenciada pelas alterações climáticas e edafobiológicas.

Análises feitas por SHARMA e GUPTA (1970), demonstraram que o teor de cinzas foi maior no ápice que nas porções mediana e basal do colmo, apresentando uma contínua tendência a elevar-se durante o período de maturidade máxima, e mantendo-se a um nível normal para, depois de atingir um máximo, tender a um declínio.

Os referidos autores constataram que o teor

de açúcares redutores têm sido maior nos estágios iniciais de crescimento da cana. A distribuição máxima dos açúcares redutores do topo, base e a cana composta têm se tornado mais ou menos igual; após o período de maturação máxima os açúcares têm demonstrado uma tendência a aumentar, embora não na mesma extensão da cana não maturada. A tendência do teor de açúcares redutores decrescer coincide com a obtenção da maturação máxima.

De acordo com SPENCER e MEADE (1945), os não açúcares orgânicos do caldo são constituídos por lipídeos e ceras, substâncias nitrogenadas, gomas, ácidos orgânicos, he miceluloses, pentosanas, etc. A percentagem de não açúcares total pode ser obtida pela subtração da soma de sacarose, açúcares redutores, e cinzas dos sólidos verdadeiros. Os não açúcares orgânicos totais do caldo de cana de Louisiana variaram de 5,69 a 6,42 por cento de sólidos no caldo. A média baseada no próprio caldo foi de aproximadamente 1%.

2.1.1. Nitrogênio

Referindo-se à cultura de cana-de-açúcar, o nitrogênio afeta a composição, produção e migração de açúcares, havendo evidência que altos níveis de nitrogênio promovem uma diminuição na concentração de sacarose e aumento no teor de açúcares redutores (DAS, 1936; BORDEN, 1948; HARTT, 1970).

Na planta, o nitrogênio pode ser dividido em três grandes frações: N-inorgânico (N-NO_3 , N-NH_4), N-NH_2 solúvel e N protéico. Todas três frações são influenciadas pela nutrição da planta. Destas, o N-NH_2 solúvel (aminoácidos, aminas e amidas) é a fração mais variável em função de distúrbios nutricionais, sendo que o conteúdo de proteínas varia somente em condições extremas (GOSWAMI e WILLCOX, 1969; BEEVERS e HAGEMAN, 1969).

Em análises feitas por FORT e MCKAIG JR. (1939) em caldo de cana da Louisiana referente ao teor de nitrogênio, verificou-se que a mesma apresentava as seguintes variações:

	Mínimo	Máximo
Nitrogênio total	0,047%	0,40%
Nitrogênio protéico	0,033%	0,13%
Nitrogênio não protéico	0,021%	0,28%

Browne (1910), citado por SPENCER e MEADE (1945) determinou em época de safra a seguinte composição do colmo da cana da Louisiana com relação ao material nitrogenado:

Compostos Nitrogenados	% Colmo da cana
Albuminas e compostos similares	0,12
Aminoácidos	0,20
Aminoácidos-amidas	0,07
Amoníaco	-
Nitrato	0,01

Já Hardin, citado por FARNELL (1924), encontrou a seguinte distribuição correspondente ao nitrogênio:

Compostos Nitrogenados	% do caldo	% do total
Nitrogênio como albumina	0,0039	9,75
Nitrogênio em corpos de nucleína	0,0025	6,25
Nitrogênio como albumosas (proteoses)	0,0021	5,25
Nitrogênio em aminoácidos	0,0122	30,50
Nitrogênio em aminoácidos amidas	0,0098	24,50
Nitrogênio em amônia	0,0024	6,00
Nitrogênio em nitratos	0,0071	17,75
Total	0,0400	100,00

Browne e Blowin, citados por WIGGINS (1969), estimaram que na cana da Louisiana, o nitrogênio estava presente até a concentração de 0,05%. GEERLIGS (1924) estipulou 0,036% como média do nitrogênio no caldo de cana.

WIGGINS (1969), ao analisar uma cana madura da variedade B 37.161 verificou que os compostos nitrogenados se apresentavam em diferentes concentrações nas diversas partes da planta: as folhas verdes continham 0,8% de nitrogênio, na matéria seca, ou 0,32% em material fresco; 0,4% nas raízes dessecadas e os colmos apresentavam 0,084% na matéria seca ou 0,022% no material recentemente cortado. O caldo de cana extraído em moendas continha 0,018 g de nitrogênio/100 ml.

Com relação à distribuição do material nitrogenado no colmo da cana, GEERLIGS (1924) relata que as substâncias albuminóides estão concentradas nos nós, enquanto os compostos mais simples, aminoácidos-amidas, estão presentes em um grau mais pronunciado nos entrenós.

A cana-de-açúcar varia em sua composição em diferentes países, bem como em diferentes localidades de um mesmo país, e em diferentes anos na mesma localidade (SPENCER e MEADE, 1945).

No Havaí, LEE (1926) encontrou que o teor médio de nitrogênio de muitas amostras de raízes de cana era de 0,7%. GEERLIGS (1924) assinala que o teor de nitrogênio do caldo pode variar entre 0,018 e 0,062%. SPENCER e MEADE (1945) dão a cifra de 0,06% de nitrogênio para a cana da Louisiana.

BINKLEY (1959), ao reconstituir liofilizado de caldo misto bruto apresentou a seguinte composição em relação ao nitrogênio: nitrogênio solúvel, 0,304%; nitrogênio coagulável, 0,096%.

RAMCHANDER e RAO (1957), observaram que a cana-de-açúcar que cresce em solo ácido e seco fornece caldo que é caracterizado por baixo pH e grande teor de nitrogênio e não açúcares.

KOWKABANY et alii (1953), evidenciaram que pelo menos 75% da substância nitrogenada comporta-se como aminoácido; sendo a asparagina o aminoácido predominante, seguido pela alanina, ácido glutâmico e serina.

Segundo HONIG (1934), a presença de compostos nitrogenados no caldo é a metade daqueles encontrados na cana. A percentagem é muito maior no caldo da segunda e terceira moendas, mostrando que o grau de extração é de grande influência (GEERLIGS, 1924).

WILSON (1956), afirma que a composição de aminoácidos no caldo de cana é dependente da estação e do método de extração. Caldos obtidos por maceração contêm maiores percentagens que caldos prensados.

Segundo WIGGINS e WILLIAMS (1951), embora qualitativamente o quadro geral de aminoácidos tenha sido sempre o mesmo, a quantidade total de aminoácidos no ápice da cana é sempre maior, cai para um mínimo no centro do colmo e aumenta novamente na base. Os teores têm sido maiores nos estágios iniciais de crescimento e variam grandemente em diferentes variedades.

Os mesmos autores (1955), evidenciaram a presença de 9 aminoácidos livres em 12 variedades de cana da Índia. 38% do total de aminoácidos presentes no caldo de colmos de ápice verde foi de asparagina, totalizando 128,9 mg %.

Análises feitas por TAO-TZE et alii (1983), demonstraram que a concentração total de aminoácidos presentes no caldo dos colmos foi de 272,143 mg/100 g, sendo encontrados 19 aminoácidos protéicos, 3 aminoácidos relacionados a compostos fosfoserina, fosfoetanolamina e etanolamina e 7 aminoácidos não protéicos.

O nitrogênio protéico total de um dado caldo deve ser considerado em três termos: (1) nitrogênio protéico intrínseco (proteínas que fazem parte de cloroplastos e plastídeos e não disponíveis para adsorção. (2) nitrogênio protéico adsorvido (3) nitrogênio protéico dissolvido.

Segundo ROBERTS e MARTIN (1961), o teor de aminoácidos apresenta variação ano a ano, ao passo que a composição e o teor de proteínas apresentam-se constantes.

FARNELL (1924), estimou que a proteína constituía 0,73% dos sólidos solúveis do caldo cru, porém, somente 29,4% deste valor era matéria não dializável e, portanto, de verdadeira natureza protéica.

2.1.2. Fósforo

O fósforo presente no caldo de cana se apresenta nas formas inorgânica (fosfatos solúveis, íons fosfatos livres) e orgânica (fosfolipídeos, hexosefosfatos, fosfoproteínas), sendo a forma inorgânica fundamental no processo de

clarificação.

Segundo SERRA et alii (1974), os teores médios de fósforo inorgânico, na região canaveira de Piracicaba, variam de 70 a 130 mg de P_2O_5 por litro do caldo, no início do ciclo de maturação da cana, atingindo teores de 140 a 230 mg de P_2O_5 por litro de caldo, no fim do mesmo. O fósforo orgânico varia aproximadamente entre 10 a 35 mg de P_2O_5 por litro de caldo e seu teor geralmente representa 5 a 15% do fósforo total no caldo de cana.

CESAR et alii (1974), estudando o teor de fósforo de algumas variedades de cana-de-açúcar (segundo corte), encontraram variações de 38 a 53 mg de fósforo por litro de caldo o que corresponde a 87 a 121 mg de P_2O_5 por litro.

GLORIA e RODELLA (1972), encontraram teores médios de 18,36 mg P_2O_5 /100 ml nas amostras de caldo-de-cana analisadas.

O teor de fosfato é mais alto na ponta da cana que na base e na região mediana da cana. A distribuição de fosfato em várias porções indica que com o avanço da idade, o teor de fosfatos mostra uma tendência a aumentar a um máximo, seguido por um declínio após o período de maturação. O teor de fosfato, durante a máxima maturação, tem variado de 0,0269% a 0,0312% (SHARMA e GUPTA, 1970).

Em ensaios realizados em Java, por HONIG (1960),

foi verificado que o teor de fosfato é maior na parte basal da cana. As diferenças são de tal magnitude que quando o P_2O_5 na parte basal é 100, a parte mediana é aproximadamente 90 e o ápice 80.

SHARMA e GUPTA (1970), sugerem que o ápice da cana por possuir maiores percentagens de não açúcares orgânicos, deverá ter maior concentração de fosfato de natureza orgânica.

HONIG (1960), demonstrou que o nível de fosfato orgânico na cana e no caldo extraído de diferentes "campos" e variedades de cana, é mais uniforme que o fosfato inorgânico. O nível de fosfato orgânico é primeiramente uma função do grau de maturação da cana. O autor relata que o teor de fosfato orgânico, no ápice da cana, representa 15 a 25% do fosfato total.

2.2. Clarificação

A clarificação do caldo de cana tem sido uma técnica restrita às usinas de açúcar, e a literatura referente à purificação do caldo é voltada para essa prática nas usinas, com poucas alusões ao seu uso nas destilarias de álcool, visto ser quase que exclusivamente uma prática brasileira.

O caldo de cana bruto por apresentar alguma dificuldade na condução de sua fermentação, tem sido submetido

a diferentes sistemas de tratamento, dentre os quais a clarificação, consistindo das seguintes etapas: eliminação de impurezas grosseiras, aquecimento, caleagem, decantação, filtração e resfriamento do caldo, visando com isso, a remoção da máxima quantidade de impurezas do caldo nos estágios iniciais do processo.

O caldo de cana por ser uma suspensão coloidal irreversível poli-dispersa, isto é, uma solução em que as partículas suspensas apresentam não somente diferentes tamanhos, mas são, também, heterogêneas quanto à composição química; a carga negativa destas partículas estabiliza o sistema coloidal e previne a rápida sedimentação da fase dispersa (HIDI, 1969).

O fenômeno que ocorre na superfície das partículas durante o processo de clarificação é determinado, em grande parte, pela natureza da superfície da partícula.

Segundo DOOR e LASSETER (1946), os processos que levam à separação de fase numa suspensão, envolvem 3 etapas relativamente distintas: (1) desestabilização (2) agregação de partículas (3) sedimentação; cada uma dessas etapas pode ser grandemente influenciada pelas alterações na carga eletrostática destas partículas. Muita atenção tem sido dada com relação ao comportamento na sedimentação e o potencial zeta em soluções liofóbicas verdadeiras. Quando o potencial zeta é numericamente pequeno, a solução é instável e as partículas flo

culam e o volume do sedimentado é maior, ocorrendo o inverso quando o potencial zeta é grande (OVERBEEK, 1952).

BENNETT (1959), tem demonstrado em seus estudos com caldo de cana, que a estabilidade da suspensão é extremamente sensível as alterações no potencial zeta, quando o valor numérico deste é menor que 10 mV, mas foi observado que esta sensibilidade não tem sido devidamente explorada no processo de clarificação comercial. Neste caso, a floculação é causada pela precipitação de fosfato de cálcio e os flocos supõem-se que consistam de um aglomerado de partículas ligadas a uma matriz de precipitado inorgânico. Este processo não é acompanhado por nenhuma alteração especial no potencial zeta.

No processo de clarificação comercial, as alterações que levam a desestabilização e consequente agregação de partículas, são geralmente ocasionadas pelo aquecimento do caldo após adição de leite de cal.

KING (1931), sobre este assunto, afirma que as alterações fundamentais ocorrentes durante a clarificação do caldo são as seguintes:

- modificação na concentração do íon hidrogênio, pela adição do leite de cal ao caldo;
- floculação de algum colóide, pela alteração na concentração hidrogeniônica;
- floculação de colóides pelo calor;
- formação de compostos solúveis e insolúveis

de cálcio e seus respectivos complexos.

Se amostras de caldo bruto forem ajustadas a diferentes valores de pH entre 1 a 9, a floculação ocorre próximo ao pH 3,5 e acima do pH 6,0, não havendo diferença na aparência dos flocos quando esses são examinados microscopicamente. Contudo, estas precipitações ocorrem por razões inteiramente diferentes: a precipitação a baixo pH é devido ao ponto isoelétrico das partículas em torno do pH 3,3. Entre o pH 5,5 e 6,0, está associado com a precipitação do fosfato de cálcio e adsorção das proteínas presentes (BENNETT, 1957).

Muitas observações indicam que o grau de clarificação é consideravelmente influenciado pela completa neutralização de cargas.

Em trabalho realizado por HIDI (1969), foi demonstrado que as partículas presentes nos caldos clarificados turvos apresentavam cargas negativas, evidenciando-se, nesse caso, que a quantidade de fosfato de cálcio carregado positivamente através da caleagem não era bastante para a neutralização de todas as cargas nos colóides do caldo original. A adição de sal fosfato ácido solúvel extra, reduziu significativamente a turbidez do caldo clarificado através da completa neutralização de cargas dos colóides.

Aplicando-se o princípio da neutralização de cargas do colóide, foi também possível melhorar a clarificação dos caldos, simplesmente pelo aumento da concentração do íon

cálcio. O papel da adição de íon cálcio extra não é tanto pelo aumento da quantidade de fosfato de cálcio precipitado, mas o aumento da carga positiva no fosfato de cálcio formado, tornando-o mais eficiente na neutralização de cargas negativas.

Foi demonstrado por BENNETT (1957a), BENNETT e RAGNAUTH (1960), que as concentrações de cálcio envolvidas na caleagem são bem abaixo da concentração requerida para atingir o ponto isoelétrico dos colóides naturais do caldo, na faixa de pH neutro.

2.2.1. *Proteínas e Aminoácidos*

Em média, a cana-de-açúcar contém 0,02 - 0,06% de nitrogênio, dos quais 60% estão presentes como amônia e compostos amínicos. Os não açúcares contendo nitrogênio, presentes no caldo de cana são amida-aminoácidos, proteínas e aminoácidos. Alguns dos aminoácidos são removidos durante o processo de clarificação, enquanto outros permanecem e têm a tendência de reagir com açúcar invertido e produzir escurecimento (SHARMA e JOHARY, 1984).

Num ensaio feito por PÉREZ e GUTIERREZ (1977), com caldo de cana submetido a diferentes valores de pH, verificou-se que existem duas zonas máximas de eliminação de proteínas: uma compreendida entre os valores de pH 2 e 4, com um aparente máximo em 3, e, outra, entre 8 e 11 (com um máximo aparente em 9), já que a partir de 11 começa a diminuir sensivel

mente a coagulação. Estes resultados possibilitam a existência de "2 pontos isoelétricos" para as proteínas, um na zona ácida de pH, e, outro, na zona alcalina.

Para confirmar esta possibilidade fizeram - se estudos com solução de ovoalbumina, observando-se uma maior eliminação de proteínas entre valor de pH 4 e 5, sendo que a partir do pH 5 a concentração da solução sobrenadante tem uma tendência geral ao aumento, o que se deve a uma maior estabilidade das mesmas.

Ao se adicionar íons à solução de ovoalbumina nas concentrações correspondentes as existentes no caldo de cana, e, submetendo-se a variações de pH, observou-se que uma maior eliminação de proteínas ocorreu a valores de pH 6 e 8, com um máximo em pH 8. Os teores de proteína na solução sobrenadante em presença de íons são menores aos observados nos pH correspondentes em ausência de íons, principalmente, a pH 3, 6, 7 e 8. Esta maior eliminação se deve à ação de diferentes íons presentes e ao comportamento dos mesmos com relação ao pH. Conclui-se, portanto, que em solução de proteína pura, existe um máximo de coagulação na zona ácida, que se deve ao verdadeiro ponto isoelétrico da mesma, já que em solução de proteínas em presença de íons, existe um máximo de eliminação na zona alcalina, o que se deve à formação de um complexo químico de adsorção com os sais precipitados, principalmente os de cálcio.

Segundo REVA et alii (1983), vários fatores (OH^- , Ca^{2+} , adsorção em sais de cálcio, aquecimento de 20 e 85°C) contribuem para remoção da proteína durante a clarificação por defecação. Ao submeter caldo de beterraba a diversas condições de defecação tais como: a pH 6 - 12 a temperatura de 20 - 80°C , tratamentos com CaO , CaCl_2 , NaOH por 10 minutos a uma hora, constatou-se que a remoção de 70-90% das proteínas foi atingida a um pH ótimo de 11,4 - 11,5 e 30-38% se deve aos íons Ca^{2+} , 18 - 22% ao OH^- , 10 - 15% ao aumento de temperatura e 10-17% a adsorção no precipitado de sais de cálcio. Excessiva caleagem causou precipitação, diminuindo a remoção em aproximadamente 8%.

Num ensaio realizado por REVA et alii (1979), em que o caldo foi tratado com NaOH a pH 6-12,5 com e sem prévia adição de CaCl_2 (correspondente a concentração de Ca^{2+} na pré-defecação), observou-se que na ausência de Ca^{2+} , a remoção da proteína era de 17 - 20% a pH 11,4 e 26% a pH 12,5. Na presença de Ca^{2+} , essa remoção atingiu 48% sendo máxima a pH 11,4, e, com concentração equivalente a 0,2 - 0,3% de CaO . Nesse teste, a temperatura foi mantida a 20°C para evitar alguma desnaturação térmica e removeram-se íons oxalato, tartarato, citrato, fosfato para evitar adsorção pelos sais de cálcio.

STUDNICKY (1978), trabalhando com amostras de caldo de cana ajustadas a 17 valores de pH na faixa de 1,55-10,85 usando HCl e NaOH , e mantendo-se a 85°C por 30 minutos verificou a partir de análises feitas no lodo, que 60% do ni-

trogênio total foi removido a pH 2,5 e 37% do nitrogênio foi removido entre pH 7 e 8.

VEGA (1957), encontrou que variando o pH de 1 a 7 e a temperatura de 20 a 80°C havia um intervalo de pH entre 3,2 e 3,4 para o qual a eliminação de proteínas era máximo. Variando a temperatura, a diferença na eliminação de impurezas era pequena; se bem que a 60°C se eliminava a maior quantidade de proteínas para todo o intervalo de pH.

Segundo FARNELL (1924), num sistema contendo duas ou mais substâncias anfóteras, a máxima precipitação está situada entre os pH dos pontos isoelétricos dos componentes individuais. De acordo com essa teoria o ponto isoelétrico do caldo de cana deve estar situado entre pH 3 e 6,1, visto que algumas das substâncias anfóteras que constituem o sistema são as seguintes:

	<u>pH</u>
Albumina desnaturada	5,5
Ácido aspártico	3,0
Asparagina	5,5
Glicina	6,1

SPENCER e MEADE (1945), constataram que a maior eliminação de compostos nitrogenados tem ocorrido a pH 6,5, utilizando-se o método de caleagem fracionada com duplo aquecimento.

KING (1931), ao proceder caleagem a pH mais bai-

xos em canas verdes e nas porções superiores de canas velhas, verificou que a maior remoção de nitrogênio foi conseguida a pH 6,5, e em canas onde o teor de nitrogênio era alto devido a não maturação, a melhor clarificação foi obtida a pH abaixo de 7,0. Os dados obtidos na eliminação de nitrogênio parecem indicar que o ponto isoelétrico se encontra entre 6,5 e 7,0.

Ao contrário de DEER (1916), que ao submeter caldo de cana ao aquecimento durante 30 minutos e variando as quantidades de CaO para obtenção de diferentes pH na faixa de 6,9 a 9,4, observou uma percentagem maior de remoção do nitrogênio total a medida que o pH aumentava:

<u>pH</u>	<u>% de N total removido</u>
6,9	13,9
7,6	26,4
7,8	34,3
8,8	36,8
9,4	43,4

PAYNE et alii (1928), também concluíram que a eliminação de colóides é inquestionavelmente maior em altos valores de pH. Aumentos nas quantidades de cal causaram uma maior eliminação de colóides.

Segundo WIGGINS (1969), há na cana proteínas de diferentes pontos isoelétricos, já que algumas são separadas no processo cal-calor de clarificação, enquanto que outras têm permanecido no caldo.

Segundo VEGA (1957), o sedimento obtido em meio ácido é mais rico em proteínas que o obtido com tratamento alcalino

Ainda VEGA (1957), ao estudar a ação do calor sobre o caldo ácido na dupla clarificação, concluiu que 50% das proteínas tiveram seu ponto isoelétrico em meio ácido e as 50% restantes em meio alcalino.

Ao se aquecer o caldo em meio alcalino, precipitam as proteínas de ponto isoelétrico alcalino, precipitando só parte (a metade) das de ponto isoelétrico ácido, que por não estarem a pH apropriado, se hidrolisam em parte, solubilizando-se.

Um balanço nitrogenado realizado numa Usina de Trindade, constatou que aproximadamente metade do nitrogênio protéico solúvel originalmente presente no caldo misto, era removida durante o processo de clarificação (BENNETT, 1957a).

SKOLA (1923), evidenciou que na caleagem a frio foi eliminado 3,9% do nitrogênio original presente, havendo um aumento para 5,7% pela adição de cal ao caldo a 80°C.

REVA e SIMAKHINA (1978), ao estudarem a relação entre pH, % CaO e % de remoção da proteína durante a defecação a temperatura de 20 - 80°C durante 10 - 60 minutos, verificaram que a máxima remoção de proteínas foi observada a concentração de 0,12 - 0,13% de CaO (pH 11,4 - 11,6) tendo sido removido 90% da proteína a 80°C e 75-82% entre 20-40°C.

LAPIN et alii (1978), ao clarificarem caldo de

beterraba através do esquema clássico, em que a concentração de cal total é de 2,5 - 3,5% de CaO no caldo, e por um esquema em que parte dessa mesma concentração de cal foi adicionada a uma segunda defecação a 95 - 96°C por 0 - 20 minutos, verificou que a percentagem de remoção de não açúcares foi de 26-27% para o esquema clássico, e, acima de 36 - 37% para o segundo esquema tanto em laboratório quanto na usina.

De acordo com PAVLAS e HAUSLEROVA (1956), a defecação e saturação removem em média 97,7% das proteínas presentes e 59,6% dos produtos de decomposição ou 91,4% no total.

A decomposição alcalina durante a clarificação do caldo produz não somente albuminas e peptonas, mas também peptídeos e aminoácidos.

Em experimento realizado por PEREZ et alii (1978), foi verificado que durante a clarificação houve uma redução do nitrogênio protéico como resultado de sua remoção durante o referido processo, podendo também produzir-se uma degradação das proteínas, que é manifestado por um aumento no teor de peptídeos de 0,155 (% Brix x 10³) para 0,333 (% Brix x 10³) no caldo clarificado.

Pesquisas realizadas por ZAKHAROV et alii (1983), demonstram que durante a principal defecação a 85°C, cerca de 80% do nitrogênio total é eliminado nos primeiros 5 minutos. A percentagem de eliminação global do nitrogênio através de vários esquemas de purificação é no máximo de 36,8%.

STEVENS (1955), constatou que cerca de 39,56% das proteínas presentes no caldo misto são removidas durante a clarificação por caleagem a quente, e os outros 60% do nitrogênio protéico, juntamente com nitrogênio amínico e de amidas passam para o xarope. Concluindo-se, que a maioria do nitrogênio que entra na usina passa para o melaço, que há pouca hidrólise da proteína e aminoácidos no processamento e que pouco nitrogênio da amida é liberado como amônia.

HONIG (1969), também sugeriu que cerca de 60% do nitrogênio presente no caldo de cana não são elimináveis durante o processo de defecação.

O fato dos compostos nitrogenados se acumularem no melaço é observado quando se faz a dosagem do teor de nitrogênio no melaço.

Uma amostra de melaço da usina de Trindade foi analisada por WIGGINS (1969) quanto à concentração de nitrogênio, sendo encontrado o valor de 0,47% dos quais 0,135% poderiam ser classificados como pertencentes a substâncias nitrogenadas coloidais, e, 0,333% a substâncias capazes de existir em solução verdadeira.

WIGGINS (1969), considerou que 80% das albuminas foram eliminadas no tratamento pelo calor, porém SEIP (1928), afirmou que na defecação do caldo de cana se removeram somente 25% dos colóides de todos os tipos.

Segundo DEER (1916), a quantidade de matéria coloidal que existe no caldo cru está nos limites de 0,02 e 0,29%. A clarificação pode fazer com que essa quantidade aumente ou diminua, porém em média se consegue a eliminação aparente de 10 a 15% (KING, 1931; PAYNE e KEANE, 1927; PAYNE et alii, 1928).

GUAZON (1935), relata que no processo de defecação com cal, a percentagem de eliminação do colóide varia de 10 a 32% com uma média de 15,6%.

De acordo com PAYNE (1969), o nitrogênio removido na clarificação pode variar de 12,5 a 60%, porém a média geral de separação é de um terço. As proteínas são quase completamente precipitadas, ao passo que os aminoácidos simples permanecem em solução.

SPENCER e MEADE (1945), provaram que a eliminação de proteínas varia em diferentes variedades de cana e em diferentes métodos de clarificação. Com processo regular de defecação (caleagem a frio), a variedade BH 10 - 12 mostrou uma eliminação de 83% da proteína e a POJ 2878 54%, mas com o método de caleagem fracionada e duplo aquecimento, a variedade BH apresentou uma remoção de proteína de 94% e a POJ 2878 84%.

Em estudo de FARNELL (1924), sobre o efeito da caleagem fria e com ebulição na remoção de proteínas no caldo ca cana, foi constatado uma maior precipitação (cerca de 23%)

na caleagem por ebulição que na caleagem a frio (cerca de 6%).

Já GUAZON (1935) e KING (1931), afirmam que não há nenhuma vantagem em se aquecer o caldo antes ou após a caleagem, com relação à remoção de não açúcares.

Segundo SATYANARAYANA (1952), a quantidade de nitrogênio removido por vários métodos de clarificação, sob diferentes condições, têm sido relativamente constante: cerca de 30% do nitrogênio total, presente no caldo de cana. Essa quantidade é aproximadamente a mesma que é removida através da ebulição do caldo de cana.

Assim, proteínas coaguláveis pelo calor são eliminadas, mas o teor de nitrogênio solúvel não protéico é inalterado (SATYANARAYANA, 1952).

De acordo com BENNETT (1957a), 50% da proteína disponível no sistema (proteína dissolvida e adsorvida) é precipitada durante a ebulição.

HARDY (1927), tem assinalado que dos não açúcares presentes no caldo de cana, cerca de 9% são proteínas, 9,5% aminoácidos e 15,5% amidas de aminoácido. Os aminoácidos e suas amidas existem no caldo na forma de solução verdadeira, porém nesse meio as proteínas são coloidais. Quando o caldo de cana é clarificado através de cal e aquecimento, algumas das proteínas se coagulam e se separam durante a decantação, junto com os precipitados inorgânicos, porém, outras permane-

cem no estado coloidal.

VEGA (1957), observou que ao se aquecer um caldo a 100°C, em que se fez um tratamento ácido, houve uma redução de nitrogênio protéico em torno de 46 partes por 100 partes de proteína e um aumento no teor de nitrogênio solúvel, concluindo-se que a redução do nitrogênio protéico se deve não a sua eliminação e sim a sua solubilização. Ao se efetuar a sua clarificação ácida a quente, elimina-se o mesmo nitrogênio que a frio, apesar do restante das proteínas elimináveis que permanecem dispersas se hidrolisarem, passando a formar polipeptídeos ou talvez aminoácidos não elimináveis.

YADAV et alii (1982), constataram que a clarificação do caldo não afetou a produção de etanol. A velocidade de fermentação e rendimento aumentaram quando da adição de 200-1.000 ppm de uréia ou pela redução da borra de levedura.

SAIGAL e VISWANATHAN (1980), ao estudarem o efeito da clarificação de melaços por diferentes métodos químicos na fermentação alcoólica, observaram um aumento na eficiência da fermentação em torno de 10 a 14%.

Segundo BENNETT (1957a), certos açúcares, incluindo a sacarose, estabilizam as proteínas contra a precipitação. No aquecimento do caldo bruto, 50% da proteína total solúvel não é precipitada, mas neste caso não é possível concluir que o efeito seja inteiramente devido à presença de sacarose; pode ser que algumas proteínas presentes no caldo não

sejam coaguláveis pelo calor, na ausência de açúcares.

Entretanto, VASATKO e DANDAR (1971), afirmam que aumentando-se o teor de sacarose numa faixa de 0-15%, observa-se certo efeito benéfico na remoção de compostos nitrogenados, mas aumentos acima desses limites têm efeito oposto.

ZHURA e ZAGAIKEVITH (1967), ao submeterem uma solução contendo sacarose e concentrações conhecidas de glutamina e asparagina à carbonatação com subsequente aquecimento a temperatura constante de 100, 110 ou 120°C, observaram que permaneceram na solução aproximadamente 80% da asparagina original, mas somente 14-25% de glutamina original.

De acordo com BENNETT (1957b), a glutamina é hidrolizada a ácido glutâmico durante o aquecimento em todos os valores pH, podendo o mesmo processo ocorrer quando resíduos de glutamina fizerem parte da cadeia de polipeptídeos.

STANEK (1921), demonstrou que nas usinas que processam beterraba, os ácidos aspártico e glutâmico são os que se precipitam, ao menos parcialmente, durante a defecação. As amidas, tais como a asparagina e a glutamina se decompõem durante o tratamento cal-calor, formando amoníaco e os correspondentes aminoácidos.

A variação do teor de polissacarídeos guarda certa semelhança com a variação no teor de proteínas até um pH 9, o que pode dever-se à formação de um complexo proteína-

polissacarídeo, e a ação indireta sobre os polissacarídeos daqueles fatores que influenciam as proteínas (BENNETT, 1957).

BENNETT (1957b), afirma que grande quantidade de polissacarídeos e proteínas foram encontrados no sedimento centrifugado do caldo bruto, sendo o teor de nitrogênio total determinado pelo método de Micro-Kjeldahl, da ordem de 10 mg.

O referido autor também relata, que polissacarídeos solúveis presentes no caldo de cana não são removidos sob condições de defecação.

As condições de colheita (tempo chuvoso ou seco) influenciam na composição do material que causa turbidez em caldos de cana já clarificados: em caldos defecados de uma variedade colhida em tempo seco, 78% do material no sedimento centrifugado era orgânico e 8% era sílica; enquanto a mesma variedade colhida após período chuvoso apresentava uma turbidez constituída de 41% de sílica e 42% de material orgânico, sendo que a proporção de proteína em relação a outros materiais foi de 28% (FORT e SMITH, 1954).

Ainda de acordo com FORT e SMITH (1954), o nitrogênio ou proteína presentes no precipitado após centrifugação do caldo previamente clarificado, está numa concentração relativamente pequena, pois a maioria do nitrogênio permanece no caldo como aminoácidos e amidas solúveis.

Segundo DOBRZYCKI (1982), 30-40% da eliminação de não sacarose durante a purificação pode decrescer para 25% se a chuva for escassa durante a vegetação tardia, levando o caldo bruto a apresentar alto brix, baixa pureza, alto teor de nitrogênio, particularmente N-amida.

Não somente a clarificação por métodos químicos é capaz de promover a eliminação de material proteináceo do caldo; métodos físicos tais como a centrifugação possibilitam tais remoções.

VIGNES e FROBERVILLE (1960), ao submeterem o caldo de cana a centrifugação a 3.800 rpm constataram uma remoção de cerca de 30% das proteínas presentes.

SHUKLA e PRABHU (1961), ao centrifugarem caldo de cana a 3.000 rpm, observaram que cerca de 0,7 g/l de proteína permanecem em solução.

SAIGAL e VISWANATHAN (1980), promoverem a centrifugação de melaços não clarificados por 30 minutos a 10.000 rpm, verificaram uma redução no teor de sólidos totais em cerca de 2% em relação ao decantado.

BENNETT (1957b), ao estudar o precipitado obtido pela centrifugação de amostras de caldo de cana, observou que o material proteináceo adsorvido na superfície de partículas cerosas não é removido pela lavagem do centrifugado.

Como outros não açúcares orgânicos e inorgânicos, os aminoácidos são também removidos em diferentes proporções durante os vários processos da clarificação do caldo de cana.

Segundo SHARMA e JOHARY (1984), pouca atenção tem sido dada ao componente dos aminoácidos durante o curso da clarificação; nenhum estudo sistemático e detalhado tem sido feito a respeito da variação do nível de aminoácidos.

De acordo com REINEFELD et alii (1982), há sem exceção uma redução no teor de aminoácidos durante a clarificação do caldo. Alguns aminoácidos como a ornitina e lisina, que tomam parte preferencialmente na reação de Maillard, têm um decréscimo muito grande.

Amostras de lodo contém cerca de 50% do total de aminoácidos eliminados durante a clarificação do caldo.

SHARMA e JOHARY (1984), verificaram que cerca de 24% do total de aminoácidos presentes no caldo misto, podem ser eliminados através de uma simples defecação. Esse fato pode ser devido à remoção de uma categoria particular de aminoácidos, juntamente com a matéria coloidal que tendo um ponto isoelétrico na faixa de pH 5,5 e 7,0 poderia ser coagulado ao se trazer o pH do caldo misto a 7,0.

Um outro aspecto observado é que a remoção de

aminoácidos durante a sulfitação, aumentou à medida que se aumentou a concentração de CaO de 0,5% a 4%, sendo que a maior remoção de aminoácidos (42%) foi observada a 2%; a partir desse valor, a retirada de aminoácidos permaneceu mais ou menos constante. Essa pequena variação é atribuída a alta solubilidade dos aminoácidos na presença de quantidades crescentes de leite de cal e/ou a uma menor velocidade de formação de melanoidinas, na presença de grandes quantidades de sulfito de cálcio no precipitado e/ou no estado dissolvido.

Os mesmos autores, também constataram que ao se reduzir o pH do caldo misto com SO_2 , antes da caleagem, grande quantidade de aminoácidos foi removida, atingindo valores próximos a 50% a pH 4,0. Isto pode ser devido à floculação de um grande número de colóides liofílicos sob condições ácidas e os aminoácidos presentes podem ter sido removidos juntamente com esses colóides. Esta suposição é baseada na observação de que a maioria das substâncias contendo nitrogênio em caldo de beterraba são floculadas em meio ácido. Verificou-se, ainda, que a máxima eliminação de aminoácidos ocorreu em caldos mistos que apresentaram uma concentração de 400 ppm de P_2O_5 . Valores menores que este, exibiram uma eliminação baixa, enquanto níveis de fosfato maiores que 400 ppm não revelaram um aumento significativo na percentagem de remoção.

Caldos deficientes em fosfato caracterizam-se por apresentar alta concentração de aminoácidos.

Com relação ao pH, observaram maior remoção

de aminoácidos a pH 6,5 durante a pré-caleagem do caldo misto e uma menor remoção em meio básico (pH 7 e 8) em relação ao controle; podendo esse fato estar associado com a coagulação de certos colóides próximo àquele pH. Segundo ROBERTS e CASERIO (1965), um grande número de aminoácidos tem seu ponto isoelétrico na faixa de pH 5,5 a 6,5 e não em pH alcalino. Além disso, a maior solubilidade de muitos aminoácidos em meio alcalino, como indicado por OLBRIICH (1963), poderia também contribuir para sua menor remoção a pH 7-8 durante a pré-caleagem.

A variação no teor de aminoácidos durante diferentes processos de clarificação, foi estudado em laboratório por SHARMA e JOHARY (1984), sendo que o processo de sulfitação foi o que removeu maior percentagem de aminoácidos, seguido pela carbonatação ou defecção. A pré-caleagem removeu cerca de 49,6% de aminoácidos.

KUBADINOW e HAMPEL (1975), pesquisando a degradação de aminoácidos durante a clarificação do caldo, constataram que quase todos os aminoácidos sofreram degradação; então, não se pode esperar encontrar aminoácidos no melaço, da mesma forma que ocorre no caldo bruto. Glutamina e asparagina foram os que mais sofreram hidrólise. As alterações nas concentrações dos aminoácidos resultaram tanto de reação química quanto do fenômeno da adsorção.

Segundo SULLIVAN (1978), a taxa de degradação da glutamina após caleagem do caldo de beterraba foi estimada em 40%.

De acordo com AGARWAL e JOHARY (1974), a concentração de aminoácidos total em caldos brutos ou clarificados, diferem grandemente entre usinas e variedades de cana. Clarificação por sulfitação remove 20-30% dos aminoácidos, a inclusão de pré-caleagem com ou sem adição de fosfato aumentou essa remoção.

RODRIGUEZ et alii (1979), ao submeterem xarope de cana ao aquecimento a temperaturas de 70-100°C, em meio alcalino (pH 7-10) durante 1-5 h, evidenciaram uma redução no teor de aminoácidos em 30-80% e conversão de açúcares redutores a ácidos orgânicos, aumentando a ação tampão.

2.2.2. Fosfatos

O fósforo é considerado um dos elementos mais importantes para obtenção de uma clarificação eficiente do caldo de cana, pois contribui para formação de compostos praticamente insolúveis, responsáveis pela adsorção, aprisionamento e arrastamento das impurezas presentes no caldo (DELGADO et alii, 1973a; KLAN, 1965).

A extensão em que os colóides do caldo podem ser eliminados por adsorção, depende da quantidade do precipitado de fosfato de cálcio formado, e que por conseguinte depende da concentração de íons fosfato no caldo (GUPTA e PRASAD, 1967; JANAKIRAMAIAH et alii, 1967; BOND, 1925).

PAYNE et alii (1928), em experimentos feitos durante os meses de janeiro a maio, verificaram que os caldos crus variavam consideravelmente na composição particularmente quanto ao teor de fosfato. O fosfato, sendo um constituinte importante na clarificação por defecação, mostrou uma relação linear com relação à eliminação de colóides. O aumento na eliminação de colóides com altos teores de fosfato era acompanhado por um aumento no peso e volume de lodo.

Todos os compostos de fosfato no caldo, que são prontamente capazes de fornecer íons PO_4^- , são ditos disponíveis ou efetivos. Segundo Rao e Shankar (1940), citados por JANAKIRAMAIAH et alii (1967), somente os fosfatos em solução verdadeira ou aqueles que entram em solução durante o aquecimento do caldo, são realmente efetivos, já que somente esse fosfato irá reagir com CaO adicionado.

Segundo SPENCER e MEADE (1945), durante as operações de clarificação do caldo, parte do fosfato considerado na forma orgânica pode se hidrolisar, tornando-se disponível.

De acordo com JANAKIRAMAIAH et alii (1967), o teor de fosfato inefetivo é geralmente baixo, mas quando o total de fosfato é também baixo, o inefetivo pode atingir a metade do total.

O caldo deve apresentar um teor mínimo de 300-350 mg de P_2O_5 /litro, para que o mesmo clarifique eficientemen

te (BENNETT e RAGNAUTH, 1960; HONIG, 1960; GUPTA et alii, 1965; JANAKIRAMAIAH et alii, 1967; PAYNE, 1969; DELGADO et alii, 1973a; SILVA Jr., 1976).

Tem-se observado que o teor de fósforo de muitas variedades de cana estão sempre aquém do preconizado na literatura (BENNETT e RAGNAUTH, 1960; CÉSAR et alii, 1972; DELGADO et alii, 1973b; CÉSAR et alii, 1974; GUIMARÃES e SILVA, 1976; SILVA Jr., 1976).

Segundo WALKER (1923), SALINAS (1946) e SHARMA et alii (1981), uma adubação fosfatada contribui para o aumento de P_2O_5 no caldo, aumentando a eficiência da clarificação, sendo ainda muito mais efetivo que aquele adicionado no processo de clarificação.

O processo de clarificação se baseia, fundamentalmente, na precipitação de fosfato de cálcio em determinadas condições de pH e temperatura. O precipitado arrasta os não açúcares presentes, ao mesmo tempo que atua como adsorvente durante o processo (PÉREZ e GUTIERREZ, 1977).

BENNETT e RAGNAUTH (1960), sugerem que são estabelecidas ligações entre fosfato de cálcio e partículas adjacentes; a união das partículas ao precipitado ocorre através de íons Ca^{2+} , os quais são ainda ligados à superfície da partícula pela proteína adsorvida. O número de partículas floculantes depende da quantidade de fosfato precipitado, havendo,

portanto, um nível de fosfato abaixo do qual uma completa floculação não poderá ser atingida.

HONIG (1950), estudando o comportamento do fósforo no processo de clarificação, constatou que durante a caleagem do caldo há maior precipitação desse elemento na forma de fosfatos insolúveis de cálcio e magnésio entre pH 6,8 - 7,8, devendo ocorrer a precipitação máxima de P_2O_5 em torno do pH 7,5 com valores mais altos, conforme o pH da caleagem aumente ou diminua, em relação ao referido valor.

Análises feitas por KING (1931), em caldos que sofreram caleagem a pH 9,5 ou 10 e, posteriormente, foram tratados com ácido acético a fim de reduzir a alcalinidade, para determinar a redissolução da matéria precipitada e a influência do íon cálcio, foi observado que havia uma maior eliminação de fosfato a um determinado pH, quando excesso de íon cálcio estava presente. Abaixo do pH 7,5 havia uma rápida redissolução dos fosfatos. Também foi constatado que se o caldo for caleado a altos valores de pH e a alcalinidade for reduzida durante o aquecimento e sedimentação, os fosfatos ressolubilizarão, se o precipitado não for removido.

A precipitação de fosfatos parece ser uma função de ambos: concentração de íon hidrogênio e quantidade de íon cálcio.

Segundo DEBÉN (1976), o processo de precipita -

ção é controlado pelo equilíbrio da reação:

como primeira etapa da reação. Esta reação pode proceder muito rapidamente da esquerda para direita, devido a sua característica puramente iônica. O fosfato de cálcio sólido assim formado é um precipitado instável e incompatível com a fase de solução. Uma secundária e mais lenta reação ocorre entre as duas fases, em que o sólido fixa sobre si mesmo ou co-precipita uma metade adicional ou suplementa a retirada de cálcio da solução.

Segundo HONIG (1969), o fosfato inorgânico adicionado ao caldo é 99% precipitado pela caleagem a pH 8,5, mas o fósforo presente na cana planta é 90% precipitado. Para canas fisiologicamente velhas e canas ácidas, a precipitação é ainda maior. Estes resultados indicam que na cana normal, cerca de 10% do fósforo, não está na forma de fosfato iônico e sim provavelmente presente em um número de compostos orgânicos.

Em análises feitas por GRUSZECKA (1983), em caldo clarificado, foi verificado que este continha cerca de 60 ppm de P_2O_5 , sendo a proporção de fósforo inorgânico para orgânico de 0,5 para 1,3.

Foi demonstrado por HONIG (1952), que o teor de fosfato orgânico em caldos clarificados, em Java, foi de

20-30 mg de P_2O_5 /litro, estando grande parte presente como hexosesfosfato. A concentração de fosfato inorgânico foi de

Ainda de acordo com HONIG (1952), a concentração de fosfato dissolvido em solução de sacarose pura, com 10-20° Brix, após adição de fosfato inorgânico e precipitação com leite de cal a pH 6,5 a 7,0 ou 8,0 foi de apenas poucos mg/litro, a pH 6,0 após ebulição e sedimentação, o fosfato dissolvido não é maior que 10 mg P_2O_5 /litro.

2.3. Microorganismos

2.3.1. *Leveduras*

Segundo MORRIS (1958), um suprimento extracelular de material nitrogenado é essencial para contínua produção de novo protoplasma e as leveduras geralmente obtêm este elemento, de substâncias relativamente simples, tais como: sais de amônio, aminoácidos, nitratos e amidas, embora hajam evidências de que dipeptídeos e polipeptídeos possam também ser assimilados.

Segundo STUPIELLO e HORII (1981), quando há uma limitação de nitrogênio, o crescimento celular é diminuído e, como consequência, uma significativa parte de glicose poderá ser convertida em glicogênio, além do fato de que em ausência de nitrogênio a velocidade de fermentação diminui, aumentando

consequentemente o tempo de fermentação e diminuindo a produtividade.

O nitrogênio deve aparecer em níveis da ordem de 300-350 ppm de nitrogênio total, ocorrendo um residual da ordem de 30 a 50 ppm de nitrogênio total.

O teor de nitrogênio nas leveduras é cerca de 10% do peso da matéria seca e como tal, representa um importante constituinte no meio (JONES et alii, 1981).

Em experimento realizado por WICKERHAM (1946), utilizando 1.700 linhagens de leveduras, foi observado que todas as linhagens são capazes de utilizar três fontes de nitrogênio: sulfato de amônio, uréia e asparagina.

Comparando a influência de diferentes sais de amônio no crescimento da levedura, PIRSCHALE (1930), constatou que o di-amônio-fosfato promove o crescimento da levedura mais eficientemente. Sendo também utilizado com facilidade e bom aproveitamento os seguintes sais de amônia: fosfato; bicarbonato, acetato, lactato e tartarato de amônio; mono, di e tri-amônio fosfato. O cloreto de amônio tem se mostrado inferior a outros sais de amônio.

Em ensaio realizado por FULMER et alii (1921), para determinar a melhor concentração dos vários sais de amônio para o ótimo crescimento da levedura, foi observado que o cloreto, sulfato, nitrato e tartarato de amônio apresentaram

a mesma concentração ótima, que é aquela concentração de sal correspondente ao valor calculado de 0,060% de amônia, sendo portanto dependente somente da concentração do cátion. Todos os 4 sais se mostraram igualmente efetivos para o crescimento da levedura.

JONES et alii (1981), postulam que as leveduras são capazes de utilizar íons amônio como única fonte de nitrogênio, embora algumas leveduras requeiram adição de aminoácidos específicos.

O sulfato de amônio é a fonte de nitrogênio mais utilizada nas fermentações industriais.

Segundo SMYTHE (1939), a asparagina e glutamina exercem um efeito estimulante nas células de levedura semelhante aos sais de amônio. Sendo evidenciado que o NH_4^+ reduz o período de indução em meio glicosado fermentado por extrato de levedura.

A assimilação de fontes de nitrogênio por 16 culturas de Sporotrichium schenenckii, na fase leveduriforme, foi estudada por MINAMI (1975), sendo utilizados como fontes de nitrogênio, uréia, cisteína, glicina, triptofano, nitrato de potássio, sulfato de amônio, peptona e asparagina. A peptona, asparagina e sulfato de amônio foram assimilados por 15 das 16 culturas. A uréia, cisteína e glicina por 14 e o nitrato por 7 culturas somente. O triptofano não foi assimilado por nenhuma cultura.

O valor nutritivo de 25 compostos químicos como fonte de nitrogênio para duas linhagens de levedura foi pesquisado por THORNE (1933) sendo evidenciado que a asparagina, ácido aspártico e fosfato de amônio eram igualmente efetivos. Uréia e ácido úrico foram considerados medíocres.

Já SCHULTZ e POMPER (1948), afirmam que a uréia é uma fonte de nitrogênio tão efetiva quanto o sulfato de amônio. Segundo SUOMALAINEN e OURA (1971), REED e PEPPLER (1973), S. cerevisiae é incapaz de assimilar nitrato e nitritos.

SURDIN et alii (1965), constataram que os íons amônio inibem a absorção de aminoácidos e, conseqüentemente, quando a amônia é usada na propagação comercial, alguns aminoácidos presentes não são eficientemente removidos do meio.

HARTELIUS (1938), postula que na presença de sulfato de amônio, a levedura assimila amino e amido-nitrogênio de ácido aspártico e asparagina duas vezes mais rápido que o nitrogênio amoniacal obtido de sais de amônio.

De acordo com THORNE (1949), em meio que contenha aminoácidos e sal de amônio, o consumo de nitrogênio amoniacal é 1,5 vezes mais rápido que o nitrogênio da amônia.

Entretanto, BURKHOLDER et alii (1944), evidenciaram que mistura de aminoácidos são uma fonte de nitrogênio mais eficiente que íons amônio, sendo a assimilação de nitrogênio

de aminoácido 5 a 10 vezes a de nitrogênio amoniacal.

Purinas, pirimidinas e peptídeos são prontamente assimilados pelas células de levedura aumentando a produção de biomassa (BURKHOLDER et alii, 1944 e SCHULTZ et alii, 1949).

Greve (1960), citado por ARAÚJO (1970), baseado em experiência de multiplicação de leveduras, evidenciou que a assimilação do nitrogênio é sincrônica à síntese de proteínas e reprodução celular.

VAIRO et alii (1975), ao adicionarem concentração conhecida de sulfato de amônio em cultura contínua de Sacharomyces cerevisiae, observaram um aumento considerável na concentração microbiana, indicando que a fonte de nitrogênio era o fator limitante do crescimento do microorganismo.

WILLIAMS et alii (1940), e BURKHOLDER et alii (1944), afirmam que fontes de nitrogenadas complexas, tais como mistura de aminoácidos, peptídeos, ácidos nucleicos têm produzido um aumento na concentração celular e fermentação pelas leveduras.

Segundo NIELSEN (1935), a levedura assimila cerca de 40-50% do nitrogênio total do mosto, sendo este principalmente nitrogênio amínico.

Em ensaios de fermentação alcoólica realizados

por MAGALHÃES et alii (1980), a adição de sulfato de amônio ou de uréia ao mosto de melaço acarretou aumento, tanto na quantidade de proteína produzida pela levedura quanto da produtividade em etanol, e a produção celular é máxima quando a concentração de nitrogênio adicionada ao mosto como sulfato de amônio ou uréia é de 0,6 g/l. Acima desse valor, a biomassa produzida é praticamente constante. Ao estudarem a influência da concentração de nitrogênio adicionado na forma de sulfato de amônio e uréia no tempo de fermentação, observaram que aumentando-se a concentração de nitrogênio, o tempo de fermentação diminuía em cerca de 5 h.

No mesmo experimento, constataram que aumentando-se a concentração de uréia ou sulfato de amônio no mosto a ser fermentado o teor de etanol permaneceu constante: cerca de 7° e 6° GL, respectivamente.

Segundo MASSART e HORENS (1952), em presença de limitadas concentrações de glicose (1 mg) a adição de sais de amônio (1 mg) produz uma estimulação ao consumo de oxigênio pela levedura, quando comparados ao meio contendo apenas glicose, que é acompanhada pela assimilação do nitrogênio amoniacal. O mesmo ocorrendo para os aminoácidos glutamina, ácido aspártico e alanina.

Tsumura e Sato (1961), citados por ARAÚJO (1970), afirmam que a atividade de fermentação da sacarose aumenta com a assimilação do nitrogênio.

Contudo, LITVINENKO et alii (1980), afirmam que aumentos na concentração de NH_4^+ em meio de multiplicação de Candida utilis, levam a uma redução na taxa de absorção de glicose e crescimento da levedura.

HARRISON e GRAHAM (1970), ao estudarem o efeito da fonte de nitrogênio na eficiência da fermentação alcoólica, observaram que maior eficiência foi obtida ao se utilizar uma mistura de aminoácidos como fonte de nitrogênio (96%), seguido do tratamento que não recebeu nitrogênio (93,1%) e, finalmente, o tratamento com sais de amônio (90,5%).

Em ensaio realizado por ARAÚJO (1970), sobre a adição de sulfato de amônio em melaços anômalos ou deficientes, foi observado um aumento no consumo de açúcar pela levedura, velocidade de fermentação e produção de álcool. Em melaços normais, a velocidade de fermentação com ou sem adição da fonte de nitrogênio, foi praticamente a mesma: a vantagem na eficiência, cerca de 7% deve ser balanceada contra o custo da adição de sulfato de amônio.

ZAGO (1982), ao estudar o efeito da suplementação de nitrogênio em mosto de xarope, observou que após 22 horas de multiplicação, a quantidade de matéria seca produzida não aumentou nas doses superiores a 200 ppm de nitrogênio para a levedura Fleischmann.

Ainda, segundo ZAGO (1982), o nitrogênio foi

o elemento que mais afetou a produção de matéria seca nas leveduras Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A, tanto em mosto de xarope quanto no de melaço, ficando evidenciado que a levedura comercial Fleischmann é a mais exigente em nitrogênio.

SILVA (1983), ao fazer adubação do sorgo sacarino com nitrogênio na forma de sulfato de amônio, verificou que a partir de 60 kg de N/ha, houve decréscimo na produção de massa celular.

Ainda, segundo SILVA (1983), existem formas de nitrogênio absorvidas pela planta que não são assimiladas pela levedura.

De acordo com SILVA (1983), a adição de doses crescentes de nitrogênio no solo com sorgo sacarino, revelou um aumento no teor de nitrogênio na massa celular com redução na biomassa produzida, justificando-se a existência de menor quantidade no substrato, de nitrogênio metabolizável pela levedura.

Ao comparar os tratamentos que receberam adubação nitrogenada sem suplementação de sais no substrato com que receberam suplementação, constatou que houve uma tendência do tratamento sem suplementação superar em rendimento fermentativo àquele que recebeu suplementação.

O fósforo é elemento essencial tanto para a fermentação como para crescimento, sendo muito importante no metabolismo de carboidratos devido ao mecanismo de acúmulo,

transferência e liberação de energia, através de ligações fosfóricas de alto nível energético. Para que ocorra uma fermentação alcoólica de bom rendimento, o fósforo deverá se encontrar nos níveis de 125-150 ppm de P_2O_5 (STUPIELLO e HORII, 1981).

ATKIN et alii (1962), trabalhando com diferentes níveis de íon fosfato em meio sintético, demonstraram que uma concentração de 0,0018 M (1,280 mg P_2O_5 /l) era satisfatório para ótimo crescimento e fermentação.

Segundo Rothstein (1961), citado por SUOMALAINEN e OURA (1971), a levedura absorve o fosfato como ânion monovalente, $H_2PO_4^-$.

A forma iônica do fosfato varia com o pH do meio, sendo que a pH 4,5 o íon fosfato se encontra totalmente na forma $H_2PO_4^-$ que é ótimo para a enzima invertase e também para fermentação alcoólica (AMORIM, 1977).

De acordo com JONES et alii (1981), o fósforo como $H_2PO_4^-$ que é essencial para crescimento celular e é requerido em concentrações em torno de 0,6 mM/g de células para uma ótima velocidade de fermentação.

STUPIELLO e HORII (1981), relatam que mostos, principalmente os de caldo e mistos, têm apresentado teores variáveis de P_2O_5 , via de regra, superiores ao necessário, que pode ser constatado inclusive pelos teores que surgem na vinhaça e que têm variado de 20 a 90 ppm de P_2O_5 .

\LEVANDOVSKII et alii (1981), ao adicionarem H_3PO_4 ao mosto de melaço, constataram uma ativa multiplicação da levedura que resultou num acúmulo de alto teor de etanol: 9,24%. A adição de P e N (uréia) no meio de fermentação resultou na produção de uma menor concentração de álcool: 9,17%. A produção de etanol na ausência de ambos os elementos foi de 9,10%.

Dados obtidos por ARAÚJO (1970), durante a fermentação de mostos de melaço de cana, revelaram que a adição de 0,6 g/l de $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ produziu uma massa celular de 0,203 g/100 ml quando comparados a produção de 0,84 g/l sem suplementação. O melhor resultado foi obtido com adição de 0,5 g/l de $(NH_4)_2 SO_4$ + 0,6 g/l Na_2HPO_4 , em que a produção de biomassa foi de 0,564 g/100 ml.

FULMER et alii (1921), trabalhando com meio sintético, observaram que adição de fosfato em concentrações acima de 0,6% não causava aumento na biomassa.

Em ensaios realizados por MAGALHÃES et alii (1980), foi constatado que a adição de fosfato de sódio não influenciou no aumento de produção da proteína celular.

De acordo com ZAGO (1982), o fósforo influenciou significativamente na produção de matéria seca da levedura Fleischmann, na dose de 75 a 150 ppm, quando comparadas com o tratamento não suplementado em fósforo. Nas leveduras IZ-1904 e M-300-A, embora houvesse um aumento de matéria seca

nas concentrações mencionadas, este não foi significativo.

SILVA (1983), observou um decréscimo na massa celular produzida após 7 horas e 22 horas de multiplicação a partir do tratamento com 100 kg de P_2O_5 /ha em sorgo sacarino.

Ao analisar os tratamentos que receberam nitrogênio e fósforo no substrato e confrontando-os com os resultados dos tratamentos que não receberam suplementação, constatou que houve tendência do tratamento sem suplementação superar em rendimento àquele que recebeu suplementação.

2.3.2. Microflora do Caldo Tratado Termicamente

O caldo de cana-de-açúcar é um excelente substrato para o crescimento de microorganismo por ser rico em matéria orgânica e inorgânica. A contaminação bacteriana é um fato comprovado na maioria das destilarias de álcool, podendo ocasionar uma queda de produtividade da fermentação.

Foi constatado por ALTERTHUM et alii (1984), perdas em termos de rendimento em etanol, da ordem de 20 a 98% do teórico, quando a concentração bacteriana variou de $5,5 \times 10^7$ a 4×10^9 células/ml.

Em trabalho realizado por AMORIM et alii (1981), foi verificado que as bactérias contaminantes podem afetar o rendimento alcoólico reduzindo-o a níveis de 55% do teórico.

TILBURY (1968), isolou da cana colhida bactérias do ácido lático como L. mesenteroides, L. casei, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus var. alactosus, Lactobacillus sp. (heterofermentativos), bactérias gram negativas, ácidos tolerantes e B. subtilis.

Para CLARKE et alii (1980), os microorganismos importantes na contaminação do caldo de cana desde o campo até a usina, são as bactérias produtoras de ácido butírico, Clostridium termosaccharolyticum além do L. mesenteroides e L. dextranicum e leveduras do tipo Saccharomyces.

Há muitos fatores que afetam a deterioração da cana-de-açúcar após colheita: temperatura, umidade, maturação, variedade, período de armazenagem, condições da cana, tempo após a queima, tipo de colheita (GUPTA et alii, 1968 e SILVA, 1974).

BEVAN e BOND (1971), demonstraram que a microflora da cana verde é extremamente variada e, aproximadamente, 50 microorganismos diferentes foram isolados. Leuconostoc foi encontrado especialmente sob a bainha em companhia de pelo menos três gêneros de leveduras, Saccharomyces, Torula e Pichia. Bacilos do solo, em particular, Bacillus cereus e Pseudomonas prevaleceram; Streptomyces produtores de ácido foram observados, fungos e Actinomycetes estavam também presentes em grande número. Todos esses organismos metabolizam açúcares e uma grande proporção é termoresistente, crescendo bem

em temperaturas de 50-55°C.

A microflora presente nas fendas das canas verdes consistia na maioria de cocos, principalmente Leuconostoc, espécies da levedura Saccharomyces e uma grande variedade de fungos, e alguns bastonetes produtores de ácido láctico.

Todos esses microorganismos são muito ativos, e o crescimento nessas fendas aparentemente atua como excelente sítio para multiplicação, mesmo após a queima da cana.

Dezessete microorganismos diferentes foram isolados da superfície de canas queimadas, alguns em até 10 minutos após a queima ter ocorrido. Tais microorganismos eram predominantemente bastonetes. Dos bastonetes isolados, cinco eram extremamente termoresistentes e a maioria utilizava açúcares.

Testes realizados nas ceras da cana, dão alguma indicação que certas frações de cera são em algum grau bacteriostáticas. Supõe-se que a remoção de parte dessas ceras pelo calor durante a queima de cana, permita que microorganismos cresçam mais livremente; caldos obtidos de colmos de cana após a queima, são um excelente meio de crescimento para microorganismos.

Ainda, BEVAN e BOND (1971), constataram que os microorganismos presentes no caldo misto: Leuconostoc e leveduras estão naturalmente em grande número, sendo característicos de organismos provenientes da moagem da cana, que por se-

rem capazes de resistir a temperaturas relativamente mais elevadas do que a maioria dos outros contaminantes, predominam no caldo misto.

McNEIL e INKERMAN (1977), constataram a presença de bactérias no tecido interno das canas queimadas, aparentemente saudáveis. As espécies citadas foram: Erwinia uredovora, Erwinia herbicola, Enterobacter cloacae, Leuconostoc mesenteroides, Klebsiella pneumoniae, Enterobacter aerogenes, Enterobacter sp., sendo detectada uma população que variou de $1,0 \times 10^4$ a $1,7 \times 10^6$ /g de tecido.

Já SANHUEZA (1979), verificou que a população bacteriana interna da cana sadia, proveniente de gemas tratadas termicamente e cultivadas em solo autoclavado foi de $3,2 \times 10^5/\text{cm}^3$ de tecido interno da planta. A frequência de Erwinia herbicola, atingiu 10% da população detectada, existindo porém outras colônias de igual ou maior frequência que não foram identificadas.

Segundo BROCK (1967), microorganismos podem adaptar-se a temperaturas de $90-100^\circ\text{C}$, tendo sido isolados de lavas vulcânicas superaquecidas, assim de acordo com BEVAN e BOND (1971), é possível que microorganismos vivam e se reproduzam na natureza em temperaturas excepcionais. Isto poderia explicar a presença de tais organismos como Actinomyces termofílicos, organismos semelhantes na aparência e características bioquímicas ao Leuconostoc, e numerosos baci-

los encontrados no processamento de líquidos após aquecimento e caleagem.

Winders e Zemek, citados por BEVAN e BOND (1971), relataram a presença de bastonetes esporulados em caldos clarificados a temperaturas próximas de 100°C. Tais microorganismos estavam presentes em amostras coletadas de decantadores a 92°C. Utilizam glicose, sacarose, manitol, amido e produzem ácido lático. Sua temperatura ótima de multiplicação está entre 80°C e 85°C e não se desenvolvem a temperaturas inferiores a 50°C, sendo identificados com B. megatherium:

RODINI (1985), verificou o aparecimento de colônias pigmentadas de Bacillus megatherium somente em caldos que sofreram tratamento térmico.

A presença de microorganismos termofílicos que são viáveis sob condições de temperatura extremamente elevadas poderia indicar que a interrupção do crescimento microbiano em produtos líquidos pode não cessar nos trocadores de calor e que, embora após aquecimento e caleagem perdas adicionais insuspeitáveis podem estar ocorrendo.

BLISS e MADON (1946), também relataram a ocorrência de microorganismos mesófilos, em várias amostras de caldos decantados de clarificadores Seip e Dorr, embora a contagem fosse muito pequena.

Kent, citado por BLISS e MDAON (1946), notou que parece haver algum tipo de correlação entre a turbidez de caldos decantados e filtrados com suas contagens bacterianas, especialmente com a contagem de termofílicos. Similarmente, caldos com alto grau de claridade tendem a eliminação de termofílicos.

Em ensaio realizado por LUCREDI et alii (1984), para verificação de um sistema de tratamento térmico do caldo de cana, foi constatada a presença de microorganismo com contagem total em PCA no valor máximo de $9,5 \times 10^4$ e mínimo de $6,4 \times 10^3$ em caldos saídos do aquecedor tubular operando à temperatura de 115°C sendo, portanto, evidenciado uma baixa eficiência do conjunto para produzir um caldo com baixo nível de microorganismos. Houve reprodução de microorganismos nos trocadores, principalmente de bactérias láticas e leveduras, sendo observado que boa parte da contagem total de microorganismos no caldo aquecido e no caldo pré-evaporado é composto de bactérias termoresistentes esporulados.

Segundo RODINI (1985), caldos não tratados chegaram a apresentar uma contagem de $1,2 \times 10^8$ bactérias/ml nas dornas em final de fermentação, sendo identificadas como Leuconostoc. Esse microorganismo somente foi isolado de destilarias que não tratavam o caldo com aquecimento, representando 1,5% das bactérias isoladas e identificadas.

Ainda, de acordo com a autora, foi constatada nas destilarias que fazem o tratamento térmico do caldo, uma população de bactérias constituída quase que exclusivamente por bastonetes Gram + esporulados (62,1%), enquanto bastonetes Gram negativos, não esporulados foram encontrados em menor proporção (28,8%).

A diferença da população bacteriana entre as destilarias que tratam o caldo daquelas que não o fazem, como esperado, demonstra o efeito seletivo do tratamento térmico, favorecendo as bactérias esporuladas.

Segundo a COPERSUCAR (1983), a caleagem ou sulfitação e caleagem seguidas do tratamento térmico, permitem uma redução substancial na contagem microbiana. Dessa forma, o mosto preparado com caldos assim tratados apresenta contagem sempre inferior a 5×10^6 microorganismos por mililitro, sendo também predominante o grupo de bactérias láticas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Matéria-prima

A cana-de-açúcar utilizada no presente trabalho, foi proveniente de áreas experimentais da Fazenda Areão, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP. As amostras de cana-de-açúcar não pertenciam a uma mesma variedade e tampouco houve preocupação quanto à idade, corte, solo e adubação dentro do período utilizado. As canas utilizadas nos experimentos não obedeceram a qualquer critério para o corte, admitindo-se que a amplitude de variação na composição pudesse talvez fornecer dados válidos para todas as situações encontradas na prática.

As canas cruas eram processadas imediatamente após a colheita, procedendo-se a extração do caldo em prensa hidráulica Codistil modelo PH 45 II nas condições padrão de operação: 1 minuto a 250 kg/cm^2 /amostra, após prévia desinte-

gração em desintegrador de cana.

3.2. Preparo do Mosto

O caldo de cana após extração em prensa hidráulica foi filtrado em algodão para retirada de impurezas grosseiras e submetido a dois tipos de tratamento: aquecimento e defecação simples.

3.3. Preparo do Inóculo

O inóculo utilizado nos ensaios consistia de uma suspensão de fermento prensado Fleischmann (Saccharomyces cerevisiae) em água destilada, de concentração igual a 25 g de fermento úmido/100 ml de água destilada correspondendo a cerca de 25×10^8 células/ml.

Após pesagem de 25 g do fermento, este era diluído em cerca de 50 ml de água destilada e ajustado a pH 2,5 com solução de H_2SO_4 1N através de potenciômetro. A suspensão era transferida para balão volumétrico de 100 ml completando-se o volume com água destilada e homogeneizando-se manualmente.

3.4. Condução do Experimento

Foram realizados 12 ensaios: sendo 6 para clarificação por defecação e 6 para tratamento térmico.

Para cada ensaio foi utilizado um caldo dife-

rente em composição. Cada caldo sofreu 3 tipos de tratamento: (1) testemunha (sem tratamento), (2) aquecimento durante 5 minutos ou defecação a frio e aquecimento por 5 minutos, (3) aquecimento durante 60 minutos ou defecação a frio e aquecimento por 60 minutos.

As análises químicas foram feitas sempre com 3 repetições.

3.4.1. Aquecimento

O caldo filtrado foi separado em 10 frações de 250 ml, sendo submetidas a tratamento térmico à temperatura constante em torno de 100°C durante 5 e 60 minutos, respectivamente. Uma fração de 500 ml, sem tratamento constituía a testemunha.

O aquecimento foi efetuado em uma cuba de vidro temperado contendo 10 provetas graduadas de 250 ml, com um agitador e um aquecedor para manter a temperatura constante em torno de 100°C. Esse conjunto foi utilizado tanto no ensaio de tratamento térmico quanto no de defecação.

As frações tratadas termicamente foram resfriadas em água corrente, e, depois, centrifugadas em centrífuga IEC-SP refrigerada a 600 g durante 5 minutos, utilizando-se 500 ml do sobrenadante de cada tratamento para fermentação, e o restante para análises quanto ao teor de açúcares redutores totais, fósforo inorgânico, nitrogênio total, amoniacal, não protéico e contagem microbiana.

3.4.2. Defecação Simples

O caldo filtrado foi ajustado a pH 6,0 com leite de cal a 10⁰ Bé e transferido para 10 provetas de 250 ml, sendo estas colocadas em banho-maria com agitação e temperatura constante em torno de 100⁰C, até que atingissem o equilíbrio e permanecessem durante 5 a 60 minutos nessa condição.

Os caldos defecados foram resfriados em água corrente e centrifugados, aproveitando-se 500 ml do sobrenadante, de cada tratamento, para fermentação e o restante para análises.

Uma fração de 500 ml, testemunha, não sofreu nenhum processo de purificação, sendo conduzido à fermentação.

Os caldos submetidos aos tratamentos de defecação e aquecimento foram analisados quanto ao teor de açúcares redutores totais, fósforo inorgânico, nitrogênio total, amoniacal, não protéico e contagem microbiana.

3.5. Métodos Analíticos

3.5.1. Açúcares redutores totais do caldo foram determinados segundo a técnica de LANE-EYNON (1934).

3.5.2. Açúcares residuais do vinho pela técnica de NIZOVKIN e EMEL'YANOVA (1960).

3.5.3. Nitrogênio Total: foi determinado pelo método de Micro-Kjeldahl (BAILEY, 1967).

3.5.4. Nitrogênio Amoniacal: a determinação foi feita segundo o método de Micro-Kjeldahl descrito por MEEKER e WAGNER (1933); que consta de destilação no aparelho de micro-kjeldahl, de 2 ml de amostra, em pH alcalino, acertado com solução de NaOH 50% p/v e titulado com solução de HCl 0,01 N em presença do indicador misto de vermelho de metila-azul de metileno.

3.5.5. Nitrogênio Não Protéico: determinado segundo método de Micro-Kjeldahl (BAILEY, 1967), com desproteínização prévia da amostra com partes iguais de hidróxido de bário 0,3N e sulfato de zinco 5% (VILELLA, BACILA e TASTALDI, 1973).

3.5.6. Fósforo Inorgânico: determinado pela técnica de GOMORI (1942).

3.5.7. Teor Alcoólico do Vinho: o grau alcoólico do vinho foi obtido por destilação de 50 ml da amostra em micro-destilador Tecnal modelo TE-012 recolhendo-se 50 ml do destilado em balão volumétrico e determinando-se a densidade relativa da solução em densímetro digital A.PAAR (DMA-45).

3.5.8. Determinação de pH: determinado em pH-metro digital Methrohm Herisau, modelo E532.

3.5.9. Contagem de Colonias - A determinação do núme-

ro total de colônias foi realizada pela técnica convencional de diluição em série e plaqueamento em Plate Count Agar, composto de bacto-triptona Difco, 5,0 g; extrato de carne Oxoid, 2,5 g; bacto-dextrose Difco, 10,0 g; ágar Difco, 8,0 g; água destilada, q.s.p., 1.000 ml.

3.6. Fermentação Alcoólica

Cada suspensão de fermento comercial prensado Fleischmann de concentração 25 g/100 ml foi adicionada em Erlenmeyer de 1.000 ml contendo o mosto testemunha e as frações de mosto que haviam sido submetidas ao aquecimento e defecação durante 5 e 60 minutos.

Cada Erlenmeyer contendo inóculo e mosto foi fermentado por cerca de 24 horas em incubadora tipo General Electric Precision Scientific Modelo 805 à temperatura constante de 32°C.

Os vinhos obtidos da fermentação dos caldos anteriormente referidos nos itens 2.4.1. e 2.4.2. foram centrifugados para separação da massa celular e o sobrenadante submetidos a uma série de análises que incluem: análise do teor alcoólico, determinação de pH, determinação de fosfato, determinação de açúcares residuais, determinação do teor de nitrogênio total, amoniacal, não protéico.

A determinação do peso seco de leveduras produ-

zidas durante o período de fermentação foi efetuada por centrifugação de 10 ml de amostra, lavagem por resuspensão e posterior filtração do microorganismo em membrana Millipore tipo AA, com 0,8 μm de porosidade, 47 mm de diâmetro, específica para leveduras, seguida de secagem em estufa a 105°C, até peso constante.

3.7. Delineamento Experimental e Análise Estatística

O delineamento experimental adotado foi de blocos casualizados.

A análise estatística dos dados referentes ao teor de fósforo inorgânico, nitrogênio total, amoniacal, protéico, não protéico, população microbiana em função da defecação e tratamento térmico foram realizados através de análise de variância, em blocos casualizados de acordo com o seguinte esquema:

Causas da variação	G.L.
Blocos	5
Tratamentos	2
Resíduo	10
Total	17

Usou-se o teste F para as análises estatísticas e as comparações entre as médias dos tratamentos foram efetuados pelo teste de Tukey, segundo GOMES (1982).

As análises dos dados foram realizados em microcomputador CP 500 da Prológica, em linguagem Basic pertencente ao Departamento de Entomologia da ESALQ.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Composição

Pelas análises químicas realizadas em caldos obtidos por prensagem, verifica-se que a concentração dos componentes do caldo de cana sofreram variações abruptas que podem ser justificadas pela diferença de época em que foram tomadas as amostras, de estágio de maturação, condições climáticas, condições de solo, sistema de cultivo e variedades diferentes (GEERLIGS, 1924; SPENCER e MEADE, 1945; BLISS e MADON, 1946; PAYNE, 1969).

Os teores de nitrogênio total dos caldos testemunhas conforme podem ser observados nas tabelas 1 e 2 variaram de 11,14 a 99,26 mg/100 ml, sendo a média de 45,73 mg% portanto com um valor mínimo abaixo do citado por FORT e MCKAIG (1939), que é de 47 mg%, e em algumas amostras acima dos valores determinados por GEERLIGS (1924), que são de 18 a 62 mg%.

Em algumas amostras, constatou-se que o teor de nitrogênio total esteve próximo e acima dos valores encontrados por Brown e Blowin, citados por WIGGINS (1969), GEERLIGS (1924), WIGGINS (1969), Hardin, citado por FARNELL (1924) e SHARMA e JOHARY (1984), que foram 50 mg%, 36%, 18 mg%, 40 mg% e as 20-60 mg%, respectivamente.

Quanto ao teor de nitrogênio amoniacal, verifica-se pela tabela 1 que sua concentração no caldo variou de 1,12 mg/100 ml a 35 mg/100 ml.

Browne, citado por SPENCER e MEADE (1945), não estabeleceu um valor preciso para o teor de nitrogênio amoniacal, preferindo referir-se como traços o que revela uma baixa concentração encontrada no caldo.

Já Hardin, citado por FARNELL (1924), determinou que a concentração de amônia no caldo de cana era de 2,4 mg%, bem abaixo da média observada em nossas amostras que foi de 11,96 mg%, ou cerca de 21,21% do nitrogênio total. Deve-se ressaltar que alguns caldos apresentaram teores inferiores aos relatados por Hardin.

A concentração de nitrogênio protéico nos caldos utilizados em nosso experimento estiveram no intervalo de 7,07 mg% a 29,96 mg% com uma média de 18,15 mg%, portanto, abaixo do valor mínimo determinado por FORT e MCKAIG (1939) em caldos de cana de Louisiana, que foi de 33 mg%.

Hardin, citado por FARNELL (1924), estipulou que o teor de nitrogênio protéico representado pelas albuminas, nucleínas e albumosas (proteoses), corresponde a 8,5 mg%. O nitrogênio protéico, em média, representou cerca de 48,02% do nitrogênio total.

A variação nos teores de proteína encontrados pode ser justificada pela distribuição do material nitrogenado no colmo da cana, que em relação às substâncias albuminóides estão concentradas nos nós da cana (GEERLIGS, 1924).

Os teores de nitrogênio não protéico variaram de 3,08 mg a 44,38 mg% com uma média de 15,62 mg%, correspondendo a 30,76 % do nitrogênio total. Deve ser evidenciado que esses teores não incluem o nitrogênio amoniacal, portanto, a média se encontra abaixo do teor mínimo estipulado por FORT e MCKAIG (1939), porém, somando-se a média do nitrogênio amoniacal, a concentração média de nitrogênio não protéico é de 27,58 mg% que está nos limites determinados por FORT e MCKAIG (1939) que são de 21 mg% a 280 mg%.

O método de extração, o estágio de crescimento da planta, a variedade e a distribuição do nitrogênio não protéico no colmo, que é maior no ápice, concorrem para tais diferenças (GEERLIGS, 1924; WIGGINS e WILLIAMS, 1951 e WILSON, 1956).

As análises quanto à concentração de P_2O_5 nos caldos testemunha estiveram na faixa de 151,75 a 482,50 ppm, com uma média de 301,63 ppm.

SHARMA et alii (1981), encontraram variações de 280 a 600 ppm no teor de fosfato inorgânico, de acordo com a idade e fertilização do solo; sendo seu teor maior em regiões de crescimento ativo. Com relação ao teor de fosfatos totais esses variaram de 440 a 850 ppm.

STUPIELLO e HORII (1981), estabeleceram uma faixa de 125 a 150 ppm para que haja uma fermentação alcoólica com bom rendimento.

BENNETT e RAGNAUTH (1960), HONIG (1960), GUPTA et alii (1965), JANAKIRAMAIAH et alii (1967), PAYNE (1969), DELGADO et alii (1973a) e SILVA Jr. (1976) determinaram que o caldo de cana deve conter de 300 a 350 ppm de P_2O_5 /litro para que ocorra uma clarificação eficiente.

Segundo SHARMA e GUPTA (1970), a distribuição de fosfato em várias porções de cana indica que com o avanço da idade, o teor de fosfatos mostra uma tendência a aumentar ao máximo, seguido por um declínio após período de maturação. O teor de fosfato durante a maturação tem variado de 269 ppm a 312 ppm o que vem a corroborar com o valor médio de 301,63 ppm observado nos caldos testemunha.

PAYNE et alii (1928), também constataram que os caldos crus variavam consideravelmente na composição, particularmente quanto ao teor de fosfato.

Tabela 1 - Teor de nitrogenio total, amoniacal, não protéico* e protéico contido nos caldos testemunhas

Nitrogênio Total mg%	Nitrogênio Amoniacal		Nitrogênio não protéico		Nitrogênio Protéico	
	mg%	%NT	mg%	%NT	mg%	%NT
22,19	3,36	15,14	5,88	26,50	12,95	58,36
11,83	1,12	9,47	3,64	30,77	7,07	59,76
14,14	1,40	9,90	3,08	21,78	9,66	68,32
80,92	23,66	29,24	27,30	33,73	29,96	37,02
32,00	5,67	17,72	10,43	32,59	15,90	49,69
38,78	7,98	20,58	10,92	28,16	19,88	51,26
27,86	5,46	19,60	7,56	27,13	14,84	53,26
40,46	8,26	20,42	8,26	20,41	23,94	59,17
98,14	35,00	35,66	37,52	38,23	25,62	26,10
99,26	32,90	33,15	44,38	44,71	21,98	22,14
50,54	12,56	24,85	20,34	40,24	17,64	34,90
32,62	6,16	18,88	8,12	24,89	18,34	56,22
45,73	11,96	21,21	15,62	30,76	18,15	48,02

Média de 3 repetições

* Sem nitrogênio amoniacal

Tabela 2 - Composição dos caldos de cana em relação aos teores de nitrogênio, fosfato inorgânico e açúcar total

Nitrogênio Total mg/100 ml	P ₂ O ₅ ppm	ART g/100 g
22,19	189,92	19,64
11,83	254,54	15,47
14,14	151,75	16,48
80,92	204,81	15,74
32,00	482,50	15,72
38,78	410,18	15,13
27,86	249,19	20,09
40,46	449,68	19,60
98,14	320,13	19,80
99,26	204,81	16,40
50,54	232,48	14,18
32,62	469,58	13,29
45,73	301,63	16,79

4.2. Tratamento Térmico

Os resultados apresentados a seguir referem-se unicamente aos tratamentos que receberam tratamento térmico, sem caleagem, pois estes serão tratados posteriormente, no item 4.3, sob a denominação de defecação simples.

4.2.1. Nitrogênio

A influência do tratamento térmico sobre a composição do caldo, no que se refere à concentração de nitrogênio nas formas determinadas como: nitrogênio total, amoniacal, não protéico e protéico está apresentada na tabela 3.

É bem conhecido que os colóides do caldo de cana são coagulados pelo calor, sofrendo importantes alterações químicas e entre moléculas irreversíveis (DEERR, 1916). A floculação de albumina e substâncias similares pode ser causada por um efeito de pH próximo ao ponto isoelétrico das proteínas, acelerado e aumentado pelo efeito do calor, sendo a coagulação também um resultado da desidratação das proteínas (SCOTT, 1927 e KING, 1931). Não só a temperatura, mas também a concentração iônica, são fatores importantes na remoção de proteínas e segundo BLISS e MADON (1946) as albuminas coagulam melhor a valores de pH próximos aos encontrados para caldo de cana e a temperatura de 80°C.

Observando-se a tabela 3, verifica-se que os valores de nitrogênio total reduzem-se após tratamentos de 5 e 60 minutos a 100°C e posterior centrifugação.

A análise estatística dos resultados apresentados no quadro 1, pela aplicação do Teste F, para nitrogênio total no caldo, mostrou significância ao nível de 1%

Tabela 3 - Teor de nitrogênio total, protéico, amoniacal e não protéico* contidos no caldo em função do tratamento térmico

Anos- tra	Trata- mento	N Total mg/100ml	N Protéico		N Amoniaca		N Não Protéico	
			mg/100 ml	% N total	mg/100 ml	% N total	mg/100 ml	% N total
1	Testemunha	27,86	14,84	53,26	5,46	19,60	7,56	27,13
	5 minutos	18,90	3,22	17,04	4,90	25,92	10,78	57,04
	60 minutos	17,78	2,66	14,96	4,69	26,38	10,43	58,66
2	Testemunha	40,46	23,94	59,17	8,26	20,42	8,26	20,41
	5 minutos	32,62	8,82	27,04	7,84	24,03	15,96	48,93
	60 minutos	31,50	7,98	25,33	8,26	26,22	15,26	48,44
3	Testemunha	98,14	25,62	26,10	35,00	35,66	37,52	38,23
	5 minutos	82,04	2,52	3,07	22,47	35,92	50,05	61,00
	60 minutos	83,79	7,49	8,94	31,50	37,59	44,80	53,46
4	Testemunha	99,26	21,98	22,14	32,90	33,15	44,38	44,71
	5 minutos	81,90	6,86	8,37	31,36	38,29	43,68	53,33
	60 minutos	83,02	1,82	2,19	31,15	37,52	50,05	60,28
5	Testemunha	50,54	17,64	34,90	12,56	24,85	20,34	40,24
	5 minutos	40,46	7,00	17,30	12,04	29,76	21,42	52,94
	60 minutos	42,14	8,26	19,60	12,88	30,56	21,00	49,84
6	Testemunha	32,62	18,34	56,22	6,16	18,88	8,12	24,89
	5 minutos	26,32	11,20	42,55	5,60	21,27	9,52	36,17
	60 minutos	23,59	8,05	34,12	6,79	28,78	8,75	37,09

Média de 3 repetições

* Não protéico = fração desproteinizada - N amoniacal

de probabilidade para os tratamentos e a aplicação do Teste de Tukey mostrou que a maior média, correspondente à testemunha, difere significativamente, ao nível de 5% de probabilidade, das médias dos tratamentos 5 minutos e 60 minutos e que estas não diferem entre si.

Quadro 1 - Efeito do tratamento térmico do caldo no teor de nitrogênio total

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Nível
Blocos	5	63,227800	12.645600	1147,84**	0,00
Tratamentos	2	2,509280	1,254640	113,88**	0,00
Resíduo	10	0,110168	0,011017		
Total	17	65,847200			

Dados transformados para $\sqrt{x + 0,5}$

** Ao nível de 1% ao menos um contraste de médias difere de zero

Coefficiente de variação = 1,52196%

Teste de Tukey 5% para tratamentos

DMS = 0,166259

Tratamento 1 = 7,42407 A

Tratamento 2 = 6,65016 B

Tratamento 3 = 6,61506 B

Observa-se pela tabela 4 que a remoção média de nitrogênio total após os tratamentos 5 e 60 minutos de aquecimento foi de 20,78% e 22,26%, respectivamente, embora, possivelmente em função da variação do teor de proteínas nas diversas amostras, a percentagem de eliminação do nitrogênio total te-

nha variado de 14,62 a 36,18% em relação às testemunhas.

Segundo SATYANARAYANA (1952), a quantidade de nitrogênio removido por ebulição e diversos métodos de clarificação sob diferentes condições, tem sido relativamente constante, da ordem de 30% do nitrogênio total presente na cana. Os resultados presentemente obtidos, vêm, de certo modo, corroborar com os dados constantes na literatura.

Tabela 4 - Remoção do nitrogênio total durante o tratamento térmico do caldo

Amostra *	Aquecimento 5 min.	Aquecimento 60min.
	%	%
1	32,16	36,18
2	19,37	22,14
3	16,40	14,62
4	17,49	16,36
5	19,94	16,62
6	19,31	27,68
Média	20,78	22,26

*Cada amostra é apresentada como média de 3 repetições.

Em relação ao nitrogênio protéico (Tabela 3), observa-se que a fração protéica representa de 22,14 a 59,17% do nitrogênio total do caldo, em média, 41,96%, e que em função dos tratamentos térmicos, sofrem uma considerável redução decorrente da precipitação e, em parte, pela transformação em fração não protéica. Os teores de nitrogênio protéi

co nos caldos tratados, representaram de 2,19 a 42,55%, em média, 18,37%.

A análise estatística detectou que os caldos tratados diferem, significativamente, ao nível de 1% de probabilidade, da testemunha e que as médias dos tratamentos 2 e 3, respectivamente, 5 e 60 minutos de aquecimento, não apresentaram diferenças entre si (Quadro 2).

Quadro 2 - Efeito do tratamento térmico do caldo no teor de nitrogênio protéico

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Nível
Blocos	5	1,854870	0,370975	1,23ns	36,27
Tratamentos	2	17,497700	8,748850	29,07**	0,01
Resíduo	10	3,009220	0,300922		
Total	17	22,361800			

Dados transformados para $\sqrt{x + 0,5}$

** - Ao nível de 1% ao menos um contraste de médias difere de zero

Coeficiente de variação = 16,9345%

Teste de Tukey 5% para tratamentos

DMS = 0,868926

Tratamento 1 = 4,63219 A

Tratamento 2 = 2,59858 B

Tratamento 3 = 2,48721 B

Observa-se na Tabela 5 que o percentual de remoção de nitrogênio protéico é bastante variável dentro de cada tratamento (5 e 60 minutos de aquecimento), de 38,93 a 90,53%, com média de 66,67% e de 53,17 a 91,72%, com média de 70,08%, respectivamente. A larga variação pode ser decorrente das formas protéicas presentes, ou, ainda, porque parte das proteínas podem ter sido convertidas em peptídeos, peptonas e aminoácidos, solúveis e não elimináveis por precipitação e que, dessa forma, manifestam-se por um aumento no teor de nitrogênio não protéico, sendo as proteínas coaguláveis pelo calor removidas durante a operação, de acordo com SATY-NARAYANA (1952), PAVLAS e HAUSLEROVA (1956); VEGA (1957) e PEREZ et alii (1978). Ainda, segundo FARNELL (1924), o método de determinação de proteína não é suficientemente específico para excluir constituintes orgânicos nitrogenados do caldo. O autor estimou que a proteína calculada como $6,3 \times N$, constituía 0,73% do Brix do caldo da cana e que somente 29,4% desse valor era matéria não dializável, portanto, de verdadeira natureza protéica.

Para MARTIN (1969), a proteína existente no colmo e em folhas em desenvolvimento não é uma substância cristalizável definitivamente caracterizada, senão que mais representa uma proteína em vários estágios de agregação ou síntese. Ela não é molecularmente homogênea e, com toda probabilidade, dissolve-se ou dispersa-se facilmente no caldo, na forma de colóide. Está, indubitavelmente, acompanhada por moléculas

de peptídeos de baixo peso molecular, os polipeptídeos, que tenham propriedades intermediárias entre as proteínas e os aminoácidos livres.

Tabela 5 - Remoção de nitrogênio protéico durante o tratamento térmico do caldo

Amostra*	Aquecimento 5 min. %	Aquecimento 60min. %
1	78,30	82,07
2	63,16	66,66
3	90,53	70,76
4	68,79	91,72
5	60,31	53,17
6	38,93	56,10
Média	66,67	70,08

*Cada amostra é apresentada como média de 3 repetições.

Em relação ao teor de nitrogênio amoniacal, observa-se à Tabela 3 que o mesmo representa uma fração variável de 18,88 a 35,66%, em média, 25,43%, do nitrogênio total.

A análise estatística apresentada no Quadro 3, não detectou diferenças entre os tratamentos, apresentando um valor de F não significativo para tratamentos.

Embora a metodologia utilizada para sua determinação possa apresentar uma variação decorrente do próprio método, é possível verificar-se que a fração amoniacal é con

siderável e não traços como encontrado por Browne, citado por SPENCER e MEADE (1945), e aproximada aos valores de nitrogênio não orgânico observado por Hardin, citado por FARNELL (1924).

A variação encontrada nos teores de nitrogênio amoniacal após os tratamentos térmicos é pequena e a diferença é não significativa pela análise estatística, como já foi visto, de modo que pelos valores encontrados (Tabela 3), pode-se afirmar que seu teor é praticamente constante. Obviamente, sendo seu teor inalterado no caldo tratado e havendo remoção de nitrogênio protéico, a sua concentração relativa em função do nitrogênio total em cada amostra estará aumentada. A média de nitrogênio amoniacal nos caldos tratados foi de 30,19%, ou seja, 4,76%, em média, maior que nos caldos sem tratamento.

Quadro 3 - Efeito do tratamento térmico do caldo no teor de nitrogênio amoniacal

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Nível
Blocos	5	34,550500	6,910100	676,92**	0,00
Tratamentos	2	0,082306	0,041153	4,03ns	5,20
Resíduo	10	0,102081	0,010208		
Total	17	34,734900			

Dados transformados para $\sqrt{x + 0,5}$

Coefficiente de variação = 2,65288%

Teste de Tukey 5% para tratamentos
DMS = 0,16004

Tratamento 1 = 3,88884 A

Tratamento 2 = 3,81307 AB

Tratamento 3 = 3,72361 B

Observando-se o comportamento da fração não protéica, verifica-se à Tabela 3 que ao inverso do que ocorre com nitrogênio total e nitrogênio protéico, seu teor aumentou nas amostras tratadas termicamente, em relação à testemunha. As razões do aumento já foram discutidas anteriormente.

Do ponto de vista de aproveitamento do caldo para fermentação, tal aumento pode ter um significado importante em termos de maior disponibilidade de nutrientes nitrogenados, facilmente assimiláveis pelos microorganismos.

A análise estatística detectou que a testemunha difere dos demais tratamentos ao nível de 5% de probabilidade e que as médias dos caldos tratados não diferem entre si, confirmando as assertivas anteriores (Quadro 4).

Quadro 4 - Efeito do tratamento térmico do caldo no teor de nitrogênio não protéico

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Nível
Blocos	5	43,553300	8,710660	127,98**	0,00
Tratamentos	2	0,840057	0,420029	6,17*	1,80
Resíduo	10	0,680634	0,068063		

Dados transformados para $\sqrt{x + 0,5}$

* Ao nível de 5% ao menos um contraste de médias difere de zero
Coeficiente de variação = 5,5918

Teste Tukey 5% para tratamentos
DMS = 0,41325

Tratamento 2 = 4,83661 A
Tratamento 3 = 4,79909 A
Tratamento 1 = 4,36085 B

4.2.2. Fósforo

Os resultados dos tratamentos térmicos a 100°C por 5 e 60 minutos em relação ao teor de fosfatos inorgânicos expressos como P_2O_5 , estão apresentados na Tabela 6.

Observa-se que a variação do teor de fósforo é pequena, da ordem de 3 a 10% inferior à testemunha, em função dos tratamentos, provavelmente porque ao pH natural do caldo, de 5,0 a 5,5, sem qualquer adição de cal, o cálcio existente no mesmo, seja suficiente apenas para reação com HPO_4^{--} na proporção da remoção ocorrida.

A análise estatística dos dados, entretanto, detecta diferenças entre as médias dos diferentes tratamentos, como se pode verificar no Quadro 5, indicando que a testemunha difere dos demais tratamentos ao nível de 1% de probabilidade, e que os tratamentos entre si não diferem estatisticamente.

Tabela 6 - Teor de fosfato inorgânico contido no caldo em função do tratamento térmico

Amostra*	Testemunha ppm P_2O_5	5 minutos ppm P_2O_5	60 minutos ppm P_2O_5
1	249,19	224,19	224,19
2	449,68	449,68	435,92
3	320,13	310,90	310,90
4	204,81	191,89	191,89
5	232,48	225,10	218,65
6	469,58	420,69	420,69
Média	320,98	303,74	300,37

* O resultado de cada tratamento é média de 3 repetições.

Quadro 5 - Teor de fosfato contido no caldo em função do tratamento térmico

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Nível
Blocos	5	143,288000	28,657600	547,49**	0,00
Tratamentos	2	1,170410	0,585205	11,18**	0,28
Resíduo	10	0,523438	0,052344		

Dados transformados para $\sqrt{x + 0,5}$

** - Ao nível de 1% ao menos um contraste de médias difere de zero

Coefficiente de variação = 1,31913%

Teste de Tukey 5% para tratamentos

DMS = 0,3624

Tratamento 1 = 17,69980 A

Tratamento 2 = 17,21120 B

Tratamento 3 = 17,12070 B

4.2.3. Contagem de Microorganismos

As amostras de cana-de-açúcar utilizadas nos ensaios foram sempre colhidas momentos antes da extração do caldo, sendo tais canas, não queimadas e não armazenadas, diferindo, portanto, substancialmente de canas industriais. Assim, os microorganismos encontrados nos caldos limitaram -se provavelmente só àqueles constituintes da microflora da própria planta e as variações encontradas, sejam em função da sanidade das plantas amostradas, das condições climáticas e da época em que foram colhidas.

Os ensaios de contagem microbiana dos caldos foram realizados separadamente dos demais parâmetros estudados, ou seja, as amostras aqui enumeradas de 1 a 7 na Tabela 7 não correspondem às amostras analisadas para nitrogênio e fosfato descritas nos itens 4.2.1 e 4.2.2.

Os dados obtidos na contagem microbiana dos caldos com e sem tratamento estão mostrados na Tabela 7.

Tabela 7 - População microbiana do caldo de cana

Amostra	TRATAMENTOS		
	Tempo de	Aquecimento	a 100°C
	0	5 minutos	60 minutos
1	$2,4 \times 10^5$	$0,0003 \times 10^5$	$0,0003 \times 10^5$
2	$2,1 \times 10^5$	$0,0065 \times 10^5$	$0,0025 \times 10^5$
3	$17,5 \times 10^5$	$0,0019 \times 10^5$	$0,0035 \times 10^5$
4	82×10^5	$0,0090 \times 10^5$	$0,0003 \times 10^5$
5	387×10^5	$0,513 \times 10^5$	$0,0696 \times 10^5$
6	540×10^5	$0,356 \times 10^5$	$0,005 \times 10^5$
7	8×10^5	$0,0189 \times 10^5$	$0,005 \times 10^5$

Os resultados da contagem microbiana foram submetidos à análise estatística (Quadro 6) - Teste F e de Tukey, ficando evidenciado que as médias relativas aos tratamentos 5 e 60 minutos de aquecimento não diferiram entre si estatisticamente, embora diferissem significativamente, ao nível de 5% de probabilidade, da testemunha sem tratamento. O coeficiente de variação, extremamente elevado, certamente é decorrente da variação muito alta entre as populações existentes em cada amostra, que, em si, não são repetições, mas sim repetições de experimentos. O desdobramento da análise estatística, amostra a amostra, apresentada no Apêndice deste trabalho (Quadros 17 a 23), mostra que dentro de cada experimento o coeficiente de variação é aceitável e reflete a precisão na condução dos ensaios.

Pode-se observar que caldos tratados termicamente a 100°C por 5 minutos, em condições de laboratório, tem sua população reduzida a níveis praticamente desprezíveis, da ordem de 0,01%, talvez em razão de que o aquecimento até atingir os 100°C seja muito mais lento do que os observados em processos industriais, além do próprio tempo necessário para resfriamento das amostras, em água corrente.

O tratamento por 5 minutos resultou em redução tão drástica, obviamente um tratamento mais prolongado, por 60 minutos contribuiu, em geral, para reduzir ainda mais a população, levando quase à esterilidade. Possivelmente, as

bactérias remanescentes, sejam organismos como os Actinomyces termofílicos muito semelhantes ao Leuconostoc ou, ainda, B. megatherium, encontrados no processamento após aquecimento e caleagem, como citado por BEVAN e BOND (1971) e bactérias esporuladas que resistiram ao tratamento (RODINI, 1985).

Neste caso, a contagem microbiana de caldos tratados industrialmente, sempre elevada, seria decorrente de baixo tempo de residência, falhas de equipamento ou a tese de recontaminação como defendida por LUCREDI et alii (1984).

Quadro 6 - Efeito do tratamento térmico do caldo na população microbiana

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Nível
Blocos	6	153,798000	25,632900	1,04ns	44,45
Tratamentos	2	345,910000	172,955000	7,05**	0,95
Resíduo	12	294,536000	24,544700		
Total	20	794,244000			

Dados transformados para $\sqrt{x + 0,5}$

** - Ao nível de 1% ao menos um contraste de médias difere de zero

Coeficiente de variação = 136,87%

Teste Tukey 5% para tratamentos

DMS = 7,05945

Tratamento 1 = 9,35922 A

Tratamento 2 = 0,78470 B

Tratamento 3 = 0,71513 B

4.3. Defecação Simples

Os resultados apresentados e discutidos a seguir, referem-se aos tratamentos que sofreram caleagem a frio, até pH 6,0, e posterior aquecimento, em banho, até 100°C, onde permaneceram a temperatura constante por 5 e 60 minutos. Os caldos tratados foram resfriados, centrifugados e analisados.

4.3.1. *Nitrogênio*

Os resultados da defecação a pH 6,0 sobre a fração nitrogenada do caldo, determinada e analisada como nitrogênio total, amoniacal, não protéico e protéico, estão apresentados na Tabela 8.

Em relação ao nitrogênio total, observa-se que a defecação simples, a frio e a pH 6,0, com subsequente aquecimento a 100°C por 5 e 60 minutos, contribui para a redução do nitrogênio total do caldo de forma muito semelhante àquela encontrada para os tratamentos térmicos, somente.

A análise estatística dos resultados apresentados no Quadro 7, mostram que os tratamentos diferem significativamente ao nível de 1% de probabilidade e a aplicação do teste de Tukey evidencia que a maior média, correspondente ao tratamento testemunha, difere significativamente, ao nível de 5% de probabilidade, dos tratamentos com defecação

Tabela 8 - Teor de Nitrogênio Total, Protéico, Amoniacal e Não Protéico* contidos no Caldo em Função da Clarificação por Defecação Simples

Amostra	Trata- mento	N Total		N Protéico		N Amoniacal		N Não Protéico*	
		mg/100ml	mg/100 ml	% N total	mg/100ml	% N total	mg/100 ml	% N total	
1	Testemunha	22,19	12,95	58,36	3,36	15,14	5,88	26,50	
	5 minutos	12,60	3,50	27,77	2,38	18,88	6,72	53,33	
	60 minutos	12,60	1,96	15,55	2,24	17,77	8,40	66,66	
2	Testemunha	11,83	7,07	59,76	1,12	9,47	3,64	30,77	
	5 minutos	10,50	6,58	62,66	1,12	10,66	2,80	26,66	
	60 minutos	10,36	5,88	56,76	1,12	10,81	3,34	32,43	
3	Testemunha	14,14	9,66	68,32	1,40	9,90	3,08	21,78	
	5 minutos	12,18	7,70	63,22	1,26	10,34	3,22	26,44	
	60 minutos	11,13	6,65	59,75	1,26	11,32	3,22	28,93	
4	Testemunha	80,92	29,96	37,02	23,66	29,24	27,30	33,73	
	5 minutos	69,65	22,05	31,65	21,70	31,15	25,90	37,18	
	60 minutos	59,78	8,54	14,28	21,14	35,36	30,10	50,35	
5	Testemunha	32,00	15,90	49,69	5,67	17,72	10,43	32,59	
	5 minutos	24,85	10,43	41,97	4,97	20,00	9,45	38,03	
	60 minutos	23,66	7,98	33,73	4,69	19,82	10,99	46,45	
6	Testemunha	38,78	19,88	51,26	7,98	20,58	10,92	28,16	
	5 minutos	28,84	12,04	41,75	6,25	21,67	10,55	36,58	
	60 minutos	28,00	9,66	34,50	6,65	23,75	11,69	41,75	

Média de 3 repetições.

*Não protéico = fração desproteïnizada - N amoniacal

simples (5 e 60 minutos a 100°C), os quais não diferem estatisticamente entre si. A análise estatística vem demonstrar a veracidade das conclusões, entretanto, observando-se as médias de remoção apresentadas na Tabela 9, verifica-se que a redução de nitrogênio total corresponde a 21,70 e 26,14% e que tais resultados são absolutamente similares aos obtidos no tratamento térmico. Para FARNELL (1924), as condições isoelétricas do caldo podem estar mais próximas do pH do caldo in natura do que do caldo caleado, de modo que a expectativa de maior precipitação de corpos nitrogenados deve ocorrer a caldos apenas aquecidos do que em caldos aquecidos após adição de cal.

Os resultados obtidos, embora não difiram dos tratamentos térmicos, são próximos aos encontrados por SATYANARAYANA (1952), que revelam valores de remoção da ordem de 30% para caldos clarificados; GUAZON (1935), que obteve remoções de 10 a 32% com média de 15,6%; PAYNE (1969), que afirma que o nitrogênio removido na clarificação pode variar de 12,5 a 60% sendo a média geral um terço desse valor; LAPIN et alii (1978), que verificaram serem os percentuais de remoção no esquema clássico, 26-27%; ZAKHAROV et alii (1983) que encontraram um máximo de remoção de 36,8%.

Quadro 7 - Efeito da defecação simples do caldo no teor de nitrogênio total

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Nível
Blocos	5	52,710500	10,542100	182,93**	0,00
Tratamentos	2	2,095610	1,047810	18,18**	0,05
Resíduo	10	0,576294	0,057629		
Total	17	55,382400			

Dados transformados para $\sqrt{x + 0,5}$

** - Ao nível de 1% ao menos um contraste de médias difere de zero

Coefficiente de variação = 4,76104%

Teste de Tukey 5% para tratamentos

DMS = 0,380258

Tratamento 1 = 5,51543 A

Tratamento 2 = 4,88733 B

Tratamento 3 = 4,72383 B

Tabela 9 - Remoção de nitrogênio total do caldo, durante o processo de defecação simples

Amostra*	Aquecimento 5 minutos %	Aquecimento 60 minutos %
1	43,21	43,21
2	11,24	12,42
3	13,86	21,28
4	13,93	26,12
5	22,34	26,06
6	25,63	27,79
Média	21,70	26,14

* Cada amostra é apresentada como média de 3 repetições.

Observando-se a Tabela 8, no que se refere aos teores de nitrogênio protéico, observa-se que ocorreu uma redução crescente com o tempo de aquecimento, o que em termos de participação percentual do nitrogênio protéico em relação ao nitrogênio total, se reflete também como um decréscimo.

Estatisticamente, os tratamentos diferem entre si ao nível de 1% de probabilidade. O teste de Tukey detecta que a maior média corresponde à testemunha e difere dos tratamentos 2 e 3 (5 e 60 minutos) e estes, por sua vez, diferem entre si, segundo se pode verificar no Quadro 8.

Comparando-se aos resultados obtidos no tratamento térmico, observa-se à Tabela 10 que a remoção de nitrogênio protéico através da defecação simples, foi de 33,40 e 50,92%, respectivamente, para os tratamentos (2) e (3) e que estes valores são inferiores aos observados no experimento anterior. É provável que a elevação do pH tenha reduzido reações hidrolíticas e a eliminação corresponda mais ao teor de proteínas coaguladas e precipitadas, adsorvidas ao cálcio adicionado. Observa-se que os teores de substâncias nitrogenadas determinadas como nitrogênio amoniacal e não protéico apresentam uma variação muito pequena, variando apenas em termos de concentração relativa, ou seja, quando comparados aos teores de nitrogênio total.

A análise dos dados de nitrogênio não protéico está mostrada no Quadro 9.

Quadro 8 - Efeito da defecação simples do caldo no teor de nitrogênio protéico

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Nível
Blocos	5	8,522490	1,704500	7,09**	0,45
Tratamentos	2	5,138060	2,569030	10,68**	0,33
Resíduo	10	2,405260	0,240526		
Total	17	16,065800			

Dados transformados para $\sqrt{x + 0,5}$

** - Ao nível de 1% ao menos um contraste de médias difere de zero

Coefficiente de variação = 15,0429%

Teste Tukey 5% para tratamentos

DMS = 0,77685

Tratamento 1 = 3,94824 A

Tratamento 2 = 3,18672 AB

Tratamento 3 = 2,64574 B

Tabela 10 - Remoção de nitrogênio protéico do caldo, durante o processo de defecação simples

Amostra*	Aquecimento 5 minutos %	Aquecimento 60 minutos %
1	72,99	84,86
2	6,93	16,83
3	20,29	31,16
4	26,40	71,49
5	34,40	49,81
6	39,43	51,40
Média	33,40	50,92

* Cada amostra é apresentada como média de 3 repetições.

Quadro 9 - Efeito da defecação simples do caldo no teor de nitrogênio não protéico

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Nível
Blocos	5	23,729000	4,745800	393,10**	0,00
Tratamentos	2	0,135666	0,067833	5,62*	2,31
Resíduo	10	0,120728	0,012073		
Total	17	23,985400			

Dados transformados para $\sqrt{x + 0,5}$

* - Ao nível de 5% ao menos um contraste de médias difere de zero

Coefficiente de variação = 3,54763%

Teste de Tukey 5% para tratamentos

DMS = 0,174044

Tratamento 3 = 3,21492 A

Tratamento 1 = 3,06844 AB

Tratamento 2 = 3,00816 B

Em relação ao nitrogênio amoniacal, a análise estatística dos resultados apresentados no Quadro 10, pela aplicação do Teste F, mostrou significância ao nível de 1% de probabilidade para os tratamentos. O teste de Tukey evidencia que a diferença entre os tratamentos é significativa a 5% de probabilidade entre a testemunha e os demais tratamentos. Assim, é possível que uma fração do nitrogênio amoniacal se perca em função da elevação de pH, entretanto, como a fração perdida representa muito pouco, sua participação em relação ao nitrogênio total, ainda aumenta, constituindo cerca de 19,3%.

O nitrogênio amoniacal representa menor fração do que no caldo tratado apenas termicamente, e este fato poderá ser em função do conteúdo natural das amostras mais o percentual perdido decorrente da defecação.

Quadro 10 - Efeito da defecação simples do caldo no teor de nitrogênio amoniacal

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Nível
Blocos	5	25,304800	5,060950	895,09**	0,00
Tratamentos	2	0,127815	0,063908	11,30**	0,27
Resíduo	10	0,056541	0,005654		
Total	17	25,489100			

Dados transformados para $\sqrt{x \times 0,5}$

** - Ao nível de 1% ao menos um contraste de médias difere de zero

Coefficiente de variação = 3,17311%

Teste Tukey 5% para tratamentos

DMS = 0,119108

Tratamento 1 = 2,48786 A

Tratamento 2 = 2,32418 B

Tratamento 3 = 2,29714 B

4.3.2. Fosfatos

Os resultados obtidos em relação aos teores de fosfatos inorgânicos contidos nos caldos tratados por defecação simples a 5 e 60 minutos, a 100°C, são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Teor de fosfato inorgânico contido no caldo, em função da clarificação por defecação simples

Amostra*	Testemunha ppm P ₂ O ₅	5 minutos ppm P ₂ O ₅	60 minutos ppm P ₂ O ₅
1	189,92	116,50	116,50
2	254,54	176,22	176,22
3	151,75	134,12	134,12
4	204,81	109,78	99,64
5	482,50	338,58	302,60
6	410,18	347,80	320,13
Média	282,28	203,83	191,53

* O resultado de cada tratamento é média de 3 repetições.

A análise estatística, mostrada no Quadro 11, evidencia um valor de F significativo ao nível de 1% de probabilidade para tratamentos, e o teste de Tukey mostra que a maior média, correspondente ao tratamento testemunha, difere significativamente ao nível de 5% de probabilidade das amostras tratadas por defecação simples.

As diferenças entre as médias dos tratamentos (2) e (3) correspondentes a defecação por 5 e 60 minutos, estatisticamente, são não significativas.

Quadro 11 - Teor de fosfato contido no caldo em função da clarificação por defecação simples

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M:	F	Nível
Blocos	5	195,323000	39,064600	65,68**	0,00
Tratamentos	2	30,732900	15,366500	25,84**	0,01
Resíduo	10	5,947270	0,594727		
Total	17	232,003000			

Dados transformados para $\sqrt{x + 0,5}$

** - Ao nível de 1% ao menos um contraste de médias difere de zero

Coefficiente de variação = 5,27795%

Teste de Tukey 5% para tratamentos

DMS = 1,22156

Tratamento 1 = 16,44660 A

Tratamento 2 = 13,88190 B

Tratamento 3 = 13,50600 B

A clarificação através da defecação simples está praticamente baseada no conteúdo de íons fosfato disponíveis e o CaO que irá reagir, produzindo o precipitado de fosfato de cálcio, responsável pela adsorção de colóides.

De modo geral, pode-se considerar o teor de fosfato satisfatório para a defecação proposta, uma vez que para defecação convencional, utilizada em usinas de açúcar, que é bastante enérgica se comparada ao presente trabalho, o teor deverá estar no mínimo

a 300 ppm de fosfato, segundo HONIG (1960); BENNETT e RAGNAUTH (1960); GUPTA et alii (1965); JANAKIRAMAIAH et alii (1967); PAYNE (1969); DELGADO et alii (1973a) e SILVA JR. (1976) e para obtenção de pH 6,0, a quantidade de CaO adicionada é bastante pequena.

Embora o teor de CaO adicionado seja bastante baixo, verifica-se que a remoção de P_2O_5 como precipitado de fosfato de cálcio foi da ordem de 78,45 ppm, em média, para o tratamento (2), representando 28,74% de remoção e 90,75 ppm para o tratamento (3), representando 31,93% de remoção (Tabela 12).

Observa-se, ainda, que a remoção de P_2O_5 ocorreu grandemente já nos primeiros 5 minutos a $100^{\circ}C$ e que, praticamente, um tempo maior de tratamento não interfereu no conteúdo removido, mostrando que na defecação, a maior importância está na temperatura e no pH a serem atingidos.

Segundo DAVIES (1969) e PAYNE (1969), a remoção de P_2O_5 , numa eficiente clarificação, é da ordem de 80 a 90% do fosfato existente. Como o presente estudo visa esclarecer o efeito dos tratamentos objetivando apenas purificação para obtenção de mosto, observa-se que nas condições experimentais, o teor de fosfato remanescente é da ordem de 65 a 70%, praticamente suficiente para suprir as necessidades nutricionais das leveduras em fermentação al-

coólica. Comparando-se os resultados dos tratamentos térmicos com os da defecção simples, constata-se que no primeiro caso não houve remoção, e que a defecção promove redução de cerca de 25-30% de fosfato. Ora, se a remoção de nitrogênio é da mesma ordem, e a diferença maior está no teor de fosfato removido, é lícito concluir-se que do ponto de vista da composição de um mosto favorável à fermentação, não se observa vantagem na defecção simples. Assim, em termos de condução de processo, há que se pesar outros parâmetros como redução de corrosão em equipamentos, facilidade de decantação e filtração, uso de insumos para tratamento e fermentação, e outros fatores que permitam cabal avaliação para a sua adoção.

Tabela 12 - Remoção de fosfato inorgânico do caldo, durante processo de defecção simples

Amostra*	Aquecimento 5 minutos	Aquecimento 60 minutos
	%	%
1	38,65	38,65
2	30,76	30,76
3	11,61	11,61
4	46,40	51,35
5	29,82	37,28
6	15,21	21,95
Média	28,74	31,93

* Cada amostra é apresentada como média de 3 repetições.

4.3.3. Contagem de Microorganismos

Como descrito no item 4.2.3., os ensaios de contagem microbiana foram efetuados separadamente apenas para verificar a redução da microflora em função dos tratamentos.

Os resultados estão apresentados na Tabela 13 e os dados analisados estatisticamente, representados no Quadro 12 e nos Quadros 24 a 32 constantes do Apêndice.

Em função do gradativo aquecimento até atingir a temperatura de 100°C e do resfriamento em água corrente, concorrendo para aumentar o tempo de residência a temperaturas próximas à ebulição, o efeito dos tratamentos foi bastante drástico, reduzindo a população no tratamento (2) (5 minutos a 100°C) ao nível do tratamento (3) (60 minutos a 100°C), o que se pode verificar pelas análises estatísticas.

Esta série de experimentos, com caldos defecados, comportam-se praticamente como repetição do ensaio anterior, item 4.2.2, sendo as conclusões, absolutamente iguais às anteriores, inclusive no que tange aos coeficientes de variação.

Tabela 13 - População microbiana do caldo, após clarificação por defecação simples

Amostra	TRATAMENTOS		
	Tempo de aquecimento a 100°C		
	0	5 min	60 min
1	570×10^5	$0,00057 \times 10^5$	$0,00068 \times 10^5$
2	260×10^5	50×10^5	4×10^5
3	234×10^5	$0,183 \times 10^5$	$0,00043 \times 10^5$
4	$48,5 \times 10^5$	$0,00448 \times 10^5$	$0,00160 \times 10^5$
5	45×10^5	$0,006 \times 10^5$	$0,00026 \times 10^5$
6	407×10^5	$0,0293 \times 10^5$	$0,072 \times 10^5$
7	540×10^5	$0,0001 \times 10^5$	$0,0001 \times 10^5$
8	387×10^5	$1,071 \times 10^5$	$0,0323 \times 10^5$
9	540×10^5	$0,004 \times 10^5$	$0,0324 \times 10^5$
10	8×10^5	$0,0091 \times 10^5$	$0,0002 \times 10^5$

Quadro 12 - Efeito da defecação simples do caldo na população microbiana

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Nível
Blocos	9	200,028000	22.225300	1,07ns	42,95
Tratamentos	2	1441,980000	720.990000	34,66**	0,00
Resíduo	18	374,415000	20,800800		
Total	29	2016,420000			

Dados transformados para $\sqrt{x + 0,5}$

** - Ao nível de 1% ao menos um contraste de médias difere de zero
Coeficiente de variação = 75,5417%

Teste de Tukey 5% para tratamentos

DMS = 5,20652

Tratamento 1 = 15,83680 A

Tratamento 2 = 1,41734 B

Tratamento 3 = 0,85818 B

4.4. Fermentação

Os caldos testemunha, tratados termicamente e por defecação simples, discutidos até aqui, foram submetidos à fermentação, em batelada, com a inoculação de 100 ml de uma suspensão contendo 25 g de fermento comercial prensado Fleischmann, previamente tratado a pH 2,5 com ácido sulfúrico.

Procurou-se estudar os possíveis efeitos dos tratamentos sobre as eficiências fermentativas. Os vinhos obtidos a cada ensaio de fermentação foram analisados quanto ao teor de nitrogênio, fosfato, substâncias redutoras residuais, teor alcoólico e massa celular. A fermentação foi deixada correr por cerca de 24 horas, não se determinando parâmetros cinéticos.

4.4.1. Nitrogênio

Em relação ao nitrogênio e suas formas, tal como foi determinado, observa-se que a variação entre cada amostra ensaiada é muito grande (Tabelas 14 e 15) e de difícil interpretação, pouco se encontrando como parâmetros comparativos na literatura.

De uma maneira geral, o nitrogênio total existente no caldo é reduzido pela fermentação, encontrando-se, entretanto, teores muito variáveis no vinho. Se, por um lado,

é esperada a remoção de nitrogênio do caldo pela utilização do elemento pelos microorganismos, há também, por outro lado, autólise destes microorganismos, adsorção de proteínas junto aos microorganismos durante a separação por centrifugação, precipitação por ponto isoelétrico em função do pH do vinho, entre outros fatores.

Segundo HARRISON (1971), o nitrogênio contido na levedura é de 7,5 a 9,0 g/100 g de matéria seca. Admitindo-se que cada 100 g de açúcares totais gere cerca de 1,9 g de matéria seca, em fermentação, teríamos um consumo de cerca de 0,17 g de nitrogênio nessas condições ou nas condições experimentais, de 0,118 a 0,188 g N, o que representaria cerca de 23,6 a 37,6 mg N/100 ml de redução de nitrogênio total, o que nem sempre se verificou. É possível constatar ainda que quando os teores de nitrogênio no caldo são baixos, os valores encontrados no vinho não diferem substancialmente daquele, dificultando a interpretação, o que poderia ser uma consequência do método analítico, cuja sensibilidade a esses níveis se torna crítica.

Em relação às formas amoniacal, protéica e não protéica, suas variações podem ser em decorrência da transformação metabólica realizada pelos microorganismos. Assim, uma redução do nitrogênio amoniacal pode ser uma consequência de sua assimilação e transformação em aminoácidos ou proteínas. Note-se que em alguns casos houve redução,

em outros, manutenção e até acréscimo da forma não protéica que poderia significar um momento biológico onde produtos metabólicos como aminoácidos e NH_4^+ poderiam estar sendo liberados ao meio (SUOMALAINEN e OURA, 1971).

Observa-se, portanto, que em relação ao nitrogênio, nenhuma diferença parece existir, em termos de comportamento metabólico, que permita diferenciar uma fermentação com caldo não tratado, tratado termicamente e por defecação simples.

4.4.2. Fosfatos

Em relação aos fosfatos, observa-se que a riqueza em P_2O_5 dos caldos forneceram sempre teores satisfatórios à fermentação, segundo JONES et alii (1981), STUPIELLO e HORII (1981).

Os teores de fosfato nos vinhos e os consumos expressos em ppm de P_2O_5 , apresentados as Tabelas 16 e 17 mostram que para o tratamento térmico e a defecação simples, os consumos de fosfato variam de forma idêntica, isto é, parece não existir qualquer influência dos tratamentos sobre o consumo. Somente tratamentos testemunhas, nos dois casos em estudo, apresentaram valores por vezes maiores, que poderiam ser decorrentes de maior adsorção, como levantado por LOPES et alii (1984).

Assim, pode-se verificar que os tratamentos praticamente não influenciaram no comportamento das leveduras em relação ao consumo de fosfatos.

Tabela 14 - Teor de nitrogênio total, amoniacoal, não protéico* e protéico contidos no caldo e vinho, em função do tratamento térmico

Anos- tra	Trata- mento	N Total		N amoniacoal		N não protéico		N protéico	
		Caldo mg/100 ml	Vinho ml	Caldo mg/100 ml	Vinho ml	Caldo mg/100 ml	Vinho ml	Caldo mg/100 ml	Vinho ml
1	Testemunha	27,86	19,32	5,46	2,35	7,56	8,74	14,84	8,23
	5 minutos	18,90	15,96	4,90	1,93	10,78	8,15	3,22	5,98
	60 minutos	17,78	14,95	4,69	1,68	10,49	9,74	2,66	3,53
2	Testemunha	40,46	28,39	8,26	4,03	8,26	19,15	23,94	5,21
	5 minutos	32,62	35,78	7,84	2,35	15,96	23,84	8,82	9,58
	60 minutos	31,50	30,32	8,26	3,61	15,26	20,91	7,98	5,80
3	Testemunha	98,14	79,62	35,00	12,01	37,52	54,77	25,62	16,13
	5 minutos	82,04	59,40	29,47	18,65	50,05	38,81	2,52	1,93
	60 minutos	83,79	68,88	31,50	19,32	44,80	44,18	7,49	5,38
4	Testemunha	99,26	54,94	32,90	9,74	44,38	30,28	21,98	14,95
	5 minutos	81,90	54,43	31,31	14,78	43,68	32,26	6,86	7,39
	60 minutos	83,02	49,22	31,15	13,44	50,05	34,20	1,82	2,18
5	Testemunha	50,54	17,14	12,56	1,68	20,34	7,39	17,64	8,06
	5 minutos	40,46	16,80	12,04	2,57	21,42	7,00	7,00	7,22
	60 minutos	42,14	16,80	12,88	2,52	21,00	7,90	8,26	6,38
6	Testemunha	32,62	16,21	6,16	2,18	8,12	8,57	18,34	5,46
	5 minutos	26,32	18,82	5,60	2,02	9,52	9,07	11,20	7,73
	60 minutos	23,39	19,74	6,79	1,85	8,75	12,43	8,05	5,46

Média de 3 repetições

* Não protéico = fração desproteinizada - N amoniacoal

Tabela 15 - Teor de nitrogênio total, amoniacal, não protéico* e protéico contidos no caldo e vinho, em função da clarificação por defecação simples

Anos- tra	Trata- mento	N total		N amoniacal		N não protéico		N protéico	
		Caldo mg/100 ml	Vinho ml	Caldo mg/100 ml	Vinho ml	Caldo mg/100 ml	Vinho ml	Caldo mg/100 ml	Vinho ml
1	Testemunha	22,19	17,98	3,36	2,02	5,88	11,09	12,95	4,87
	5 minutos	12,60	16,38	2,38	1,51	6,77	10,25	3,50	4,62
	60 minutos	12,60	14,62	2,24	1,51	8,40	10,92	1,96	2,35
2	Testemunha	11,83	10,42	1,12	1,01	3,64	5,71	7,07	3,70
	5 minutos	10,50	10,42	1,12	1,01	2,80	3,19	6,58	6,27
	60 minutos	10,36	9,91	1,12	0,84	3,36	4,87	5,88	4,20
3	Testemunha	14,14	14,62	1,40	1,18	3,08	6,72	9,66	6,72
	5 minutos	12,18	14,78	1,26	1,18	3,22	6,55	7,70	7,06
	60 minutos	11,13	13,36	1,26	1,18	3,22	6,55	6,65	5,63
4	Testemunha	80,92	36,96	23,66	3,36	27,30	17,98	29,96	15,62
	5 minutos	69,65	29,65	21,70	3,28	25,90	15,20	22,05	11,17
	60 minutos	59,78	26,38	21,14	3,02	30,10	15,46	8,54	7,90
5	Testemunha	32,00	20,50	5,67	2,35	10,43	12,60	15,90	5,54
	5 minutos	24,85	20,75	4,97	1,68	9,45	9,58	10,43	9,49
	60 minutos	23,66	20,41	4,69	4,37	10,99	6,89	7,98	9,16
6	Testemunha	38,78	14,28	7,98	2,06	10,92	7,85	19,88	4,37
	5 minutos	28,84	15,79	6,25	1,80	10,55	6,60	12,04	7,39
	60 minutos	28,00	15,20	6,65	1,85	11,69	5,38	9,66	7,98

Média de 3 repetições.

* Não protéico = fração desproteinizada - N amoniacal.

Tabela 16 - Teor de fosfato inorgânico contido no vinho e consumido em função do tratamento térmico

Amostra	Testemunha		5 minutos		60 minutos	
	P ₂ O ₅ con-	P ₂ O ₅ no	P ₂ O ₅ con-	P ₂ O ₅ no	P ₂ O ₅ con-	P ₂ O ₅ no
	sumido	vinho	sumido	vinho	sumido	vinho
	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
1	159,93	89,26	123,16	101,03	116,12	108,07
2	283,29	166,39	161,31	333,37	107,23	328,69
3	161,14	158,99	152,60	158,30	126,10	184,80
4	46,51	158,30	102,21	89,68	102,21	89,68
5	166,06	66,42	168,64	56,46	162,19	56,46
6	350,02	119,56	235,81	184,88	221,42	199,27

Tabela 17 - Teor de fosfato inorgânico contido no vinho e consumido em função do processo de defecação simples

Amostra	Testemunha		5 minutos		60 minutos	
	P ₂ O ₅ con-	P ₂ O ₅ no	P ₂ O ₅ con-	P ₂ O ₅ no	P ₂ O ₅ con-	P ₂ O ₅ no
	sumido	vinho	sumido	vinho	sumido	vinho
	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
1	106,51	83,41	50,72	65,78	56,58	59,92
2	177,01	77,53	110,44	65,78	110,44	65,78
3	91,83	59,92	74,00	59,92	74,20	59,92
4	91,89	112,92	43,36	66,42	37,65	61,99
5	324,20	158,30	236,74	101,84	212,94	89,66
6	188,34	221,84	154,74	193,06	133,71	186,42

4.4.3. Massa Celular

Procedeu-se também a determinação da massa celular seca no vinho das amostras fermentadas durante 24 horas com inóculo constituído de 25 g de fermento prensado suspensos em água num volume total de 100 ml.

A análise do peso seco foi realizado segundo o método descrito em Material e Métodos.

Os resultados obtidos são apresentados nas Tabelas 18 e 19, correspondentes aos tratamentos térmico e por defecação simples, respectivamente.

Partindo-se do princípio que a cada 100 g de ART fermentado em meio totalmente anaeróbico, há a formação de 1,9 g de material celular, calculou-se um valor teórico de massa.

Observa-se que houve uma variação grande entre as amostras e que o valor encontrado para a testemunha tende a ser maior que o encontrado para os tratamentos tanto térmico quanto defecação. Na prática, observa-se que a testemunha tende a acumular mais impurezas ou borras, não elimináveis por lavagem e filtração do que os caldos tratados. Assim, o teor de impurezas coloidais, precipitadas ou adsorvidas, retidas pelo filtro Millipore tipo AA, com 0,8 μm de porosidade, 47 mm de diâmetro mascararam grandemente os resultados, impedindo o estudo de incremento de massa

celular em meios naturais como o caldo. É possível que tratamentos com álcalis possam contribuir para melhorar a recuperação a avaliação do fermento, entretanto, experimentos dessa natureza contam ainda com dificuldades como a perfeita homogeneização da amostra no momento da coleta da alíquota a ser analisada. Fica, portanto, prejudicada uma interpretação da influência dos teores principalmente de nitrogênio em relação ao crescimento e produção de álcool, bem como porque uma série de inibidores de crescimento e da fermentação não foram determinadas e suas influências somente poderiam ser melhor detectadas em fermentação contínua em quimiostato, em regime estacionário.

Tabela 18 - Influência do tratamento térmico na produção de massa celular

Amostra	Testemunha g/100 ml	5 minutos g/100 ml	60 minutos g/100 ml	Média da massa celular obtida g/100 ml	Média da massa celular teórica g/100 ml	Média do ATP p/p
1	1,912	2,209	2,177	2,099	1,7318	19,61
2	1,605	1,372	1,340	1,439	1,6608	15,69
3	1,374	1,335	1,300	1,336	1,6774	16,62
4	1,684	1,540	1,603	1,609	1,6650	15,88
5	1,757	1,441	1,528	1,575	1,6600	15,66
6	1,844	1,656	1,586	1,695	1,6503	15,15

Tabela 19 - Influência da defecação simples na produção de massa celular

Amostras	Testemunha g/100 ml	5 minutos g/100 ml	60 minutos g/100 ml	Média da massa celular obtida g/100 ml	Média da massa celular teórica g/100 ml	Média do API p/p
1	2,418	2,247	2,439	2,368	1,7417	20,16
2	1,767	1,690	1,611	1,689	1,7292	19,51
3	1,873	1,826	1,835	1,845	1,7299	19,53
4	1,553	1,573	1,537	1,554	1,6735	16,39
5	1,812	1,522	1,622	1,652	1,6304	14,01
6	1,846	1,761	1,620	1,742	1,6162	13,19

4.4.4. Eficiência de Fermentação e de Conversão

Considerando que cada amostra não era repetição, pois tinha um teor de açúcares totais diferente que variou de 13,09 a 20,24 g/100 g e que gerou um teor alcoólico de 5,30 a 8,60%, em peso, correspondentes a 6,64 a 10,72% em volume, foi calculada a eficiência de fermentação e de conversão. Denominou-se eficiência de fermentação à relação percentual entre o álcool produzido e o álcool teórico passível de ser obtido a partir do açúcar total contido no mosto, baseado na relação estequiométrica da equação de Gay-Lussac. Denominou-se eficiência de conversão, à eficiência calculada com base no açúcar total consumido, ou seja, a diferença en-

tre o açúcar total do mosto e o total de açúcares residuais encontrados no vinho.

Observa-se nas Tabelas 20 a 25 que os teores de açúcares totais do mosto não influíram basicamente no teor alcoólico a ponto de levarem à fermentação incompleta pois os teores de açúcares residuais quando diferiram entre tratamentos, ocorreu de forma fortuita, sendo provavelmente decorrente do momento considerado final da fermentação.

Verifica-se que os tratamentos térmicos e a defecação simples não diferiram entre si e nem em relação à testemunha no que tange as eficiências de fermentação e conversão (Tabelas 26 e 27).

Os Quadros 13 a 16 mostram a estatística aplicada aos resultados, demonstrando a afirmação anterior.

Em parte, é possível que a não diferenciação entre os valores discutidos se deva também à eficácia do tratamento do fermento, indiretamente, mantendo pH em torno de 4,0 nas testemunhas, enquanto nas amostras tratadas, independente do pH, o nível de contaminantes tenha se mantido em proporções desprezíveis em virtude da eficiência dos tratamentos térmicos não interferindo na transformação de açúcar em álcool pelas leveduras. Aliás, sobre este assunto, BRYAN-JONES (1975) mostra com muita propriedade a influência do abaixamento do pH sobre o tempo de geração de bactérias

láticas, enquanto YAROVENKO (1964) e HARRISON e GRAHAM (1970) chamam a atenção para o fato de que alta densidade de leveduras no meio de fermentação mantém as bactérias contaminantes do ácido lático e do ácido acético com poucas possibilidades de desenvolvimento, relatando que baixo inóculo, da ordem de 2 a 3×10^6 células por ml no meio de fermentação são mais sensíveis a infecção por bactérias láticas e outros organismos. Calculando-se, no mínimo, 10^{10} células por grama de fermento prensado, o inóculo utilizado no presente trabalho representa cerca de 25×10^8 células por mililitro, capazes de garantir uma fermentação de poucos riscos, segundo os autores anteriormente citados.

Tabela 20. Parâmetros das fermentações de caldos testemunha, tratamento térmico e defecação simples

Anos- tra	TESTEMUNHA				SEM				TRATAMENTO I			
	Caldos		Inoc.		Vinho		Vinho		Vinho		Efiências	
	Peso g	% ART (p/p)	pH	Peso g	% ART (p/p)	% APP (p/p)	% Alcool (p/p)	pH	Ferm.	Conv.		
1	545,32	19,64	2,51	595,81	0,090	8,26	4,0	89,90	90,36			
2	529,75	15,47	2,47	592,51	0,070	6,46	4,05	91,40	91,86			
3	533,74	16,48	2,43	592,24	0,113	6,85	4,23	90,24	90,93			
4	535,36	15,74	2,50	595,96	0,100	6,65	4,21	92,01	92,67			
5	528,79	15,72	2,46	592,29	0,075	6,46	3,89	90,06	90,53			
6	534,39	15,13	2,50	597,27	0,076	6,33	3,86	91,50	92,02			

Testemunha Sem Tratamento I - São os caldos testemunhas da série correspondente aos TRATAMENTOS TÉRMICOS (5 e 60 minutos).

Tabela 21. Parâmetros das fermentações de caldos testemunha, tratamento térmico e defecação simples

Anos- tra	TRATAMENTO TÉRMICO									
	Caldo		Inoc.		5 MINUTOS		A 100°C		Eficiências	
	Peso g	ARR (p/p)	pH	Peso g	ARR (p/p)	Vinho % (p/p)	Alcool % (p/p)	pH	Ferm.	Conv.
1	538,35	19,76	2,47	591,34	0,34	8,19	4,08	89,07	90,63	
2	534,67	15,94	2,48	592,10	0,071	6,72	4,19	91,34	91,79	
3	534,17	16,68	2,44	590,62	0,118	7,05	4,29	91,44	92,16	
4	532,33	15,95	2,51	592,04	0,091	6,85	4,22	93,45	94,05	
5	535,49	15,65	2,42	598,12	0,076	6,59	3,93	92,04	92,54	
6	526,95	15,36	2,50	590,05	0,061	6,39	3,75	91,13	91,54	

Tabela 22. Parâmetros das fermentações de caldos testemunha, tratamento térmico e defecação simples

Anos- tra	TRATAMENTO TÉRMICO									
	Caldo		Inoc.		TRATAMENTO 60 MINUTOS		A 100°C		Eficiências	
	Peso g	ART % (p/p)	pH	Peso g	ARR % (p/p)	Vinho	Alcool % (p/p)	pH	Ferm.	Conv.
1	539,50	19,43	2,47	592,60	0,44	8,26		4,12	91,37	93,70
2	535,59	15,67	2,45	593,17	0,071	6,65		4,20	91,96	92,43
3	537,09	16,70	2,34	593,95	0,105	6,92		4,21	89,66	90,23
4	537,93	15,94	2,49	597,54	0,086	6,85		4,22	93,39	93,96
5	534,21	15,63	2,42	596,68	0,087	6,65		3,96	92,97	93,56
6	533,35	14,95	2,51	596,28	0,054	6,33		3,73	92,61	92,99

Tabela 23. Parâmetros das fermentações de caldos testemunha, tratamento térmico e defecação simples

Anos- tra	TESTEMUNHA SEM TRATAMENTO II									
	Caldo		Inoc.		Vinho				Eficiências	
	peso g	ART % (p/p)	pH	Peso g	APR % (p/p)	Alcool % (p/p)	pH	Ferm.	Conv.	
1	540,48	20,09	2,50	590,14	0,085	8,46	3,88	89,96	90,39	
2	537,06	19,60	2,49	587,81	0,056	8,33	3,78	91,00	91,29	
3	540,91	19,80	2,45	592,60	0,046	8,33	3,78	90,17	90,40	
4	534,90	16,40	2,48	594,09	0,073	6,85	4,12	90,78	91,23	
5	530,24	14,18	2,49	596,26	0,061	5,75	4,05	89,22	89,65	
6	528,77	13,29	2,50	597,07	0,058	5,43	3,97	90,28	90,71	

Testemunha Sem Tratamento II - São os caldos testemunhas da série correspondente à DEFECAÇÃO SIMPLES (5 e 60 minutos).

Tabela 24. Parâmetros das fermentações de caldos testemunha, tratamento térmico e defecação simples

Anos- tra	DEFECAÇÃO SIMPLES									
	TRATAMENTO 5 MINUTOS A 100°C									
	Caldo		Inoc.	Vinho					Eficiências	
	Peso g	ART % (p/p)		Peso g	ARR % (p/p)	Álcool % (p/p)	pH	Ferm.	Conv.	
1	540,55	20,17	2,50	591,49	0,085	8,60	4,25	91,28	91,70	
2	544,49	19,60	2,47	595,86	0,168	8,19	3,95	89,48	90,32	
3	538,65	19,54	2,46	590,43	0,053	8,39	3,94	92,07	92,35	
4	534,92	16,27	2,45	594,29	0,059	6,78	4,29	90,58	90,94	
5	525,51	13,85	2,50	593,24	0,050	5,62	4,24	91,82	90,00	
6	529,51	13,09	2,46	599,29	0,054	5,37	4,11	90,83	91,27	

Tabela 25. Parâmetros das fermentações de caldos testemunha, tratamento térmico e defecação simples

Anos- tra	DEFECAÇÃO SIMPLES									
	TRATAMENTO 60 MINUTOS A 100°C									
	Caldo		Inoc.		Vinho			Eficiências		
	Peso g	ART % (p/p)	pH	Peso g	ARR % (p/p)	Alcool % (p/p)	pH	Fem.	Conv.	
1	544,54	20,24	2,49	595,27	0,085	8,60	4,25	90,87	91,30	
2	537,26	19,33	2,47	588,82	0,095	8,33	3,96	92,41	92,91	
3	541,18	19,25	2,44	593,68	0,157	7,99	3,97	89,09	89,90	
4	535,40	16,50	2,43	594,70	0,059	6,85	4,28	90,21	90,57	
5	530,76	14,00	2,50	596,81	0,052	5,68	4,22	89,26	89,63	
6	524,45	13,18	2,47	594,67	0,036	5,30	4,05	89,22	89,50	

Tabela 26. Eficiências de fermentação e de conversão em caldos com tratamento térmico

Amostra	TRATAMENTO TÉRMICO					
	TESTEMUNHA		5 MINUTOS		60 MINUTOS	
	E.F.	E.C.	E.F.	E.C.	E.F.	E.C.
1	89,90	90,36	89,07	90,63	91,37	93,70
2	91,40	91,86	91,34	91,79	91,96	92,43
3	90,24	90,93	91,44	92,16	89,66	90,23
4	92,01	92,67	93,45	94,05	93,39	93,96
5	90,06	90,53	92,04	92,54	92,97	93,56
6	91,50	92,02	91,13	91,54	92,61	92,99
$\bar{M}_{EF}$	90,85	-	91,41	-	91,99	-
$\bar{M}_{EC}$	-	91,40	-	92,12	-	92,81

Tabela 27 - Eficiências de fermentação e de conversão em caldos com defecação simples

Anostra	DEFECAÇÃO SIMPLES					
	TESTEMUNHA		5 MINUTOS		60 MINUTOS	
	E.F.	E.C.	E.F.	E.C.	E.F.	E.C.
1	89,96	90,39	91,28	91,70	90,87	91,30
2	91,00	91,29	89,48	90,32	92,41	92,91
3	90,17	90,40	92,07	92,35	89,09	89,90
4	90,78	91,23	90,58	90,94	90,21	90,57
5	89,22	89,65	91,82	90,00	89,26	89,63
6	90,28	90,71	90,83	91,27	89,22	89,50
$\bar{M}_{EF}$	90,24	-	91,01	-	90,18	-
$\bar{M}_{EC}$	-	90,61	-	91,10	-	90,64

Quadro 13 - Eficiência de fermentação em caldos com tratamento térmico

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Nível
Blocos	5	0,042847	0,008569	4,39*	2,25
Tratamentos	2	0,011475	0,005737	2,94ns	9,92
Resíduo	10	0,019531	0,001953		
Total	17	0,073853			

Dados transformados para $\sqrt{x} + 0,5$

Coefficiente de variação = 0,46097%

Teste de Tukey 5% para tratamentos

DMS = 0,0700037

Tratamento 3 = 9,61713 A

Tratamento 2 = 9,58682 A

Tratamento 1 = 9,55771 A

Quadro 14 - Eficiência de conversão em caldos com tratamento térmico

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Nível
Blocos	5	0,029419	0,005884	2,37ns	11,46
Tratamentos	2	0,017822	0,008911	3,60ns	6,66
Resíduo	10	0,024780	0,002478		
Total	17	0,072021			

Dados transformados para $\sqrt{x} + 0,5$

Coefficiente de variação = 0,517294%

Teste Tukey 5% para tratamentos

DMS = 0,0788514

Tratamento 3 = 9,65958 A

Tratamento 2 = 9,62369 A

Tratamento 1 = 9,58609 A

Quadro 15 - Eficiência de fermentação em caldos com defecação simples

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Nível
Blocos	5	0,005127	0,001025	0,29ns	90,57
Tratamentos	2	0,007813	0,003906	1,12ns	36,43
Resíduo	10	0,034912	0,003491		
Total	17	0,047852			

Dados transformados para $\sqrt{x + 0,5}$

Coeficiente de variação = 0,619492%

Teste Tukey 5% para tratamentos

DMS = 0,0935932

Tratamento 2 = 9,56598 A

Tratamento 1 = 9,52545 A

Tratamento 3 = 9,52223 A

Quadro 16 - Eficiência de conversão em caldos com defecação simples

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Nível
Blocos	5	0,014893	0,002979	1,26ns	35,32
Tratamentos	2	0,002075	0,001038	0,44ns	65,70
Resíduo	10	0,023682	0,002368		
Total	17	0,040649			

Dados transformados para $\sqrt{x + 0,5}$

Coeficiente de variação = 0,509355%

Teste Tukey 5% para tratamentos

DMS = 0,0770836

Tratamento 2 = 9,57053 A

Tratamento 3 = 9,54627 A

Tratamento 1 = 9,54520 A

5. CONCLUSÕES

A série de experimentos realizados, em condições de laboratório, para aquilatar a influência de tratamentos térmicos e defecação simples sobre a composição de substâncias nitrogenadas e fosfato inorgânico do caldo de cana e fermentação alcoólica conduzida por esta matéria-prima permitiram chegar às conclusões que se seguem:

- O Tratamento térmico e a defecação simples levaram a resultados similares quanto à remoção de nitrogênio total.

- O teor de nitrogênio amoniacal permaneceu praticamente inalterado em função da defecação e dos tratamentos térmicos.

- A remoção de nitrogênio protéico foi inferior na defecação simples, em relação ao tratamento térmico.

- Houve acréscimo da fração não protéica, após

tratamentos térmicos, concorrendo para um aumento na fração de nitrogênio disponível à fermentação. Ao contrário da defecação simples, em que o teor de nitrogênio não protéico permaneceu praticamente inalterado.

- A remoção de fosfato inorgânico ocorreu significativamente na defecação simples, enquanto nos tratamentos térmicos isso não se verificou.

- A redução da população microbiana pela defecação simples foi absolutamente igual à encontrada no tratamento térmico.

- Os teores de nitrogênio e fosfato nos caldos tratados termicamente e por defecação simples, não influenciaram nas eficiências fermentativas e de conversão.

- As alterações químicas ocorridas nos caldos tratados como foram descritos nestes experimentos, não interferiram no comportamento fermentativo das leveduras, embora não tenha sido analisada sob aspecto cinético.

As vantagens e desvantagens dos tratamentos em caráter industrial deverão ser estudadas sob aspectos físicos, de remoção de impurezas sólidas insolúveis, de corrosão de equipamentos, de consumo de insumos, de ordem econômica e particularidades de processo que fogem dos parâmetros estudados na presente pesquisa.

6. LITERATURA CITADA

AGARWAL, S.K.D. e R.C. JOHARY, 1974. Some observations on the variation in the aminoacids in juices during clarification. Sharkara. Kanpur, 13:89-95. Apud. La sucrerie belge and sugar industry abstracts. England, 39(2):17, 1977.

ALTERTHUM, F.; M.R.M. CRUZ; M.L.R. VAIRO e D.M. GAMBASSI, 1984. Efeito dos microrganismos contaminantes da fermentação alcoólica nas microdestilarias. STAB. Piracicaba, 3:42-49.

AMORIM, H.V., 1977. Introdução à bioquímica da fermentação alcoólica. Araras, PLANALSUCAR, 91 p.

AMORIM, H.V.; A.J. OLIVEIRA e H. CAMPOS, 1981. Infecção, problema sério na produção de álcool. In: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DE TÉCNICOS AÇUCAREIROS DO BRASIL, 2º, Rio de Janeiro. Anais p. 158-168.

- ARAÚJO, N.Q., 1970. Problemas da fermentação alcoólica industrial. Brasil Açucareiro. Rio de Janeiro, 75(4):60-87; (5):43-60.
- ATKIN, L.A.; P.P. GRAY; W. MOSES e M. FEINSTEIN, 1962. Growth and fermentation factors for different brewery yeasts. Wallerstein Laboratories Communications. New York, 25:122-134.
- BAILEY, J.L., 1967. Techniques in protein chemistry. Amsterdam, Elsevier, 406 p.
- BEEVERS, L. e R.H. HAGEMAN, 1969. Nitrate reduction in higher plants. Annual Review of Plant Physiology. California, 20:494-518.
- BENNETT, M.C., 1957a. The physical nature and behavior of cane sugar juice. The International Sugar Journal. London, 59:176-177; 208-212.
- BENNETT, M.C., 1957b. Behavior of adsorbed protein in cane sugar juice. Journal of Colloid Science. New York, 12: 434-451.
- BENNETT, M.C., 1959. The factors affecting stability and flocculation in cane juice. The International Sugar Journal. London, 61:77-80, 109-111; 135-138.

- BENNETT, M.C. e J.M. RAGNAUTH, 1960. The effects of calcium and phosphate in cane juice clarification. The International Sugar Journal. London, 62:13-16.
- BEVAN, D. e J. BOND, 1971. Microorganisms in fields and mill - a preliminary survey. In: CONFERENCE OF THE QUEENSLAND SOCIETY OF SUGAR TECHNOLOGISTS, 389, Brisbane. Proceedings p. 137-143.
- BINKLEY, W.W., 1959. The fate of the principal simple sugars of cane juice during molasses formation. The International Sugar Journal. London, 61:173-175.
- BLISS, L.R. e P. MADON, 1946. Sugar and Alcohol Techniques. Rio de Janeiro, Batista. 163 p.
- BOND, J.D., 1925. Defecation in cane sugar manufacture. The Internacional Sugar Journal. London, 27:311-317.
- BORDEN, R.J., 1948. Nitrogen effects upon the yield and composition of sugar cane. Hawaiian Planter's Record. Honolulu, 52:1-51.
- BROCK, T.D., 1967. Life at high temperatures. Science. Washington, 158:1012-1019.
- BRYAN-JONES, G., 1975. Lactic acid bacteria in distillery fermentations. In: LONG ASHTON SYMPOSIUM, 49, 1973. Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food: Proceedings, ed. by J.G. CARR; C.V. CUTTING e G.C. WHITING. New York. Academic Press, p. 165-175.

- BURKHOLDER, P.R.; I. McVEIGH e D. MOYER, 1944. Studies on some growth factors of yeasts. Journal of Bacteriology. Baltimore, 48:385-391.
- CÉSAR, M.A.A.; M.R. MAZZARI e E.R. OLIVEIRA, 1972. O teor de fósforo no caldo de algumas variedades de cana-de-açúcar. Brasil Açucareiro, Rio de Janeiro, 79:34-38.
- CÉSAR, M.A.A.; E.R. OLIVEIRA e M.R. MAZZARI, 1974. Teor de fósforo de algumas variedades de cana-de-açúcar. II. Segundo Corte (soca). Brasil Açucareiro. Rio de Janeiro, 83:21-25.
- CLARKE, M.A.; E.J. ROBERTS; M.A. GODSHALL; M.A. BRANNAN; F.G. CARPENTER e E.E. COLL, 1980. Sucrose loss in the manufacture of cane sugar. Sugar y Azucar. New York, 75:64-68.
- COPERSUCAR, 1983. Controle microbiológico na fabricação de açúcar e álcool. Boletim Técnico COPERSUCAR. São Paulo, 22:2-17.
- DAS, U.K., 1936. Nitrogen nutrition of sugar cane. Plant Physiology. Lancaster, 11:251-317.
- DAVIES, J.G., 1936. Recent improvements in simple clarification for raw sugar production. Trinidad, B.W.I., Imperial College of Tropic Agriculture. In: HONIG, P., Ed. Princípios de Tecnologia Azucarera. México. Editorial Continental, v.1, p.438.

- DAVIES, J.G., 1969. Tecnologia del Proceso de Clarificação.
In: HONIG, P., Ed. Principios de Tecnologia Azucarera.
México, Editorial Continental, v.1, p. 465-502.
- DEBÉN, J.G., 1976. The chemistry of calcium phosphate
precipitation in cane juice clarification. The International
Sugar Journal. London, (925):3-7, 35-39.
- DEER, N., 1916. The clarification of cane juice in the
manufacture of raw sugar. The International Sugar Journal.
London, 18:502-506, 558-563.
- DELGADO, A.A.; L.J. FERREIRA e D. BARBIN, 1973a. Estudos sobre
o comportamento do fósforo na clarificação do caldo de ca-
na. I - O comportamento do caldo de três variedades de
cana-de-açúcar na clarificação, em função do teor de fósfo-
ro. Brasil Açucareiro. Rio de Janeiro, 81:55-64.
- DELGADO, A.A.; L.J. FERREIRA e D. BARBIN, 1973b. Estudos sobre
o comportamento do fósforo na clarificação do caldo de ca-
na. II - O comportamento de três variedades de cana-de-açú-
car na clarificação do caldo, em função de teorias variá-
veis de fósforo. Brasil Açucareiro. Rio de Janeiro, 82:55-
75.
- DOBZYCKI, J., 1982. Effectiveness of juice purification.
Gazeta Cukrownicza. Warszawa. 90:153-156. Apud. Tate e
Lyle's sugar industry abstracts. England, 45(5):148, 1983.

- DOOR, J.V.N. e F.P. LASSETER, 1946. Solid/liquid separation. In: ALEXANDER, J., Ed. Colloid Chemistry Theoretical and Applied. New York, Reinhold, p. 782-799.
- FARNELL, R.G.W., 1924. The effect of cold and of hot liming on the removal of albumin from cane juices. The International Sugar Journal. London, 26:359-363.
- FORT, C.A. e B.A. SMITH, 1954. Studies of the chemical composition of materials causing turbidity in clarified sugarcane juices. Sugar Journal. New Orleans, 17:18-21.
- FORT, C.A. e N. MCKAIG Jr., 1939. Comparative chemical composition of juices of different varieties of Louisiana sugarcane. Washington, U.S. Department of Agriculture, 68p. (Technical Bulletin, 688).
- FULMER, E.I.; V.E. NELSON e F.F. SHERWOOD, 1921. The nutritional requirements of yeast. II. The effect of the composition of the medium on the growth of yeast. The Journal of the American Chemical Society. Easton, Pa., 43:191-199.
- GEERLIGS, H.C.P., 1924. Cane Sugar and its Manufacture. 2a. ed. New York, Van Nostrand. 342p.
- GLORIA, N.A. e A.A. RODELLA, 1972. Métodos de análise quantitativa inorgânica em caldo de cana-de-açúcar; vinhaça e melaço. I. Determinação de cálcio, magnésio, potássio, enxôfre e fósforo em um mesmo extrato. Anais da ESALQ. Piracicaba, 29:5-17.

- GOMES, F.P., 1982. Curso de Estatística Experimental. 10^a ed. Piracicaba, Nobel. 430p.
- GOMORI, G., 1942. A modification of the colorimetric phosphorus determination for use with the photoelectric colorimeter. Journal of Laboratory and Clinical Medicine. St. Louis, 27:955-960.
- GOSWAMI, A.K. e J.S. WILLCOX, 1969. Effect of applying increasing level of nitrogen to rye-grass. I. Composition of various nitrogenous fractions and the aminoacids. Journal of the Science of Food and Agriculture. London, 20:592-594.
- GRUSZECKA, H., 1983. Determination of the contents of phosphorus compounds in sugar industry solutions. Gazeta cukrownicza. Warszawa. 91:86-87 Apud. Tate e Lyle's sugar industry abstracts, England. 45(6):196-197, 1983.
- GUAZON, G.A., 1935. Clarification and the role of colloids. The International Sugar Journal. London, 37:32.
- GUIMARÃES, E. e G.M.A. SILVA, 1976. Estudo de variedades de cana-de-açúcar quanto ao teor de fósforo no caldo - ensaio preliminar. In: SEMINÁRIO COPERSUCAR DA AGROINDÚSTRIA AÇUCAREIRA, 49, Águas de Lindóia. Anais p. 41-43.

- GUPTA, A.P. e B. PRASAD, 1967. Factors affecting ash content in cane juice. I. Cane varieties. In: CONVENTION OF THE SUGAR TECHNOLOGISTS' ASSOCIATION OF INDIA, 35º, Kanpur. Proceedings p.207-209.
- GUPTA, A.P.; I.S. JUNEJA e S.P. SHUKLA, 1968. Deterioration of sugar cane after harvest. In: CONVENTION OF THE SUGAR TECHNOLOGISTS' ASSOCIATION OF INDIA, 36º, Kanpur. Proceedings p. 5-13.
- GUPTA, S.C.; N.A. RAMAIAH e M.B. KUMAR, 1965. Studies on the use of phosphate in the clarified juice. In: CONVENTION OF THE SUGAR TECHNOLOGISTS' ASSOCIATION OF INDIA, 33º, Kanpur. Proceedings p. 205-215.
- HARDY, F., 1927. The component of sugarcane juice. Tropical Agriculture. Trinidad, 4:38-40 (suppl. sept.).
- HARRISON, J.S., 1971. Yeast production. In: HOCKENHULL, D.J.D., Ed. Progress in Industrial Microbiology. London, Churchill Livinstone, v. 10, p.129-177.
- HARRISON, J.S. e J.C.J. GRAHAM, 1970. Yeasts in distillery practice. In: ROSE, A.H. e J.S. HARRISON, Ed. The Yeasts. London, Academic Press, v. 3, p. 283-348.
- HARTELIUS, V., 1938. Comparative studies on the value of amino acids as a source of nitrogen for yeast. Biochemische Zeitschrift. Berlin, 299:317-333. Apud. Chemical Abstracts. Easton, Pa., 33(9):3414, 1939.

- HARTT, C.E., 1970. Effect of nitrogen deficiency upon translocation of ^{14}C in sugarcane. Plant Physiology. Lancaster, 46:419-422.
- HIDI, P., 1969. Aspects of the colloid chemistry of cane juice clarification. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS', 139, Taiwan, 1968. Proceedings. Amsterdam, Elsevier, p. 1736-1743.
- HONIG, P., 1934. Distribution of non-sugars in the cane. The International Sugar Journal. London, 36:272-273.
- HONIG, P., 1950. Clay in the cane sugar industry. Chronica Naturae. Kolff, 106:101-104. Apud. Sugar industry abstracts. England. 12(9):168, 1950.
- HONIG, P., 1952. Phosphor-containing non-sugars in cane juices. American Chemical Society, 21 Meeting. Apud. Sugar industry abstracts. England, 14(5):66, 1952.
- HONIG, P., 1960. The presence of phosphates in cane juices. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS', 109, Hawaii, 1959. Proceedings. Amsterdam, Elsevier, p. 356-361.
- HONIG, P., 1969. No-azucares inorganicos. In: HONIG, P., Ed. Principios de Tecnologia Azucarera. México, Editorial Continental, v. 1, 265-322.

JANAKIRAMAIAH, K.; N. SATYANARAYAN e T.S.N. MURTY, 1967.

The need of phosphates in the cane juice clarification.

In: CONVENTION OF THE SUGAR TECHNOLOGISTS' ASSOCIATION
OF INDIA, 35º, Kanpur. Proceedings p. 207-209.

JONES, R.P.; N. PAMMENT e P.F. GREENFIELD, 1981. Alcohol

fermentation by yeasts - the effect of environmental and
other variables. Process Biochemistry. London, 16:42-49.

KING, R.H., 1931. Cane juice liming and clarification.

Industrial and Engineering Chemistry. Easton, Pa. 23:954-965.

KLAN, K., 1965. Métodos industriais da cana-de-açúcar. Brasil

Açucareiro. Rio de Janeiro, 65:51-54.

KOWKABANY, G.N.; W.W. BINKLEY e M.L. WOLFROM, 1953. Aminoacids

in cane juice and cane final molasses. Journal of
Agricultural and Food Chemistry. Easton, Pa., 1:84-87.

KUBADINOW, N. e W. HAMPEL, 1975. Le comportement des acides

aminés libres au cours de l'épuration des jus. La Sucrierie
Belge. Tienen, 94:394-404.

LANE, J.H. e L. EYNON, 1934. Determination of reducing sugar

by Fehlings' solution with methylene blue indicator. London,
Norman Rodger, 8p.

- LAPIN, A.P.; K.P. ZAKHAROV e V.Z. SEMENENKO, 1978. Effect of lime treatment of juice before 2nd carbonatation on results of diffusion juice purification. Sakharnaya Promyshlennost' Moscow, 2:27-34. Apud. La sucrerie belge and sugar industry abstracts. England. 40(9):116, 1978.
- LEE, H.A., 1926. Report on sugar cane pathology. Proceedings Hawaiian Sugar Planters Association. Honolulu, p. 248-254. Apud. Chemical Abstracts. Easton, Pa., 21(20):3414-3415, 1927.
- LEVANDOVSKII, L.V.; A.D. KAVALENKO; V.K. YANCHEVSKII; V.V. RUDAYA e V.V. CHEREDNICHENKO, 1981. Determination of mineral nutrition needs in accelerated fermentation of molasses wort. Fermentn. Spirt. Prom. USSR, 1:11-13 Apud. Chemical Abstracts. Columbus, 94(19):501, 1981.
- LITVINENKO, L.A.; M.E. KINTANA e S.B. PETRIKEVICH, 1980. Effect of nitrogen input concentration on the growth of Candida utilis in continuous culture with pulsed carbon feed. Mikrobiologiya. U.S.S.R., 49:945-951 Apud. Chemical Abstracts. Columbus, 94(11):561, 1981.
- LOPES, J.J.C.; J.R.A. LEME; S.E. FERRARI; A.L. VICENTE e A. MENCK, 1984. Eficiência de fermentação alcoólica utilizando-se duas fontes de fósforo em escala industrial. In: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DE TÉCNICOS AÇUCAREIROS E ALCOOLEIROS DO BRASIL, 3º, São Paulo. Anais. p.446-448.

- LUCREDI, H.A.; J. FINQUERUT e K.H. LEIMER, 1984. Verificação da esterilidade do sistema de tratamento térmico do caldo de cana-de-açúcar para a fermentação. Boletim Técnico COPERSUCAR. São Paulo, 27:25-28.
- MCNEIL, K.E. e P.A. INKERMANN, 1977. Preliminary studies on the deterioration of long-standing-burnt cane. In: CONFERENCE OF THE QUEENSLAND SOCIETY OF SUGAR TECHNOLOGISTS, 44º, Brisbane, Proceedings p.19-27.
- MAGALHÃES, M.M.A.; M.L.R. VAIRO e W. BORZANI, 1980. Influência da adição de fonte de nitrogênio ao mosto no teor de proteína da levedura residual de fermentação alcoólica de melaço de cana-de-açúcar. Revista Brasileira de Tecnologia. Rio de Janeiro, 11:13-21.
- MARTIN, L.F., 1969. Las substancias organicas complejas, no-azucares, de alto peso molecular. In: HONIG, P., Ed. Principios de Tecnologia Azucarera. México, Editorial Continental, v. 1, p.173-187.
- MASSART, L. e J. HORENS, 1952. L'assimilation d'azote aminé par les levures. Enzymologia Acta Biocatalytica. Netherlands, 15:359-361.
- MEEKER, E.W. e E.C. WAGNER, 1933. Titration of ammonia in presence of boric acid. Industrial and Engineering Chemistry Analytical Edition, Easton Pa., 5:396-398.

- MINAMI, P.S., 1975. Assimilação de fontes de C e N por Sporotrichum schenckii na fase leveduriforme. Revista de Microbiologia. São Paulo, 6:35-37.
- MORRIS, E.O., 1958. Yeast growth. In: COOK, A.H., Ed. The Chemistry and Biology of Yeasts. New York, Academic Press, p. 251-321.
- NIELSEN, N., 1935. Untersuchungen uber den gehalt der bierwurze an durch hefe assimilierbarem stickstoff. Comptes Rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg. Série Physiologique. Copenhague, 21:113-138.
- NIZOVKIN, V.K. e I.Z. EMEL'YANOVA, 1960. Ebullioscopic method of determining reducing sugars. The International Sugar Journal. London, 62:230.
- OLBRICH, H.T., 1963. Molasses. In: HONIG, P., Ed. Principles of Sugar Technology. Amsterdam, Elsevier, v. 3, p.511-696.
- OVERBEEK, J.T.G., 1952. Rheology of lyophobic systems. In: KRUYT, H.R., Ed. Colloid Science. Amsterdam, Elsevier, v.1, p.342-368.
- OVERBEEK, J.T.G., 1952. Stability of hidrophobic colloids and emulsions. In: KRUYT, H.R., Ed. Colloid Science. Amsterdam, Elsevier, v.1, p.302-341.
- PAINE, H.S. e J.C. KEANE, 1927. A study of cane juice defecation at various pH values. The International Sugar Journal. London, 29:315-321.

- PAINE, H.S.; J.C. KEANE e M.A. McCALIP, 1928. Influence of phosphate and colloid contents of cane juice on defecation. Industrial and Engineering Chemistry. Easton, Pa. 20:262-267.
- PAVLAS, P. e O.M. HAUSLEROVÁ, 1956. Proteins of thick juice and the decomposition products of proteins arising from alkalines decomposition during defecation and saturation. Listy Cukrovarnické. Prague, 72:263-268 Apud. Sugar Industry abstracts, England, 19(2-3):23, 1957.
- PAYNE, J.H., 1969. Reacciones fundamentales del proceso de clarification. In: HONIG, P., Ed. Principios de Tecnología Azucarera. México, Editorial Continental, v.1, p.437-464.
- PEREZ, M.D. e M.C.R. GUTIÉRREZ, 1977. Eliminación de las sustancias coloidales del jugo de cana. Centro Azucar. Cuba, 2:35-51.
- PEREZ, M.D.; M.Q. SUÁREZ e G.D. FERNANDEZ, 1978. Dinamica de las sustancias nitrogenadas en el proceso de fabricación de azucar de cana. Centro Azucar., Cuba, 3:57-62.
- PIRSCHALE, K., 1930. Biological observations on the growth of yeast with special reference to nitrates as a nitrogen source. Biochemische Zeitschrift. Berlin, 218:412-444. Apud. Chemical Abstracts. Easton, Pa. 24(12):3034, 1930.

RAMCHANDER, G. e T.S. RAO, 1957. Non-sugars in cane juice.

In: CONVENTION OF THE SUGAR TECHNOLOGISTS' ASSOCIATION OF INDIA, 25^o, Kanpur. Proceedings p. 167-173.

REED, G. e H.J. PEPPLER, 1973. Yeast Technology. Westport, Connecticut, The Avi. 378p.

REINEFELD, E.; M. BLIESENER e J. SCHULZE, 1982. Contribution to the knowledge of behaviour of aminoacids during sugar recovery. 2. Investigations on the effect of process parameters of juice purification. Zuckerindustrie. Magdeburg, 107:1111-1119. Apud. Tate e Lyle's sugar industry abstracts. England, 45(2):41, 1983.

REVA, L.P. e G.A. SIMAKHINA, 1978. Determination of optimal juice alkalinity for predefecation. Sakharnaya Promyshlennost' Moscow, 3:36-40. Apud. La sucrerie belge and sugar industry abstracts. England, 40(7-8):95, 1978.

REVA, L.P.; G.A. SIMAKHINA e V.M. LOGUIN, 1979. Effect of calcium ions on renaturation of protein precipitate. Sakharnaya Promyshlennost' Moscow, 11:20-22, Apud. La sucrerie belge and sugar industry abstracts, England, 42(4):52, 1980.

REVA, L.P.; G.A. SIMAKHINA e V.M. LOGUIN, 1983. Denaturation transformations of proteins during diffusion juice purification with lime. Sakharnaya Promyshlennost'. Moscow, 5:40-43. Apud. Tate e Lyle's sugar industry abstracts. England, 45(6):183, 1983.

- ROBERTS, E.J. e L.F. MARTIN, 1961. Progress in determining organic non-sugars cane juice that affect sugar refining. Proceedings of the Technical Session on Bone Char, 69, 1959. Charlestown, p. 67-88. Apud. Sugar industry abstracts. England, 23(11):219, 1961.
- ROBERTS, J.D. e M.C. CASERIO, 1965. Basic Principles of Organic Chemistry. New York, W.A. Benjamin, 1315p.
- RODINI, M.A.T., 1985. Isolamento, caracterização e identificação de bactérias contaminantes de dornas de fermentação nas destilarias de etanol. Piracicaba, ESALQ/USP, 92 p. (Tese de Mestrado).
- RODRIGUEZ, L.R.O.; J.A.V. HERRARA e E. R. SUAREZ, 1979. Process for inhibiting the deterioration of cane sugar. US 4255 204, A 24 Jan. 79, nº 6120. P 10 Mar. 81, 4p. Apud. Tate e Lyle's sugar industry abstracts. England, 43(4):115, 1981.
- SAIGAL, D. e L. VISWANATHAN, 1980. Effect of clarification of molasses on alcoholic fermentation. In: CONVENTION OF THE SUGAR TECHNOLOGISTS' ASSOCIATION OF INDIA, 449, Kanpur. Proceedings p. 45G-52G.
- SALINAS, J.G., 1946. Influencia del sistema de cultivo de la cana en la clarificabilidad de los guarapos. Memoria de la Asociación de Técnicos Azucareros de Cuba. Habana, 20:269-272.
- SANHUEZA, R.H.V., 1979. Relações entre Xanthomonas albilineans, Erwinia herbicola e Pseudomonas sp. em cana-de-açúcar. Piracicaba, ESALQ/USP, 77p. (Tese de Mestrado).

- SATYNARAYANA, K.V.S., 1952. Clarification of sugarcane juice with particular reference to the elimination of harmful nitrogen. In: CONVENTION OF THE SUGAR TECHNOLOGISTS' ASSOCIATION OF INDIA, 21^o, Kanpur. Proceedings p.27-30.
- SCHULTZ, A.S. e S. POMPER, 1948. Amino acids as nitrogen source for the growth of yeasts. Archives of Biochemistry. New York, 19:184-192.
- SCHULTZ, A.S.; O.K. MEMANUS e S. POMPER, 1949. Amino acids as carbon source for the growth of yeasts. Archives of Biochemistry. New York, 22:412-419.
- SCOTT, W., 1927. Summary of results at the factory of Imperial College of Tropical Agriculture, Crop 1927. The International Sugar Journal. London, 29:577-580.
- SEIP, J.J., 1928. Colloids and their relation to clarification. Sugar News. Manila, 9:81-86.
- SERRA, G.E.; J.P. STUPIELLO e M.A.A. CÉSAR, 1974. Formas de ocorrência do fósforo no caldo de cana-de-açúcar. JORNADA CIENTÍFICA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS E BIOLÓGICAS DE BOTUCATU, 4^a, Anais. Botucatu, S.P. p.42.
- SHARMA, S.C. e N.S. GUPTA, 1970. A study of the chemical composition of cane juice of B.O. 14 variety with age. In: CONVENTION OF THE SUGAR TECHNOLOGISTS' ASSOCIATION OF INDIA, 37^o, Kanpur. Proceedings p.63-79.
- SHARMA, S.C. e P.C. JOHARY, 1984. Aminoacid removal during cane juice clarification. The International Sugar Journal. London, 86:7-11.

- SHARMA, S.C.; P.C. JOHARY e G.S.C. RAO, 1981. Cane juice phosphates and clarification. The International Sugar Journal. London, 83:3-5.
- SHUKLA, J.P. e K.A. PRABHU, 1961. Eletrophoretic studies of proteins in cane juice. Sharkara, Kanpur, 4:112-119. Apud. Sugar industry abstracts. England, 24(7):139, 1962.
- SILVA, H., 1983. Efeitos da adubação do sorgo sacarino (Sorghum bicolor (L.) MOENCH) na qualidade de caldo para multiplicação de leveduras e fermentação alcoólica. Piracicaba, ESALQ/USP, 295p. (Tese de Doutorado).
- SILVA Jr., J.F., 1976. Efeito da aplicação de fontes de fosfato na clarificação do caldo de cana. In: SEMINÁRIO COPERSUCAR DA AGROINDÚSTRIA AÇUCAREIRA, 4º, Águas de Lindóia. Anais. p.339-353.
- SILVA, M.H., 1974. Control de inversión en el jugo del molino. Sugar y Azucar. New York, 69:41-43.
- SKOLA, V., 1923. Liming raw beet juice and separating the precipitate produced previous to carbonating. The International Sugar Journal. London, 25:496.
- SMYTHE, C.V., 1939. The effect of certain tissue extracts of ammonia salts and of certain amides on the rate of fermentation by bakers' yeast. Enzymologia. Holland, 6:9-14.

- SPENCER, G.L. e G.P. MEADE, 1945. Cane Sugar Handbook. 8^a ed. New York, John Wiley. 834p.
- STANEK, V., 1921. A precipitation of amino acids into the sludge during the saturation of the lime with carbon and sulphur dioxides. Listy Cukrovarnické. Prague, 39:257-259, 269-270. Apud. Chemical Abstracts. Easton, Pa., 15(16): 2745, 1921.
- STEVENS, R., 1955. A nitrogen balance carried out in a commercial sugar factory. In: MEETING OF BRITISH WEST INDIES SUGAR TECHNOLOGISTS'. Barbados. Proceedings. p.86-91.
- STUDNICKY, J., 1978. Obtaining proteins from cane juice. ATAC. Cuba, 37:16-21.
- STUPIELLO, J.P. e J. HORII, 1981. Condução da fermentação alcoólica. Saccharum. São Paulo, 17:43-46.
- SULLIVAN, M., 1978. Some aspects of nitrogen in beet. La Sucrerie Belge. Tienen, 97:175-180.
- SUOMALAINEN, H. e E. OURA, 1971. Yeast nutrition and solute uptake. In: ROSE, A.A. e J.S. HARRISON. Ed. The Yeasts. 3^a ed., London, Academic Press, v. 2., p. 3-74.
- SURDIN, Y.; W. SLY; J. SIRE; A.M. BORDES e H.R. SZULMAJSTER, 1965. Propriétés et contrôle génétique du système d'accumulation des acides aminés chez Saccharomyces cerevisiae. Biochimica et Biophysica ACTA. Amsterdam, 107: 546-566.

- TAO-TZE, Y.; H. KUO-MING e Y. WANG-HWA, 1983. The preliminary study of free amino acids in green tops of sugarcane. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS', 189, Cuba. Proceedings. v. 4, p.356-361.
- THORNE, R.S.W., 1949. Nitrogen metabolism of yeast. A consideration of the mode of assimilation of amino acids. The Journal of the Institute of Brewing. London, 55:201-222.
- THORNE, R.S.W., 1933. The ability of certain pure chemical compounds to formation as nitrogen source for yeast. The Journal of the Institute of Brewing. London, 39:608-621.
- TILBURY, R.H., 1968. Biodeterioration of harvested sugar cane. In: WALTER, A.H. e J.J. ELPICK, Ed. Biodeterioration of Materials. London, Elsevier, p. 717-730.
- VAIRO, M.L.R.; R.E. GREGORI e W. BORZANI, 1975. Respostas de um cultivo de Saccharomyces cerevisiae a perturbações por impulso provocadas por adição de sulfato de amônio. Revista Brasileira de Tecnologia. São Paulo, 6:1-6.
- VASATKO, J. e A. DANDAR, 1971. Effect of the sugar content of milk of lime on purification of beet juice. La Sucrierie Belge. Tienen, 90:485-489.
- VEGA, J.R., 1957. La preclarification del guarapo. Memória de la Conferencia Anual de La Asociacion de Tecnicos Azucare-ros de Cuba. Habana, 31:53-68.

- VIGNES, E.C. e R. FROBERVILLE, 1960. Protein extraction from sugar cane juice. Report Mauritius Sugar Industry Research Institute. Reduit, p. 93-97.
- VILLELA, G.G.; M. BACILA e H. TASTALDI, 1973. Técnica e Experimentos de Bioquímica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 552p.
- WALKER, H., 1923. Phosphoric acid in cane juices. Industrial and Engineering Chemistry. Easton, Pa., 15:164-165.
- WICKERHAM, L.J., 1946. A critical evaluation of the nitrogen assimilation tests commonly used in the classification of yeast. Journal of Bacteriology. Baltimore, 52:293-301.
- WIGGINS, L.F., 1969. No-azucares nitrogenados (los aminoácidos e las proteínas). In: HONIG, P., Ed. Principios de Tecnología Azucarera. México, Editorial Continental. v.1, p. 155-172.
- WIGGINS, L.F. e J.H. WILLIAMS, 1951. Constituents of cane juice. 2. Quantitative examination of the aminoacids of cane juice. In: MEETING OF BRITISH WEST INDIES SUGAR TECHNOLOGISTS', Barbados. Proceedings p. 40-49.
- WIGGINS, L.F. e J.H. WILLIAMS, 1955. Amino acid content of West Indies sugar cane. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Easton, Pa., 3:341-345.
- WILLIAMS, R.J.; R.E. EAKIN e E.E. SNELL, 1940. The relationship of inositol, thiamin, biotin, pantothenic acid and vitamin B₆ to the growth of yeasts. The Journal of the American Chemical Society. Easton, Pa., 62:1204-1205.

- WILSON, S.J., 1956. The aminoacids in final molasses and cane juice. In: CONFERENCE OF THE QUEENSLAND SOCIETY OF SUGAR TECHNOLOGISTS', 23º, Brisbane, Proceedings p.65-69.
- YADAV, B.C.; D.S. DAHIYA e P. TAURO, 1982. Studies on fermentation of sugar cane juice for the production of ethanol. In: CONVENTION OF THE SUGAR TECHNOLOGISTS' ASSOCIATION OF INDIA, 46º, Kanpur. Proceedings p.G41-G52.
- YAROVENKO, V.L., 1964. Principles of the continuous alcohol and butanol-acetone fermentation process. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CONTINUOUS CULTIVATION OF MICROORGANISMS, 2º, Prague, 1962. Proceedings, ed. by I. MÁLEK, K. BERAN e J. HOSPODKA. New York, Academic Press, p.205-219.
- ZAGO, E.A., 1982. Efeito da concentração de N, P, Mg, Mn e Zn na multiplicação de leveduras industriais. Piracicaba, ESALQ/USP, 125p. (Tese de Doutorado).
- ZAKHAROV, K.P.; R.G. ZHIZHINA e V.Z. SEMENENKO, 1983. Influence of main defecation on content of nitrogen compounds in thick juice. Sakharnaya Promyshlennost'. Moscow, 10:22-24. Apud. Tate e Lyle's sugar industry abstracts. England, 46(3):81, 1984.
- ZHURA, K.D. e L.V. ZAGAIKEVICH, 1967. Some reasons for decrease of juice pH during evaporation. Sakharnaya Promyshlennost' Moscow, 41:36-37. Apud. Sugar industry abstracts, England, 30(6):90, 1968.

A P Ê N D I C E

Quadro 17 - Efeito do tratamento térmico do caldo na população microbiana - Amostra 1

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Nível
Blocos	2	0,009059	0,004529	1,00ns	44,51
Tratamentos	2	2,050380	1,025190	225,85**	0,01
Resíduo	4	0,018157	0,004539		
Total	8	2,077600			

Dados transformados para $\sqrt{x + 0,5}$

** - Ao nível de 1% ao menos um contraste de médias difere de zero

Coefficiente de variação = 6,44879%

Teste Tukey 5% para tratamentos

DMS = 0,196048

Tratamento 1 = 1,71977 A

Tratamento 2 = 0,70725 B

Tratamento 3 = 0,70725 B

Quadro 18 - Efeito do tratamento térmico do caldo na população microbiana Amostra 2

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Nível
Blocos	2	0,017902	0,008951	1,02ns	43,81
Tratamentos	2	31,370700	15,685300	1790,28**	0,00
Resíduo	4	0,035046	0,008761		
Total	8	31,423600			

Dados transformados para $\sqrt{x + 0,5}$

** - Ao nível de 1% ao menos um contraste de médias difere de zero

Coefficiente de variação = 4,61002%

Teste Tukey 5% para tratamentos

DMS = 0,272369

Tratamento 1 = 4,67073

Tratamento 2 = 0,71157 B

Tratamento 3 = 0,70894 B

Quadro 19 - Efeito do tratamento térmico do caldo na população microbiana - Amostra 3

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Nível
Blocos	2	0,020695	0,010347	0,99ns	44,81
Tratamentos	2	24,938300	12,469100	1190,24**	0,00
Resíduo	4	0,041904	0,010476		
Total	8	25,000900			

Dados transformados para $\sqrt{x + 0,5}$

** - Ao nível de 1% ao menos um contraste de médias difere de zero

Coefficiente de variação = 5,42678%

Teste Tukey 5% para tratamentos

DMS = 0,297831

Tratamento 1 = 4,24018 A

Tratamento 3 = 0,70958 B

Tratamento 2 = 0,70845 B

Quadro 20 - Efeito do tratamento térmico do caldo na população microbiana - Amostra 4

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Nível
Blocos	2	0,018547	0,009274	0,99ns	44,60
Tratamentos	2	141,394000	70,696800	584,51**	0,00
Resíduo	4	0,037285	0,009321		
Total	8	141,449000			

Dados transformados para $\sqrt{x + 0,5}$

** - Ao nível de 1% ao menos um contraste de médias difere de zero

Coefficiente de variação = 2,74816%

Teste de Tukey 5% para tratamentos

DMS = 0,280935

Tratamento 1 = 9,11856 A

Tratamento 2 = 0,71349 B

Tratamento 3 = 0,70734 B

Quadro 21 - Efeito do tratamento térmico do caldo na população microbiana - Amostra 5

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Nível
Blocos	2	0,014465	0,007233	1,28ns	37,08
Tratamentos	2	707,279000	353,639000	62807,90**	0,0
Resíduo	4	0,022522	0,005630		
Total	8	707,316000			

Dados transformados para $\sqrt{x + 0,5}$

** - Ao nível de 1% ao menos um contraste de médias difere de zero

Coefficiente de variação = 1,04965%

Teste Tukey 5% para tratamentos

DMS = 0,218345

Tratamento 1 = 19,68470 A

Tratamento 2 = 1,00668 B

Tratamento 3 = 0,75470 C

Quadro 22 - Efeito do tratamento térmico do caldo na população microbiana - Amostra 6

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Nível
Blocos	2	0,758057	0,379028	0,92ns	46,85
Tratamentos	2	991,933000	495,967000	1206,61	0,00
Resíduo	4	1,644170	0,411041		
Total	8	994,335000			

Dados transformados para $\sqrt{x + 0,5}$

** - Ao nível de 1% ao menos um contraste de médias difere de zero

Coefficiente de variação = 7,77955%

Teste Tukey 5% para tratamentos

DMS = 1,86557

Tratamento 1 = 23,08750 A

Tratamento 2 = 0,92510 B

Tratamento 3 = 0,71087 B

Quadro 23 - Efeito do tratamento térmico do caldo na população microbiana - Amostra 7

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Nível
Blocos	2	0,079826	0,039913	1,00ns	44,34
Tratamentos	2	9,573900	4,786950	120,35**	0,03
Resíduo	4	0,159100	0,039775		
Total	8	9,812820			

Dados transformados para $\sqrt{x + 0,5}$

** - Ao nível de 1% ao menos um contraste de médias difere de zero

Coeficiente de variação = 13,8191%

Teste de Tukey 5% para tratamentos

DMS = 0,580329

Tratamento 1 = 2,90179 A

Tratamento 2 = 0,72035 B

Tratamento 3 = 0,70746 B

Quadro 24 - Efeito da defecação do caldo na população microbiana Amostra 1

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Nível
Blocos	2	0,054024	0,027012	1,00ns	44,45
Tratamentos	2	94,442800	47,221400	1747,56**	0,00
Resíduo	4	0,108086	0,027021		
Total	8	94,604900			

Dados transformados para $\sqrt{x + 0,5}$

** - Ao nível de 1% ao menos um contraste de médias difere de zero

Coeficiente de variação = 5,48283%

Teste Tukey 5% para tratamentos

DMS = 0,478326

Tratamento 1 = 7,57931 A

Tratamento 3 = 0,70760 B

Tratamento 2 = 0,70746 B

Quadro 25 - Efeito da defecação do caldo na população microbiana
Amostra 2

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Nível
Blocos	2	1,823360	0,911682	0,82ns	50,28
Tratamentos	2	302,485000	151,243000	136,13**	0,02
Resíduo	4	4,444030	1,111010		
Total	8	308,753000			

Dados transformados para $\sqrt{x + 0,5}$

** - Ao nível de 1% ao menos um contraste de médias difere de zero

Coeficiente de variação = 12,4244%

Teste Tukey 5% para tratamentos

DMS = 3,0671

Tratamento 1 = 16,13800 A

Tratamento 2 = 7,20040 B

Tratamento 3 = 2,11245 C

Quadro 26 - Efeito da defecação do caldo na população microbiana
Amostra 3

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Nível
Blocos	2	0,016632	0,008316	0,90ns	47,66
Tratamentos	2	424,448000	212,224000	22894,30**	0,00
Resíduo	4	0,037079	0,009270		
Total	8	424,502000			

Dados transformados para $\sqrt{x + 0,5}$

** - Ao nível de 1% ao menos um contraste de médias difere de zero

Coeficiente de variação = 1,71228%

Teste Tukey 5% para tratamentos

DMS = 0,280158

Tratamento 1 = 15,33460 A

Tratamento 2 = 0,82663 B

Tratamento 3 = 0,70741 B

Quadro 27 - Efeito da defecação do caldo na população microbiana
Amostra 4

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Nível
Blocos	2	0,029419	0,014709	0,99ns	44,87
Tratamentos	2	914,600000	457,300000	30643,80**	0,00
Resíduo	4	0,059692	0,014923		
Total	8	914,689000			

Dados transformados para $\sqrt{x + 0,5}$

** - Ao nível de 1% ao menos um contraste de médias difere de zero

Coefficiente de variação = 1,55867%

Teste Tukey 5% para tratamentos

DMS = 0,355467

Tratamento 1 = 22,09380 A

Tratamento 2 = 0,71027 B

Tratamento 3 = 0,70824 B

Quadro 28 - Efeito da defecação do caldo na população microbiana
Amostra 5

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Nível
Blocos	2	0,231689	0,115845	1,00ns	44,44
Tratamentos	2	73,635300	36,817700	317,89**	0,00
Resíduo	4	0,463272	0,115818		
Total	8	74,330300			

Dados transformados para $\sqrt{x + 0,5}$

** - Ao nível de 1% ao menos um contraste de médias difere de zero

Coefficiente de variação = 12,4551%

Teste Tukey 5% para tratamentos

DMS = 0,99028

Tratamento 1 = 6,77754 A

Tratamento 2 = 0,71227 B

Tratamento 3 = 0,70729 B

Quadro 29 - Efeito da defecação do caldo na população microbiana
Amostra 6

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Nível
Blocos	2	1,962710	0,981354	1,00ns	44,44
Tratamentos	2	752,397000	376,199000	383,41**	0,00
Resíduo	4	3,924740	0,981186		
Total	8	758,285000			

Dados transformados para $\sqrt{x + 0,5}$

** - Ao nível de 1% ao menos um contraste de médias difere de zero

Coefficiente de variação = 13,7435%

Teste Tukey 5% para tratamentos

DMS = 2,88234

Tratamento 1 = 20,13800 A

Tratamento 3 = 0,75674 B

Tratamento 2 = 0,72757 B

Quadro 30 - Efeito da defecação do caldo na população microbiana
Amostra 7

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Nível
Blocos	2	0,666687	0,333344	1,00ns	44,44
Tratamentos	2	1007,190000	503,594000	1511,08**	0,00
Resíduo	4	1,333070	0,333267		
Total	8	1009,190000			

Dados transformados para $\sqrt{x + 0,5}$

** - Ao nível de 1% ao menos um contraste de médias difere de zero

Coefficiente de variação = 7,05092%

Teste Tukey 5% para tratamentos

DMS = 1,67983

Tratamento 1 = 23,14810 A

Tratamento 3 = 0,70718 B

Tratamento 2 = 0,70718 B

Quadro 31 - Efeito da defecação do caldo na população microbiana
Amostra 8

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Nível
Blocos	2	0,012604	0,006302	1,07ns	42,40
Tratamentos	2	699,281000	349,640000	59439,80**	0,00
Resíduo	4	0,023529	0,005882		
Total	8	699,317000			

Dados transformados para $\sqrt{x + 0,5}$

** - Ao nível de 1% ao menos um contraste de médias difere de zero

Coefficiente de variação = 1,06189%

Teste Tukey 5% para tratamentos

DMS = 0,223173

Tratamento 1 = 19,68470 A

Tratamento 2 = 1,25340 B

Tratamento 3 = 0,72970 C

Quadro 32 - Efeito da defecação do caldo na população microbiana
Amostra 9

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Nível
Blocos	2	0,799744	0,399872	1,00ns	44,47
Tratamentos	2	1000,610000	500,304000	1250,06**	0,0
Resíduo	4	1,600890	0,400223		
Total	8	1003,010000			

Dados transformados para $\sqrt{x + 0,5}$

** - Ao nível de 1% ao menos um contraste de médias difere de zero

Coefficiente de variação = 7,73779%

Teste Tukey 5% para tratamentos

DMS= 1,84086

Tratamento 1 = 23,08750 A

Tratamento 3 = 0,72970 B

Tratamento 2 = 0,71040 B

Quadro 33 - Efeito da defecação do caldo na população microbiana
Amostra 10

Causa da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	Nível
Blocos	2	0,079636	0,039818	1,00ns	44,45
Tratamentos	2	9,604860	4,802430	120,60**	0,03
Resíduo	4	0,159288	0,039822		
Total	8	9,843780			

Dados transformados para $\sqrt{x + 0,5}$

** - Ao nível de 1% ao menos um contraste de médias difere de zero

Coeficiente da variação = 13,85%

Teste Tukey 5% para tratamentos

DMS = 0,580674

Tratamento 1 = 2,90179 A

Tratamento 2 = 0,71344 B

Tratamento 3 = 0,70725 B