

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**ESTUDO DE METODOLOGIA PARA CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS DA  
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA INDUSTRIAL ATRAVÉS DE TAXONOMIA  
NUMÉRICA E POTENCIAL FERMENTATIVO**

MÍRIAM LARANJEIRA MALTO  
ENGENHEIRA DE ALIMENTOS, UNICAMP, 1992

**Orientadora:** PROFA. DRA. MARIA ISABEL RODRIGUES

**PARECER**

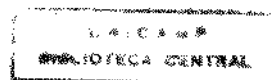
Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por MÍRIAM LARANJEIRA MALTO e aprovada pela Comissão Julgadora em 29 de setembro de 1997.

Campinas, 29 de setembro de 1997.

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> MARIA ISABEL RODRIGUES  
Presidente da Banca

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Campinas  
Setembro - 1997



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	TUNICAMP
	M299 e
V	
PREÇO	81.32.265
	281/9.†
	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	33.811.00
DATA	27/11/9.†
N.º CPD	

CM-00103584-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

M299e Malto, Miriam Laranjeira  
Estudo de metodologia para caracterização de leveduras da  
fermentação alcoólica industrial através de taxonomia  
numérica e potencial fermentativo / Miriam Laranjeira Malto.  
-- Campinas, SP: [s.n.], 1997.

Orientador: Maria Isabel Rodrigues  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de  
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Fermentação. 2.Álcool. 3.Levedos - Contaminação.  
4.Controle. I.Rodrigues, Maria Isabel. II.Universidade  
Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.  
III.Título.

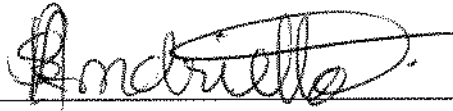
**BANCA EXAMINADORA**



---

Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues

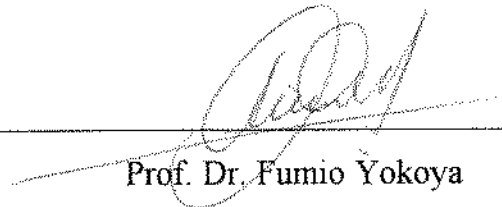
(Orientadora)



---

Prof. Dr. Silvio Roberto Andrietta

(Membro)



---

Prof. Dr. Fumio Yokoya

(Membro)

---

Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana

*A Deus,*

*Aos meus pais, Nilce e Oládio, pelo exemplo,*

*suporte e incentivo nos primeiros passos*

*de minha vida, dedico.*

## *AGRADECIMENTOS*

À Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues, pela amizade, orientação e apoio dedicados a este trabalho, meu eterno agradecimento.

À bióloga Maria da Graça Stupiello pela colaboração dada ao início deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sílvio Andrietta, pelo auxílio prestado a esta tese.

À profa. Dra. Rosa Maria Tosello pela atenção dispensada e colaboração no decorrer desse trabalho.

À Usina Clealco, por ceder as culturas.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

À FAEP pelo apoio financeiro.

À todos os colegas do Laboratório de Bioengenharia do Departamento de Engenharia de Alimentos.

À todos os colegas de pós-graduação do DEA.

Aos funcionários do Departamento de Engenharia de Alimentos pelos serviços prestados.

À banca examinadora pelas correções e sugestões concedidas.

Ao Farley, pelo apoio.

# SUMÁRIO

Nomenclatura.....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
<b>1 - INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>3</b>
2.1 - LEVEDURAS .....	3
2.2 - MICRORGANISMOS CONTAMINANTES NA FERMENTAÇÃO .....	5
2.2.1. - <i>Origem dos contaminantes</i> .....	5
2.2.2 - <i>Formas de combate aos microrganismos contaminantes</i> .....	7
2.2.3 - <i>Leveduras Contaminantes</i> .....	8
2.3 IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS .....	9
2.3.1 - <i>Taxonomia Clássica</i> .....	9
2.3.2. <i>Outros critérios</i> .....	11
2.3.3 - <i>Taxonomia Numérica</i> .....	13
2.3.4. <i>Parâmetros cinéticos e de produção</i> .....	16
<b>3 METODOLOGIA .....</b>	<b>18</b>
3.1 INTRODUÇÃO.....	18
3.2 ISOLAMENTO DE LEVEDURAS .....	19
3.2.1. <i>Amostragem</i> .....	19
3.2.2. <i>Diluição</i> .....	20
3.2.3. <i>Condução ao Isolamento</i> .....	21
3.3 METODOLOGIA DOS TESTES BIOQUÍMICOS .....	23
3.3.1 <i>Introdução</i> .....	23
3.3.2 <i>Meio de cultivo para obtenção do vinho fermentado</i> .....	24
3.3.3 <i>Fermentação</i> .....	26
3.3.4 <i>Determinação da Taxa Específica de Crescimento Máxima (<math>\mu_{max}</math>)</i> .....	28
3.3.5 <i>Determinação dos Açúcares Redutores Totais</i> .....	30
3.3.6 <i>Determinação da Massa Seca Produzida</i> .....	31
3.3.7 <i>Determinação do pH final</i> .....	31
3.3.8 <i>Determinação do Etanol Produzido</i> .....	32
3.3.9 <i>Determinação da Acidez Produzida</i> .....	33
3.3.10 <i>Determinação do Glicerol</i> .....	34
3.3.11 <i>Determinação da Tolerância do Etanol em Leveduras</i> .....	36
3.4 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE PRODUÇÃO ESPECÍFICA PARA OBTENÇÃO DO POTENCIAL FERMENTATIVO .....	38
3.4.1 <i>Introdução</i> .....	38
3.4.2 <i>Determinação da massa de açúcar redutor total (ART) consumido na Fermentação</i> ... 38	
3.4.3 <i>Determinação da massa de etanol produzido na Fermentação (<math>ET_{PROD}</math>)</i> .....	39
3.4.5 <i>Determinação da massa de glicerol produzido na Fermentação (<math>GLI_{PROD}</math>)</i> .....	39
3.4.6 <i>Determinação da massa de ácidos produzidos na Fermentação (<math>AC_{PROD}</math>)</i> .....	40

3.4.7	Determinação da massa de gás carbônico produzido na Fermentação ( $CO_{2PROD}$ )	41
3.4.8	Cálculo para determinação das produções específicas	42
3.4.9	Cálculo dos Fatores de Produto	42
3.4.10	Cálculo do Potencial Fermentativo (PF)	44
3.5	METODOLOGIA PARA OS TESTES DE TAXONOMIA NUMÉRICA PARA LEVEDURAS	45
3.5.1	Introdução	45
3.5.2	Condução dos testes	46
3.5.3	Preparo dos açúcares para assimilação e fermentação	46
3.5.4	Assimilação de Nitrato de Potássio ( $KNO_3$ )	48
3.5.5	Crescimento a alta concentração osmótica	49
3.5.6	Crescimento em glicose 50%	50
3.5.7	Hidrólise do Amido	50
3.5.8	Crescimento a 37° C	51
3.5.9	Forma celular	52
3.6	ESTUDO COMPARATIVO DOS POTENCIAIS FERMENTATIVOS DA CEPA PADRÃO UTILIZANDO DIFERENTES MARCAS COMERCIAIS DE EXTRATO DE LEVEDURA NA COMPOSIÇÃO DO MEIO	53
3.7	AValiação da metodologia proposta	55
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>56</b>
4.1	RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE ESPECÍFICA MÁXIMA ( $U_{MAX}$ )	56
4.2	AValiação do parâmetro de tolerância ao Etanol	57
4.3	RESULTADOS DAS PRODUÇÕES ESPECÍFICAS E DO POTENCIAL FERMENTATIVO	58
4.4	RESULTADOS DA TAXONOMIA NUMÉRICA	62
4.5	RESULTADOS DOS POTENCIAIS FERMENTATIVOS DA CEPA PADRÃO QUANDO SÃO UTILIZADAS DIFERENTES MARCAS COMERCIAIS DE EXTRATO DE LEVEDURA	64
4.6	AValiação da metodologia proposta	66
4.7	RESUMO FINAL DOS RESULTADOS OBTIDOS	67
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>70</b>
 <b>APÊNDICES</b>		
APÊNDICE A - RESULTADOS DAS CURVAS DE CRESCIMENTO E DAS RETAS PARA DETERMINAÇÃO DE $U_{MAX}$ PARA AS 13 CEPAS ANALISADAS, A PADRÃO, E <i>C. TROPICALIS</i> E <i>S. BAYANUS</i>		
		76
APÊNDICE B - TABELAS DOS RESULTADOS DOS TESTES DA FERMENTAÇÃO DAS 13 CEPAS ANALISADAS E PADRÃO		
		92
APÊNDICE C - TABELAS DOS RESULTADOS DOS TESTES DA FERMENTAÇÃO E DETERMINAÇÃO DAS PRODUÇÕES ESPECÍFICAS E DO POTENCIAL FERMENTATIVO DAS 13 CEPAS ANALISADAS E PADRÃO		
		103
APÊNDICE D - TABELAS DOS RESULTADOS DOS TESTES DE TAXONOMIA NUMÉRICA DAS CEPAS ANALISADAS E PADRÃO		
		117

APÊNDICE E - TABELAS DOS RESULTADOS DOS TESTES DA FERMENTAÇÃO E DETERMINAÇÃO DAS  
PRODUÇÕES ESPECÍFICAS E DO POTENCIAL FERMENTATIVO DA CEPA PADRÃO CRESCIDA EM MEIOS COM  
EXTRATO DE LEVEDURA DIFCO, BIOBRÁS E OXOID .....131

APÊNDICE F - TABELAS DOS RESULTADOS DOS TESTES DA FERMENTAÇÃO E DETERMINAÇÃO DAS  
PRODUÇÕES ESPECÍFICAS E DO POTENCIAL FERMENTATIVO DE DUAS CEPAS ATÍPICAS AO PROCESSO.....134



## Nomenclatura

Símbolo	Significado	Unidade
ART	açúcar redutor total	g/l
ARTres	açúcar redutor total residual	g/l
$C_0$	valor da constante de difusão na concentração zero de etanol	Mol/l
$g$	tempo de geração	h
$[H^+]_f$	concentração de prótons no pH final	Mol/l
$k$	constante exponencial de difusão de prótons	$M^{-1}$
$k_p$	taxa de liberação ativa de prótons	$M^{-1}$
$n$	número de gerações	
$t$	tempo de crescimento ou fermentação	h
$X$	concentração de células no tempo $t$	g/l
$X_0$	concentração inicial de células (tempo = 0)	g/l

## Letras gregas

$\mu$	velocidade específica de crescimento do microrganismo	$h^{-1}$
$\mu_{max}$	velocidade específica máxima de crescimento do microrganismo	$h^{-1}$

## RESUMO

A indústria alcooleira, no sentido de buscar maior produtividade e rendimento com redução de custos, vem estudando as formas de controlar e otimizar o processo de fermentação alcoólica.

Um dos problemas-chave é a importância do controle microbiológico na fermentação alcoólica, detectando microrganismos prejudiciais ao bom rendimento da fermentação, principalmente em relação às leveduras "selvagens". Qualquer atitude drástica para eliminar essas leveduras, acarretará prejuízos para a levedura de processo. Diferenciando-se da contaminação bacteriana que pode ser controlada por antibióticos específicos que não afetam a levedura.

Esse trabalho consistiu no acompanhamento do potencial fermentativo e identificação das leveduras isoladas mensalmente durante o período da safra da indústria alcooleira Clealco. Todas as leveduras presentes numa concentração  $10^6$  ou superior foram isoladas para a realização dos testes. Isto porque, a partir desta concentração as leveduras boas produtoras de etanol ou não, podem dominar o processo rapidamente.

Para as análises, a metodologia escolhida foi aquela compatível com a realidade de um laboratório de controle microbiológico de uma usina alcooleira, ou seja, técnicas simples sem necessidade de instrumentos complexos, contudo não afetando a qualidade do diagnóstico final.

Foram empregados os testes de Taxonomia Numérica para a identificação de leveduras, proposto por GRIFFITS (1981), que compara as características da cepa a ser identificada com características de outras já anteriormente identificadas por Taxonomia Clássica.

Paralelamente, analisou-se os parâmetros cinéticos e o Potencial Fermentativo de cada levedura isolada durante o período de safra. A correlação destes parâmetros com os resultados de Taxonomia Numérica forneceu informações rápidas e seguras das condições de fermentação. Essa metodologia permite a tomada de decisões antes da perda do controle da fermentação, como ocorre atualmente quando não há um acompanhamento durante o processo.

## ABSTRACT

The ethanol fermentation industries have studied alternative way to control and optimise the alcoholic fermentation process.

One of the key problems is the importance of the microbiological control in the alcoholic fermentation by detecting the microorganisms that damage for the good alcoholic performance of the fermentation, mainly in relation to wild yeasts. Any drastic act for eliminating these yeasts, shall result in damage for the process yeast. By different of the bacterian contamination, that can be controlled by specific antibiotics, which does not affect the yeast.

The purpose this work is to evaluate the Fermentation Potential and identification of the yeasts isolated of the processing period from the ethanol fermentation industry Clealco. Each yeast strain encountered in the concentration  $10^6$  or higher was isolated to carry out the tests. This procedure carried out because good or bad ethanol producer yeasts with higher concentration can dominate the process fast.

For the analysis, the selected methodology was that compatible with the reality of a microbiological control laboratory of an alcoholic factory, i.e., a factory that uses simple approaches without the necessity to use complex instruments, moreover not affecting the quality of the final diagnostic.

It was employed the Numerical Taxonomy tests for yeasts identification, proposed by GRIFFITHS (1981), which compare the characteristics of the yeast unknown with the others already identified.

Moreover, the kinetics parameters and the Fermentation Potential of each yeast isolated during the harvest were analyzed. The correlation these parameters with the results of the Numerical Taxonomy supplied fast and safety information about the fermentation conditions. This methodology permits to make decisions before the fermentation control fail, as occur when there is not a supervision during the process.

## 1 - INTRODUÇÃO:

Com a crise do petróleo em 1975, e com o desenvolvimento do automóvel movido à álcool, o governo brasileiro decidiu investir na produção em larga escala de um combustível alternativo. Surgiu, então, o Proálcool - Programa Nacional do Álcool, que inicialmente apoiou-se em destilarias anexas às usinas de açúcar e mais tarde em destilarias autônomas que foram implantadas em todo o território nacional.

A produção de álcool, que na época abrangia em torno de 500 milhões de litros, passou, em apenas 2 safras, para 1 bilhão de litros. Na safra de 1992 foi registrado uma produção de 12,5 bilhões de litros de álcool (BERTELLI, 1992).

Atualmente, com a estabilização do preço do petróleo, reduziu-se o investimento no setor alcooleiro. Se durante a crise de 1975, o Proálcool tinha como prioridade o aumento da capacidade produtiva, hoje está voltado à busca de uma maior produtividade com menores custos para assim alcançar competitividade frente à gasolina.

Colocou-se em prática um amplo programa de pesquisas que abrange, desde o desenvolvimento de variedades de cana-de-açúcar mais resistentes à pragas e doenças, mantendo os teores elevados de sacarose, até a modernização dos equipamentos e substituição do processo batelada alimentada (Melle-Boinot) ao de fermentação contínua.

Além desses estudos, outros pesquisadores têm procurado buscar garantia de produtividade através de estudos do conhecimento da flora microbiana na linha de processo e nas dornas de fermentação onde se verifica que caldos deteriorados e contaminantes nas dornas e no fermento ocasionam queda do rendimento em produto final. Meios de conter ou inibir contaminantes bacterianos em fermentações alcoólicas utilizando bactericidas foram estudados por AQUARONE *et alli* (1968), YOKOYA (1991), entre outros. Antibióticos agindo sozinhos ou associados com outros são eficientes para reduzir a carga bacteriana no caldo e mosto. Porém sendo as leveduras organismos fisiologicamente diferentes das

bactérias, esses agentes biocidas e tratamento ácido dado ao pé-de-cuba são aplicações ineficazes quando se quer conter uma proliferação por leveduras contaminantes. Agentes biocidas que poderiam ser aplicados para inibição das leveduras contaminantes danificariam também as de processo.

De acordo com TAVARES (1992), quando leveduras contaminantes atingem proporções elevadas e, não se dispõe de métodos seletivos de contenção, resta conviver com o problema ao longo da fermentação, com provável queda no rendimento, ou em situação extrema, trocar o fermento.

Tendo em vista as dificuldades do controle de contaminações por leveduras, o objetivo desse trabalho é propor uma metodologia que possa ser implementada como rotina nas usinas produtoras de álcool para identificar quantitativamente e qualitativamente as leveduras existentes durante o processo fermentativo no decorrer de uma safra. Os métodos para determinação dos parâmetros cinéticos e de produção e para a Taxonomia Numérica foram escolhidos por serem confiáveis, exigirem menor tempo de realização e serem menos subjetivos, para um analista não especialista em taxonomia, quando comparados ao da Taxonomia Clássica. Além disso, através da metodologia proposta é possível obter informações quanto à qualidade da fermentação alcoólica durante toda a safra de produção.

## **2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:**

### **2.1 - Leveduras**

Leveduras são definidas como microrganismos eucarióticos de forma unicelular, pertencentes aos fungos. Se reproduzem em sua grande maioria por gemação (ou brotamento), e alguns gêneros formam células irmãs por um processo que é intermediário entre brotamento e fissão. (LODDER, 1970).

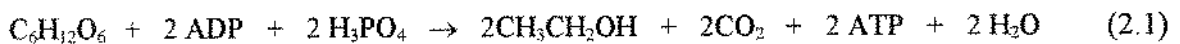
São, em geral, anaeróbicas facultativas:

- crescem na presença de oxigênio tão bem quanto na completa ausência;
- preferem o oxigênio porque maior quantidade de energia química na forma da molécula ATP (Adenosina Trifosfato) se produz durante a oxidação aeróbica da glicose, que é transformada a piruvato em uma seqüência de reações catalisadas por enzimas (Via Glicolítica), o qual é oxidado pela enzima piruvato-desidrogenase sendo produzido o acetil-CoA, que segue para a cadeia do ácido triciclocoarboxílico ou Ciclo de Krebs, onde será completamente oxidado a gás carbônico e água. Os elétrons removidos dos substratos, à medida que estes se oxidam, são finalmente transferidos para o oxigênio molecular, e portanto o processo é aeróbico (CONN e STUMPF, 1980). O rendimento final é 36 mol ATP por mol de glicose. A respiração aeróbica da glicose inibe a fermentação desse açúcar.

As leveduras, quando em condições de anaerobiose, realizam o processo de fermentação para a obtenção de energia química necessária para manutenção, crescimento e multiplicação. A energia química, armazenada na forma de ATP, é fabricada na própria levedura utilizando-se a energia química embutida nas moléculas de carboidratos (açúcares) principalmente.

O processo de fermentação consiste na degradação de açúcares (glicose, sacarose, lactose, frutose, entre outros) mediante uma seqüência de uma dezena de reações químicas de ocorrência no interior da célula. Assim, o açúcar é fragmentado resultando em gás carbônico e etanol principalmente, sem utilidade para a levedura, sendo excretados para o meio exterior.

Este processo é idêntico à Via Glicolítica, comum em quase todos os organismos, exceto por duas reações no final da seqüência glicolítica: a descarboxilação do piruvato (produto final da via glicolítica) a acetaldeído e gás carbônico, e a redução do acetaldeído a etanol (CONN e STUMPF, 1980). O rendimento final é de 2 mol ATP por mol de glicose, e a seqüência pode ser resumida pela seguinte equação:



Como ocorre crescimento mesmo durante a fermentação, parte do açúcar consumido acaba sendo desviada para a produção de células, bem como para a formação dos chamados produtos secundários da fermentação: glicerol, ácidos orgânicos, álcoois superiores, entre outros (AMORIM *et alli*, 1989).

O glicerol é o único poliálcool produzido pela *Saccharomyces cerevisiae*, é produzido no início da fermentação, quando a atividade de descarboxilase pirúvica ainda é baixa, sendo o piruvato e o glicerol nesta etapa formados em quantidades maiores que o próprio etanol. Entre os ácidos orgânicos produzidos, o ácido succínico é quantitativamente o principal e o ácido acético o principal volátil. Seus teores finais dependem de vários fatores como linhagens de leveduras, composição do meio e condições ambientais, sendo que a maior parte é rapidamente formada no início da fermentação (WHITING, 1976).

Como o etanol é o principal produto formado e o que contém um maior interesse industrial, todo o empenho deve ser direcionado no sentido de favorecer a síntese e excreção do mesmo.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a mais utilizada na fermentação alcoólica para a produção de vinhos, cervejas, álcool etílico; por ser mais tolerante às condições adversas do ambiente com rendimento teórico de 0,511 g de álcool/ g de glicose.

## 2.2 - Microrganismos Contaminantes na Fermentação

### 2.2.1. - Origem dos contaminantes

O crescimento de microrganismos estranhos ao processo durante a fermentação é considerado um fator preocupante pois quando ocorre pode haver uma diminuição no rendimento alcoólico final.

O problema com contaminantes poderia ser nulo trabalhando-se sob condições estéreis, porém devido à grande magnitude de produção se torna inviável economicamente. O custo energético para a esterilização influenciaria negativamente no custo final do produto (RODRIGUES & ANDRIETTA, 1995).

Sabe-se que os microrganismos estão presentes em qualquer lugar não estéril. Portanto, a matéria-prima, a cana-de-açúcar, ao chegar na indústria já traz consigo contaminantes que são habitantes naturais da própria planta, do solo, da matéria orgânica em decomposição e microrganismos associados às pragas e moléstias da planta. O número de microrganismos presente na planta varia bastante, encontrando-se entre  $10^4$  a  $10^8$  bactérias e  $10^3$  a  $10^4$  fungos por grama de colmo. LIMA *et alli* (1974) estudaram a contagem de leveduras em usina de açúcar, verificando que o caldo da cana e caldo misto apresentaram contagem média de  $10^4$  UFC/ml, fato este explicável quando se leva em conta a contaminação que costuma acompanhar a cana no campo. Entre as espécies encontradas destacam-se as bactérias Gram-negativas do gênero *Pseudomonas*, *Enterobacter* e *Klebsiella*; as bactérias filamentosas dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Micrococcus*; as bactérias gram-positivas dos gêneros *Streptomyces* e *Actinomyces*; e as leveduras e bolores como *Saccharomyces*, *Torula*, *Pichia*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Cladosporium* (YOKOYA, 1991).

CLARKE *et alli* (1980), verificaram que a cana que sofre corte na colheita, ou danificada durante a queimada, ou até mesmo a cana congelada, são particularmente mais susceptíveis ao crescimento de bactérias e leveduras. Esses organismos, mais notáveis são as espécies de *Saccharomyces* e *Clostridium thermosaccharolyticum*, porque são encontrados



em produtos finais no processo do açúcar. Além de consumir a sacarose do caldo, esses organismos podem criar problemas no processamento.

BRUIJN (1966) estudou a influência do tempo de estocagem da cana no grau de acidez desta, verificando que quanto maior o tempo, maior a acidez devido à deterioração microbiana.

A cana-de-açúcar é um ótimo substrato para o crescimento de microrganismos devido aos teores de nutrientes orgânicos e inorgânicos, pH e temperatura favoráveis, necessitando portanto uma etapa de lavagem antes da moagem com o propósito de diminuir os resíduos do solo e conseqüentemente a carga de microrganismos (SILVA, 1974). Apesar da assepsia nos equipamentos como moendas, caixas, peneiras, tubulações, ocorre sempre a existência de focos de crescimento de microrganismos (BOLETIM TÉCNICO COPERSUCAR, 1983).

Após a extração, o caldo de cana sofre a calagem ou sulfitação seguido de um tratamento térmico, que permite uma redução substancial no número de microrganismos, porém não total. O caldo tratado apresenta contagem sempre inferior a  $5 \times 10^6$  microrganismos/ml (BOLETIM TÉCNICO COPERSUCAR, 1983).

AMORIM & OLIVEIRA (1982), sugerem a aplicação de biocidas à base de amônia quaternária, organosulfurados, ou ainda formol, no setor de extração.

Entre os diversos microrganismos existentes no caldo tratado e no melaço que compõem o mosto, algumas espécies crescem e se proliferam, outras são mortas nas dornas, e finalmente algumas permanecem em estado latente durante o processo de fermentação. O comportamento de cada uma dessas espécies vai depender da adaptabilidade desses microrganismos às condições ambientais do sistema, como temperatura, pH, aeração, e concentração de açúcar, ácidos e álcool; e da competitividade frente a outros microrganismos presentes (YOKOYA, 1991).

Ao mosto que alimenta os reatores, no processo batelada alimentada de Melle-Boinot, utilizado na maioria das usinas alcooleiras, se acrescenta um inóculo de leveduras proveniente do ciclo anterior. O mosto fermentado passa às separadoras centrífugas que

separa a fase leve (vinho), rica em etanol, da fase pesada (leite), rica em leveduras, no qual se adiciona água e ácido sulfúrico e retorna ao ciclo. Esse tratamento com ácido ajusta o pH a 2,5-2,0 funcionando como uma prática auxiliar útil no combate à infecção bacteriana, provocando uma redução na viabilidade das leveduras do processo, que é perfeitamente recuperada ao longo de poucos ciclos fermentativos, sem maiores problemas (GALLO & CANHOS, 1991).

### 2.2.2. Formas de combate aos microrganismos contaminantes

Desinfetantes como agentes bactericidas já vêm sendo utilizado há décadas em mostos de indústrias alcooleiras: segundo os estudos de levantamento de AQUARONE *et alli* (1968), a penicilina é o antibiótico mais largamente utilizado nas usinas devido ao baixo custo financeiro.

Dentre as substâncias empregadas nas fermentações do melão, com a função de desinfetantes do tipo químico, podemos citar os seguintes: ácido sulfúrico, policlorofenóis (pentaclorofenol, hexaclorofeno), e do tipo antibiótico: a penicilina, o cloranfenicol e tetraciclina; entre outros (SATO *et alli*, 1980, RODINI, 1989).

ALTHERNUM *et alli* (1984) isolaram as bactérias mais comumente encontradas em microdestilarias de álcool, que passaram por um tratamento com penicilina V-ácida, sendo que os cocos gram-positivos foram eficazmente controlados.

Com o intuito de se obter um fermento especial mais resistente a antifúngicos, e mantendo suas características genéticas, TAVARES (1992), desenvolveu, através de clonagem molecular, linhagens híbridas de *Saccharomyces cerevisiae*, mais resistentes a nistatina, que é um antifúngico de largo espectro.

Como as bactérias são morfologicamente e fisiologicamente distintas das leveduras, os desinfetantes usados para bactérias não prejudicam as leveduras do processo, tornando mais fácil combatê-las. Porém são ineficazes para leveduras contaminantes.

### 2.2.3 Leveduras Contaminantes

A contaminação por leveduras nas dornas de fermentação tem merecido cuidadosa atenção em usinas e vêm se pesquisando seus efeitos no processo e as formas de eliminar a sua interferência.

Leveduras contaminantes ou “selvagens” podem ser definidas como organismos que produzem mudanças indesejáveis em alimentos ou processos fermentativos. São responsáveis pela variação do rendimento em vinícolas e cervejarias, devido às suas propriedades bioquímicas que causam problemas no sabor, cor e turbidez do produto final (PHAFF *et alli*, 1966).

Em usinas alcooleiras, segundo TAVARES (1992), essas leveduras, quando atingem proporções elevadas, ocasionam problemas operacionais como a decantação do fermento original, com entupimento de boquilhas de centrifugas e maior formação de espumas, comprometendo a produção.

Verifica-se que a contaminação produzida por *Pichia* ou *Cândida* ocorre formação de uma película superficial no produto fermentado, e alterações no sabor e aroma são conseqüências da produção de ácidos, que podem ser causadas por *Brettanomyces* (GALLO, 1990).

AMORIM *et alli* (1989) detectaram que a diminuição do rendimento fermentativo presente em duas usinas alcooleiras era devido a proliferação da levedura *Candida krusei*. Foi constatado que a levedura era proveniente da cana-de-açúcar. Essas duas usinas tiveram problemas com o fornecimento da matéria-prima sendo que por uma semana se trabalhou com cana velha.

Algumas leveduras apresentam o fenômeno da floculação, o qual é definido como a habilidade das células de se agregarem espontaneamente e formar flocos que sedimentam rapidamente no meio de cultura. A característica de agregação de algumas linhagens de *S. cerevisiae* é determinada por fatores genéticos, com evidência de que o DNA mitocondrial tem influência na expressão de floculação (SOARES *et alli*, 1991).

Esses mesmos autores citam que não há consenso de opinião a respeito dos mecanismos que envolvem a floculação. Muitos mecanismos foram propostos: uma ponte de cálcio entre grupos aniônicos na superfície de adjacência das células; uma teoria que envolve uma específica proteína, ligada a  $\alpha$ -manano na superfície das células, e usando  $\text{Ca}^{2+}$  para assegurar a correta configuração da proteína. Fatores ambientais também influenciam a habilidade de floculação. A concentração de glicose alta e a baixa aeração são fatores que auxiliam o fenômeno da floculação.

GUINARD & LEWIS (1993), apontam que a floculação na fermentação tem importantes conseqüências econômicas porque prejudica a adequada mistura no mosto e reduz a capacidade de fermentação das células.

Em uma usina, pode acontecer uma diminuição no rendimento do produto durante o processo, sem se saber o motivo. A detecção de leveduras ao longo do processo e a sua caracterização fermentativa será importante neste caso, pois fornecerá subsídios para verificar se a diminuição do rendimento é devido à contaminação ou à falhas de operação, ou má qualidade da matéria-prima (RODRIGUES & ANDRIETTA, 1995).

Pode ocorrer ainda que no período final de uma safra ao se isolar a levedura do processo verifica-se que esta é diferente daquela introduzida no início. No entanto, se ela tiver uma boa capacidade fermentativa, sendo assim benéfica ao processo, ela será considerada a mais adequada ao processo para a próxima safra. Nesse caso, analisa-se os seus aspectos bioquímicos e microbiológicos e verifica-se as suas peculiaridades que permitiram seu domínio sobre outras populações (RODRIGUES & ANDRIETTA, 1995).

## **2.3 Identificação de leveduras**

### **2.3.1 - Taxonomia Clássica**

Durante o início do século XX, houve um crescente conhecimento da enorme capacidade dos microrganismos em realizar transformações químicas. Foi-se compreendendo que o uso de microrganismos para a produção industrial era dependente da habilidade destes para produzir transformações químicas. Daí, foi reconhecida a necessidade de uma

informação mais descritiva para caracterizar e diferenciar os microrganismos. (PELCZAR *et alli*, 1980).

Com o conhecimento de que existem milhares de espécies de microrganismos no mundo, os cientistas reconheceram então a necessidade de organizar essa quantidade e variedade de organismos. Assim, tentaram colocá-los em grupos baseados em suas similaridades. Nasceu então a ciência da Taxonomia, que inclui a classificação (arranjo), nomenclatura (nome) e identificação (descrição e caracterização dos organismos vivos). Os taxonomistas agrupam os organismos que compartilham certas características comuns em grupos denominados taxa (singular: táxon). O táxon básico é a espécie, que é uma coleção de cepas com características similares. Uma cepa é constituída de descendentes de uma única colônia em uma cultura pura. Espécies intimamente relacionadas são agrupadas em gêneros, os gêneros em famílias. Para a classificação nominal das espécies, desenvolveu-se o sistema binomial, onde o nome de uma espécie é sempre dado como a combinação latina de duas partes consistindo no nome do gênero e no nome específico que denota a espécie. Essa nomenclatura era baseada somente na aplicação de nomes para unidades bacteriais. Para tornar-se o nome mais descritivo, alguns pesquisadores nomeavam o microrganismo com o nome da doença que o hospedeiro sofria. (PELCZAR *et alli*, 1996).

Para identificar taxonomicamente um organismo existe a necessidade do conhecimento das suas características que diferem de uma espécie de outra. A diferenciação de leveduras era feita, no final do século passado, através da visualização de colônias de leveduras crescidas em placas de gel, “as colônias gigantes”, então classificadas de acordo com sua morfologia. Com o tempo, foi se acrescentando a diferenciação pela determinação dos níveis de floculação das leveduras após suspensão em ácido acético (QUAIN, 1986).

HANSEN, em 1888, diferenciou as culturas de leveduras com base na morfologia celular e ascoporal e introduziu as seguintes características: crescimento em meio líquido, temperatura ótima de crescimento e habilidade em fermentar determinados açúcares ( citado por VAN DER WALT, 1987).

Com o passar dos anos, os taxonomistas estenderam a lista de Hansen incluindo outras características tais como: a presença ou ausência de estágios sexuais, a formação de pigmentos, a utilização de 40 fontes de carbono, tolerância a alta concentração de glicose,

liquefação da gelatina, crescimento a várias temperaturas, resistência a cicloheximida, estrutura da coenzima Q no sistema de transporte de elétrons. A lista completa destas características se encontra em "Yeasts: Characteristics and Identification" de BARNETT *et alii* (1983).

Atualmente a metodologia desenvolvida para a identificação e classificação taxonômica das leveduras depende não só dos testes fisiológicos (utilização de carboidratos, utilização de compostos nitrogenados, crescimento em meio isento de vitaminas, utilização de ácidos, produção de compostos amiláceos extracelulares, hidrólise da uréia, degradação da gordura, produção de éster, resistência a actidione, entre outros) como da determinação de características morfológicas, sexuais e de cultura.

Para as leveduras a realização dos testes morfológicos (formação de pseudomicélio e micélio verdadeiro, reprodução vegetativa, formação de endosporos, balistopóros), sexuais (presença ou ausência da formação de ascospóros) e de cultura (crescimento em meio sólido e líquido) são fundamentais para a classificação ao nível de gênero e espécie. Estes testes envolvem muita observação microscópica resultando em uma certa subjetividade na análise. Assim, a experiência do profissional é de fundamental importância na identificação de leveduras.

Devido ao grande número de testes para a determinação e classificação de uma levedura utilizando os métodos bioquímicos e morfológicos, necessita-se alguns meses de trabalho para a realização desses testes, mesmo para uma equipe treinada.

### 2.3.2. Outros critérios

Além dos critérios bioquímicos e morfológicos, que identificam apenas uma parte do genoma da levedura, existem outros que foram introduzidos para a classificação das leveduras, empregando uma tecnologia mais avançada. Estes dizem respeito à composição química da parede celular, composição percentual das bases de DNA (ácido desoxirribonucleico) e dos componentes extracelulares.

Sabendo que os componentes da parede celular das leveduras variam em algumas espécies, GORIN & SPENCER (1970) isolaram o polissacarídeo manano da parede celular de leveduras, a partir de ressonância magnética de prótons, diferenciando alguns gêneros de leveduras a partir do espectro obtido, concluindo que as diferenças dos componentes da parede celular podem ser usados como auxílio no critério de identificação.

O conhecimento da composição das bases de DNA vem a ser utilizado como critério de identificação, sendo ela uma característica constante de uma determinada espécie e é expressa como a percentagem de moles de guanina e citosina (G + C) sobre o total de moles das bases (PELCZAR *et alli*, 1980):

$$\frac{G + C}{Adenina + Timina + G + C} * 100 = \% (G + C) \quad (2.2)$$

O termo DNA “fingerprinting” é usado para descrever qualquer método de análise de DNA (ácido desoxirribonucleico) que diferencia duas ou mais espécies. Mais comumente, a análise é feita isolando-se o DNA com enzimas degradantes de parede celular, que é então reduzido a fragmentos por enzimas endonucleases, separados eletroforicamente e identificados por fluorescência. (MEADEN, 1990).

TAVARES *et alli* (1992), distinguiu linhagens de leveduras utilizadas na fermentação alcoólica através de análises de DNA e eletroforese de proteínas, concluindo que os dois métodos complementam as técnicas convencionais que apenas permitem a distinção de espécies diferentes, abrindo a possibilidade de se distinguir variações de linhagens de mesma espécie no próprio fermento ou aquelas devido à contaminação, mesmo devidas a leveduras com morfologia similar.

TREDOUX *et alli* (1987), propuseram técnicas de identificação rápida para diferenciar *S. cerevisiae* de outras espécies na indústria vinícola através de extração de ácidos graxos e posterior análise em cromatografia gás-líquido.

THORTON & BUNKER (1988), propuseram uma metodologia para separar linhagens de *S. cerevisiae* que apresentam propriedades genéticas indesejáveis à produção de

vinho, tais como produção de H<sub>2</sub>S, floculação, resistência ao cobre, produção de fenóis. Na indústria alcooleira, essa metodologia vem a ser útil para a propriedade de floculação.

SHEEHAN *et alli* (1991), para examinar a estabilidade e pureza de linhagens de leveduras em indústria cervejeira, e identificá-las utilizou análise de cromossomos através do método de eletroforese com gel de alta resolução.

DEGRÉ *et alli* (1989), propuseram uma série de métodos (fator Killer, perfil de ácidos graxos, DNA-"fingerprinting", métodos bioquímicos) que acoplados seriam úteis para identificar linhagens comerciais pertencentes ao grupo de *S. cerevisiae* da indústria vinícola, as quais não são distinguíveis pelos métodos bioquímicos clássicos.

VAN VUUREN & VAN DER MEER (1987), através da técnica de eletroforese de proteínas identificaram 27 linhagens de *Saccharomyces* da indústria de vinho e cerveja, confirmando que *Saccharomyces bayanus*, *S. ovarum*, e *S. carlsbergensis* são sinônimos de *Saccharomyces cerevisiae*. Esses mesmos autores em 1988, utilizam essa mesma técnica com análise numérica das bandas de proteínas obtidas para agrupar e distinguir 33 leveduras isoladas da indústria cervejeira.

Reconhece-se que existem grande variedade de métodos para a detecção de microrganismos embora poucos sejam utilizados na aplicação prática. Cada novo método tem a sua limitação e alguns propostos são inviáveis em laboratórios onde não se dispõem de equipamentos sofisticados.

Devido à complexidade o seu uso é inviável atualmente em laboratórios comuns de usinas alcooleiras brasileiras.

### 2.3.3 - Taxonomia Numérica

A identificação de um organismo desconhecido se faz comparando as suas características bioquímicas e fisiológicas com àquelas de um organismo cujas características já são conhecidas e que já foi classificado taxonomicamente.



No início da Taxonomia Clássica, de acordo com COWAN (1965), quando havia poucas características a serem analisadas, a comparação era simples, mas com o desenvolvimento de novas técnicas e testes, o número de características aumentou e a comparação se tornou complexa e dificultosa. O sistema hierárquico de classificação utilizado então, baseado nominalmente na suposição que seres vivos podem ser arranjados de uma forma que indica parentesco filogenético, começou a ser questionado. Com a descoberta de novas características verificou-se que alguns organismos classificados com diferentes nomes eram pertencentes a uma mesma espécie (sinônimos), e menos freqüente, o mesmo nome foi dado a diferentes espécies (homônimos). Devido às limitações do sistema de classificação nominal, baseado em binômios em latim, procurou-se uma taxonomia mais informativa e classificativa.

Reconheceu-se que os nomes poderiam ser substituídos e fez-se muitos experimentos para expressar as características dos organismos em códigos numéricos ou em tabelas de características.

Para GRIFFITHS (1981), um sistema de códigos numéricos devidamente elaborado satisfaz as principais necessidades de qualquer sistema de nomenclatura para as espécies, as quais são: unicidade, estabilidade e universalidade. A unicidade de uma nomenclatura é mais garantida quando se atribui números às espécies no lugar de nomes binomiais em latim, onde já se verificou casos de homônimos. A estabilidade de uma nomenclatura por códigos numéricos pode ser alcançada se ela não segue as mesmas normas da taxonomia hierárquica, onde se atribui determinadas características como mais significativas e relevantes, conferindo a essas um peso maior na hora da construção das chaves dicotômicas de classificação, e se o código numérico representa as características dos organismos. Além disso, é inquestionável a universalidade dos números.

Outro estudo de uma classificação por códigos foi registrar as características dos organismos e facilitar a comparação entre as semelhanças e diferenças. Com o desenvolvimento dos computadores, SNEATH & SOKAL, ao redor de 1960, citado por GOODFELLOW *et alli* (1985), propuseram um método numérico baseado nas características da Taxonomia Clássica, e atribuindo o mesmo peso para todas as características, permitindo que grande quantidade de informações relacionadas com as características dos organismos fossem analisadas mais objetivamente que sem o uso de

computadores. Esses autores analisaram a classificação dos organismos baseando-se em muitas características, uma vez que a similaridade entre duas espécies pode ser irreal quando se utilizam poucos caracteres.

Um método matemático para a análise da similaridade de espécies, segundo PRIEST & BARBOUR (1985) é a Identificação de Matrizes. O ponto inicial desse método é a construção de uma matriz  $n \times t$ , onde  $n$  representa o número de características coletadas de cada espécie e  $t$  o número de espécies. Similaridades entre as espécies são determinadas pelo cálculo dos coeficientes de similaridade da matriz ou, de outro modo, verifica-se a porcentagem de semelhança entre espécies conhecidas com as não conhecidas, geralmente feito em um programa de computador. Os resultados são geralmente expressos em diagramas ou dendogramas.

Dentre os sistemas que foram sugeridos para descrever as características dos organismos, alguns usam números binários os quais representam a presença (1) ou ausência (0) de uma determinada série de características do organismo. Quando se analisa todas as características do organismo, este tipo de sistema pode resultar em números com grande quantidade de dígitos, tornando-se difícil o manuseio. Foi proposto então por GRIFFITHS (1981), um sistema no qual se fixa o número de dígitos para o código numérico e cada dígito tem em sua origem um grupo de características. Na essência, o sistema é baseado em grupos com 3 características cada um e, para cada característica é dado um valor: 4, 2 ou 1. Caso a característica no organismo seja ausente, recebe o valor zero. Por exemplo, um organismo que apresenta as 3 características do grupo terá dígito 7 na formação do código numérico e um organismo que apresenta ausência das 3 características terá dígito zero. Se 6 características forem analisadas, o código numérico apresentará 2 dígitos, 9 características apresentará 3 dígitos e assim por diante. Um aspecto importante nesse método é que para cada  $n$  características haverá  $2^n$  combinações únicas para os dígitos, contando que as características utilizadas não se repitam nos grupos. Por exemplo, para 3 características que forma um grupo haverá 8 possibilidades de valores para o dígito que corresponde a esse grupo e com 6 características formando 2 grupos haverá 64 possibilidades de valores para os 2 dígitos, e assim por diante. Um método como esse facilita a diferenciação de organismos nos quais diferem entre si até mesmo com uma simples característica.

Com base nesse sistema, esse mesmo autor reuniu uma série de características, as quais foram examinadas em todas as espécies de leveduras. Para tanto, usou as descrições de 429 espécies de leveduras propostas por LODDER (1970) e das chaves elaboradas por BARNETT & PAKHURST (1974). Das características escolhidas, com exceção “células alongadas”, todas são bioquímicas ou fisiológicas, sendo que aparecem para conceder um menor equívoco na diferenciação. As características morfológicas foram evitadas, pois que apresentam subjetividade na análise do teste.

A escolha das características foi determinada pela extensão com que são usadas nas descrições padrão, pela sua utilidade, como determinada em um estudo preliminar, na diferenciação entre os grupos de máxima predição descrito por BARNETT (1975).

GRIFFITHS (1981), então, utilizando 12 características para gerar 4 dígitos, representou as 429 espécies em 248 códigos no qual 155 são espécies singulares. Quando aumentou o número de características, aumentou o número de códigos, tal que para 21 características, o número total de códigos foi 389 no qual 364 desses representavam espécies singulares.

Como a identificação de leveduras, através dos testes bioquímicos e fisiológicos sugeridos pela Taxonomia Clássica, se tornou um tanto morosa devido à grande quantidade dos testes, além de alguns testes morfológicos apresentarem uma certa subjetividade comprometendo o resultado final da análise, a Taxonomia Numérica sugerida por GRIFFITHS (1981) vem em auxílio a essa dificuldade, resultando uma forma mais rápida de identificação de leveduras e menos subjetiva no que se diz respeito à análise dos testes.

#### **2.3.4. Parâmetros cinéticos e de produção**

A detecção de leveduras “selvagens” em proporções acima de  $10^6$  UFC/ml não é suficiente para indicá-las como causa de um decorrente abaixamento no rendimento do processo. Existe a necessidade da obtenção de dados que avaliem a levedura quanto à sua capacidade fermentativa e ao seu potencial de dominar o processo. Se esses dados forem favoráveis, a levedura não está sendo prejudicial, podendo permanecer no processo e pode-se, neste caso, concluir que a diminuição no rendimento industrial se deve a outros fatores

(qualidade da matéria-prima, falhas de operação, "design" inadequado da planta, dentre outros).

RODRIGUES (1989), realizou alguns testes tais como curvas de crescimento para determinação de velocidade específica máxima, tolerância ao etanol (JIMENEZ & VAN UDEN, 1985), e alguns parâmetros medidos usualmente em cepas atípicas isoladas do processo de fermentação alcoólica, concluindo que através desses testes não é possível classificar taxonomicamente as leveduras, porém é muito importante quando se quer analisar o comportamento dessas leveduras no processo.

ANDRIETTA *et alli* (1995), através de parâmetros cinéticos e de produção avaliaram sete cepas isoladas de final de safra, verificando que as informações desses testes fornecem o potencial que as leveduras possuem de dominar o processo e sua capacidade fermentativa.

Neste mesmo trabalho, esses autores propuseram o parâmetro Potencial Fermentativo com o objetivo de caracterizar as leveduras em função de sua capacidade fermentativa em relação às leveduras do inóculo original, auxiliando na elaboração do diagnóstico dos problemas que ocorrem durante o processo.

## **3. METODOLOGIA**

### **3.1. Introdução**

Para esse trabalho, isolou-se leveduras da Usina Clealco (SP) da safra de 1995. As amostras foram colhidas todos os meses durante o período da safra, desde abril de 1995, onde ocorria a propagação do fermento até o seu encerramento em dezembro de 1995. Foi isolada também, proveniente do final da safra anterior, a cepa que deu início ao processo da safra de 1995, a qual foi denominada "Cepa Padrão". Ela foi usada como padrão para todos os testes realizados para verificação da validade dos mesmos.

A fase de isolamento foi realizada, numa safra anterior à execução desse trabalho, pois seria muito difícil para um aluno de mestrado com dois anos para a realização de seu trabalho esperar toda a safra para o isolamento e só então dar início ao seu trabalho propriamente dito. Assim uma pesquisadora do CPQBA/UNICAMP realizou a etapa de isolamento como descrito no item 3.2.

Mensalmente as amostras foram coletadas e todas as leveduras morfologicamente diferentes com uma concentração igual ou superior a  $10^6$  UFC/ml foram isoladas. No final da safra totalizou 13 cepas a serem analisadas, as quais foram atribuídos números de 1 a 13 para caracterizá-las conforme a tabela 3.1.

**Tabela 3.1 - Denominação dada às cepas isoladas**

denominação dada à cepa isolada	Mês de 1995 no qual a cepa foi coletada
1	maio
2	maio
3	maio
4	junho
5	julho
6	agosto
7	agosto
8	setembro
9	setembro
10	setembro
11	outubro
12	outubro
13	outubro

Essas leveduras isoladas foram então submetidas a duas etapas de testes:

**1ª etapa:** Fermentação em batelada e realização dos testes bioquímicos para obtenção dos parâmetros cinéticos, das produções específicas e do Potencial Fermentativo (ítems 3.3 e 3.4).

**2ª etapa:** Testes de Taxonomia Numérica com o objetivo de classificar as leveduras taxonomicamente (ítem 3.5).

## **3.2. Isolamento das leveduras**

### **3.2.1. Amostragem**

A amostragem nas dornas de fermentação foi feita seguindo as normas de assepsia utilizadas para coleta de material microbiológico, descritas abaixo:

- a. Os frascos foram limpos e esterilizados (15 min a 121°C).

b. O amostrador (tipo pescador) foi lavado várias vezes com a amostra antes de ser transferido para o frasco. Como não foi possível se flambar a borda superior do frasco, este foi aberto o mínimo possível.

c. A amostra foi coletada sempre até a metade do frasco, para que fosse possível a homogeneização da mistura no momento da diluição.

d. Para evitar a contaminação, coletou-se a amostra sempre próximo ao horário em que se realizou o isolamento.

### 3.2.2. Diluição

Após a coleta, as amostras foram diluídas de  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$  conforme o procedimento abaixo:

Para cada amostra, esterilizou-se 8 tubos contendo 9,2 ml de solução 0,1% de cloreto de sódio (ao redor de 0,2 ml é evaporado durante a esterilização, restando no tubo 9,0 ml de solução).

Transferiu-se 1,0 ml da amostra coletada, com ajuda de uma pipeta estéril, para um tubo contendo 9 ml da solução 0,1% de cloreto de sódio. Deste tubo, depois de agitado, foi transferido, com o auxílio de uma outra pipeta estéril (de 1 ou 2 ml), 1 ml para outro tubo contendo 9 ml de solução salina, e assim sucessivamente até o oitavo tubo.

As diluições realizadas são descritas na tabela 3.2:

**Tabela 3.2.** Diluições das amostras coletadas

TUBO N <sup>o</sup>	Diluição	Volume da amostra (v/v)
1	1:10 ( $10^{-1}$ )	0,1
2	1:100 ( $10^{-2}$ )	0,01
3	1:1000 ( $10^{-3}$ )	0,001
4	1:10000 ( $10^{-4}$ )	0,0001
5	1:100000 ( $10^{-5}$ )	0,00001
6	1:1000000 ( $10^{-6}$ )	0,000001
7	1:10000000 ( $10^{-7}$ )	0,0000001
8	1:100000000 ( $10^{-8}$ )	0,00000001

### 3.2.3 Condução do isolamento

Quando se quer avaliar leveduras de processo é importante trabalhar com a levedura isolada. Isto é necessário uma vez que o creme de leveduras contém outros microrganismos, que podem ser bactérias, ou mesmo outro tipo de leveduras que vão interferir nos resultados dos testes a serem realizados.

A técnica de isolamento de leveduras consiste em espalhar o inóculo da amostra previamente diluída em uma placa contendo um meio específico para o cultivo de leveduras, e após o crescimento das colônias, seleciona-se aquelas que são morfológicamente diferentes.

Existem vários meios específicos para leveduras que podem ser utilizados para o isolamento: PDA (potato dextrose ágar); Sabourd; YEPD ( extrato de levedura/ peptona/ dextrose), entre outros.

As leveduras utilizadas nesse trabalho foram isoladas pelo meio ágar WLN (Wallerstein Laboratory Nutrient) + antibiótico (para inibição de bactérias), uma vez que o uso desse meio tem a vantagem de se poder separar as diferentes cepas de levedura por diferenças morfológicas das colônias.

*Meio de cultivo WLN já formulado (DIFCO 0324-01-7) :*

Extrato de levedura.....	4
Casitona.....	5
Dextrose.....	50 g
Fosfato monopotássico.....	0,55 g
Cloreto de potássio .....	0,425 g
Cloreto de cálcio.....	0,125 g
Sulfato de magnésio.....	0,25 g
Cloreto férrico.....	0,0025 g
Sulfato de magnésio.....	0,0025 g
Verde de bromocresol.....	0,022 g
Ágar.....	20 g
Água destilada.....	1000 ml



Tempo de esterilização: 15 minutos a 121°C.

Ao meio esterilizado e resfriado adiciona-se a  $\pm 50^\circ\text{C}$  a solução de antibiótico de largo espectro (1,0 ml para cada 100 ml de meio). Este antibiótico é capaz de inibir grande variedade de bactérias sem afetar o desenvolvimento da levedura.

#### **Solução estoque de antibiótico**

Ácido nalidíxico e/ou Ampicilina.....0,1g  
Água destilada.....10 ml

Como os antibióticos são facilmente degradáveis a altas temperaturas, não podem ser esterilizados. Assim, a solução estoque de antibiótico deve ser preparada em água previamente esterilizada já no frasco onde o produto é armazenado. O antibiótico é pesado em papel alumínio esterilizado, perto de bico de Bunsen.

Distribuiu-se cerca de 20 ml do meio WLN + antibiótico em placas de petri esterilizadas, num total de 6 placas para cada amostra.

#### **Plaqueamento**

Para o plaqueamento, são transferidos, com pipetas de 0,1 ml estéreis, 0,1 ml das diluições  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  e  $10^{-8}$  para as placas já prontas contendo o meio de cultivo WLN. São feitas duas placas por diluição. Com o auxílio de alça de Drigalsky esterilizada (na esterilização, a alça é mergulhada em álcool e flambada), esparrama-se o inóculo de modo a ficar bem distribuído na placa. Após 2 hs de espera, para a absorção do inóculo pelo meio, as placas são invertidas e incubadas a 32°C por 48-72 hs.

#### **Morfologia de colônia e celular**

Após o crescimento em meio WLN, observa-se a ocorrência de colônias morfológicamente diferentes nas diluições  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  e  $10^{-8}$ . As colônias morfológicamente diferentes são separadamente estriadas por esgotamento em meio de cultivo PDA, apresentando este a vantagem de ser economicamente mais viável que o meio WLN.

As placas estriadas são incubadas a 32°C por 48-72 horas.

Após o crescimento em meio PDA, as colônias foram analisadas quanto à cor, forma, tamanho, e textura.

Após a análise quanto ao tipo de colônia, as leveduras foram analisadas quanto ao tipo celular. Para isso, foram feitas lâminas úmidas sem coloração, das diferentes formas de colônias encontradas.

Quando se vai avaliar a forma celular para taxonomia numérica não é possível utilizar os resultados obtidos nesta primeira fase, uma vez que existe um meio específico para este fim (extrato de malte).

Após o isolamento e purificação das colônias, selecionou-se as leveduras que apresentaram-se com morfologia diferentes e transferindo-as para os "slants" (ágar inclinado com meio PDA). Incuba-se a 32°C por 2 a 3 dias. A partir disso foram obtidas as culturas posteriormente utilizadas para realização dos testes ("cultura estoque").

Como o repique sucessivo não é uma prática aconselhável, uma vez que a levedura pode perder suas características originais, foram preparados, a partir de uma alçada do tubo de cultura estoque, 5 "slants" de cada cultura isolada, quantidade suficiente para o trabalho (cultura "trabalho"). Aos "slants", para melhor conservação, foi adicionado, de forma a cobrir toda a superfície do ágar inclinado, óleo mineral estéril Nujol e acondiciona-os em geladeira a 5°C.

### **3.3 Metodologia dos testes Bioquímicos**

#### **3.3.1 Introdução**

A realização dos testes bioquímicos foi feita com as leveduras isoladas, com a finalidade de verificar o comportamento de cada uma delas, quanto ao seu potencial

fermentativo. Através da análise final desses testes, é possível avaliar se as leveduras isoladas durante o período da safra são pertencentes ao processo ou se são invasoras, e verificar a sua importância no mesmo.

As leveduras isoladas foram submetidas ao processo de fermentação, em meio sintético, sempre às mesmas condições de temperatura, meio de cultivo, pH, tempo e agitação. Os testes foram realizados sempre nas mesmas condições de operação e trabalho, pois os resultados nesta etapa são qualitativos, e a análise e conclusão final se faz através da comparação dos testes entre as leveduras isoladas e as cepas padrão.

Foram então realizadas as seguintes análises:

- $\mu_{max}$  (velocidade máxima específica de crescimento);
- Análise do açúcar residual no vinho fermentado;
- Análise do etanol produzido no vinho fermentado;
- Análise da acidez produzida no vinho fermentado;
- Análise do glicerol produzido no vinho fermentado;
- Análise da massa seca produzida no vinho fermentado;
- Determinação da tolerância de etanol em leveduras;
- Determinação do pH final do vinho fermentado.

As metodologias que foram selecionadas para este trabalho foram aquelas facilmente executadas, não exigindo equipamentos sofisticados e mantendo a qualidade e a precisão dos resultados da análise. Um laboratório básico, dentro da realidade das usinas brasileiras, equipado com balança, pHmetro, espectrofotômetro, cromatógrafo gasoso, centrífuga, estufa, agitador, banho-maria, e vidrarias em geral, tem condições de realizar as análises.

### **3.3.2. Meio de cultivo para obtenção do vinho fermentado**

Para os testes bioquímicos cada cepa isolada foi cultivada em:

- meio de pré-fermentação a 200 rpm, 32°C. e 24 hs, para a propagação da levedura;
- meio de fermentação a 200 rpm, 32°C e 24 hs;

- meio para teste de  $\mu_{max}$  a 200 rpm, 32°C e 24 hs.

Nos três meios sintéticos de cultivo, as composições variaram somente na quantidade de glicose (RODRIGUES & ANDRIETTA, 1995):

*Meio de cultivo:*

glicose.....	**
Extrato de levedura.....	6,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	5,0 g
NH <sub>4</sub> CL.....	5,0 g
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O.....	1,0 g
KCl.....	1,0 g
Água destilada.....	1000 ml
pH.....	6,0

\*\* para pré-fermentação - 20 g

para teste de  $\mu_{max}$  - 40 g

para realização de outras análises - 140 g

O pH foi ajustado com hidróxido de sódio 0,1 N.

O meio de pré-fermentação é um meio de propagação da levedura e não pode ter nenhum efeito inibidor pelo substrato nem pelo produto. A concentração de 20 g/l de glicose satisfaz essas exigências. Para o meio de fermentação, concentração de glicose de 140 g/l garante a produção de etanol sem ainda haver o efeito inibidor pelo substrato.

Os meios de cultivo foram preparados com extrato de levedura de duas marcas comerciais encontradas atualmente no mercado: Biobrás e Difco. Esta última foi utilizada para os meios de cultivo das fermentações das cepas 8, 9, 10 e 12.

Os meios de cultivo foram distribuídos em erlenmeyers de 500 ml contendo 100 ml de meio de pré-fermentação e em de 1000 ml com 300 ml de meio de fermentação, fechados com tampões de algodão, protegidos com papel impermeável durante a esterilização, com o objetivo de manter secos os tampões de algodão, e esterilizados por 15 minutos à 121°C.

Para o teste de  $\mu_{max}$ , 100 ml de meio de cultivo foram distribuídos em erlenmeyers de 500 ml, fechados com tampões de algodão, protegidos com papel impermeável e esterilizados por 15 minutos à 121°C.

Foram registrados os seguintes pesos em balança semi-analítica:

- peso do erlenmeyer vazio + tampão de algodão = (F.V.);
- peso do erlenmeyer + tampão de algodão + meio de fermentação estéril = (F.E.);
- peso do erlenmeyer + tampão de algodão + meio de fermentação + inóculo = (F.I.);
- peso do erlenmeyer + tampão de algodão + meio de fermentação + inóculo após 24 hs de fermentação = (F.F.).

### 3.3.3. Fermentação

Como a metodologia propõe testes para acompanhamento de rotina nas usinas, é de fundamental importância que eles sejam realizados de forma sistemática para que os resultados sejam comparativos. Assim, todas as fermentações foram realizadas em duplicata paralelamente com a cepa “padrão”, sempre nas mesmas condições experimentais. Através deste procedimento é possível detectar se houve algum problema experimental (formulação do meio de cultura, temperatura, inóculo e analítico) ou se ocorreram alterações no processo quanto à flora microbiana.

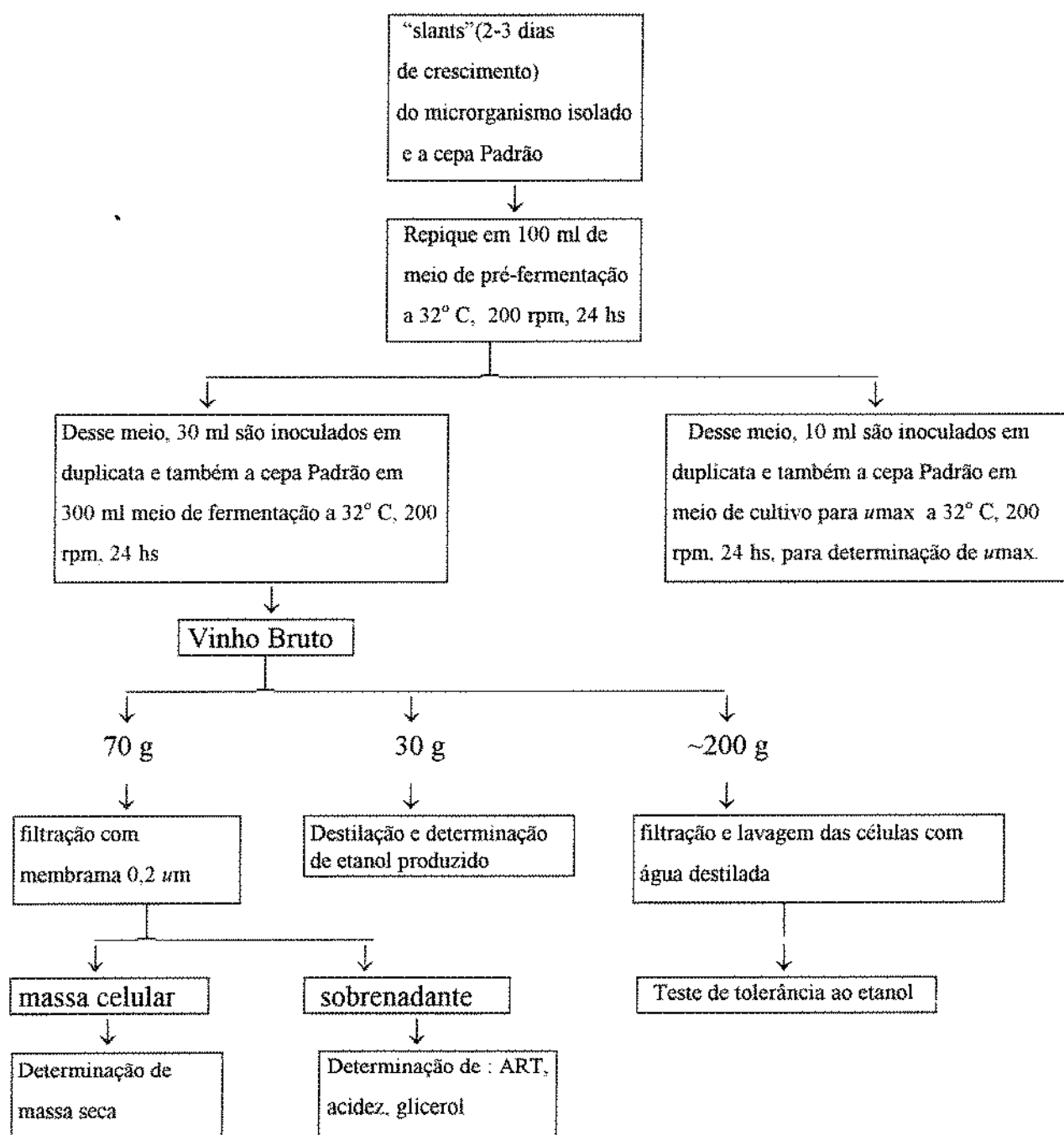
As leveduras isoladas em “slants” com 2-3 dias de crescimento, foram inoculadas em meios de pré-fermentação. Esses foram incubados em “shaker” a 32°C a 200 rpm por 24 horas. Desses meios retiravam-se 30 ml para serem inoculados nos meios de fermentação, que eram então incubados nas mesmas condições de temperatura e agitação.

Após cada fermentação, recolhia-se aproximadamente 35 g do vinho bruto de cada frasco, filtrava-se à vácuo, em membranas 0,2  $\mu$ m. As células retidas nas membranas eram utilizadas para o teste de massa seca. O sobrenadante da filtração era recolhido e acondicionado em freezer para posteriores análises de: determinação de glicérol, acidez e açúcar redutor total.

Outra parte do vinho bruto era congelado para posteriormente ser destilado. Com o destilado analisava-se a concentração de etanol em cromatografia gasosa. A destilação era necessária para evitar a interferência de outros componentes do vinho bruto na análise. O restante do vinho bruto era filtrado e a massa celular utilizada para o teste de tolerância ao etanol. Iniciava-se esse teste rapidamente para evitar perda de viabilidade das células.

O fluxograma 3.1 a seguir ilustra resumidamente as etapas para a obtenção do vinho fermentado e análises bioquímicas que foram realizadas:

**Fluxograma 3.1** Etapas ocorridas na fermentação

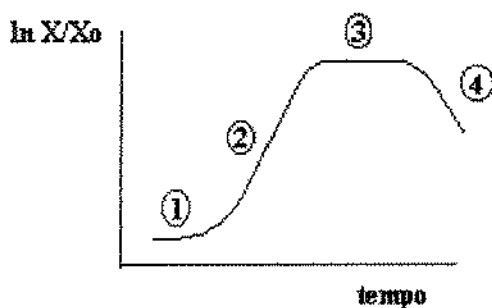


### 3.3.4. Determinação da Taxa Específica de Crescimento Máxima ( $\mu_{max}$ )

A taxa de crescimento ( $\mu_{max}$ ) é específica para cada microrganismo. A determinação desse parâmetro pode auxiliar na verificação da presença ou não de leveduras invasoras na fermentação e avaliar a importância dessas no processo. Se o  $\mu_{max}$  da levedura for baixo, sua eliminação no processo será mais fácil do que com uma com  $\mu_{max}$  próximo à levedura responsável pela produção do etanol.

A cinética de crescimento de microrganismos pode ser acompanhada através de determinação de massa celular.

As fases do ciclo de crescimento de uma cultura em batelada podem ser divididas em: 1 - fase lag, 2 - fase exponencial, 3 - fase estacionária e 4 - fase de morte.



O crescimento exponencial é dado pela seguinte equação:

$$X = X_0 \cdot 2^n \quad (3.1)$$

onde:  $n$  = número de gerações

$X_0$  = concentração de células iniciais (tempo = 0)

$X$  = concentração de células no tempo  $t$

$$n = t/g \quad (3.2)$$

onde:  $g$  = tempo de geração, que é o tempo necessário para haver duplicação de massa ou do número de células existentes no meio de cultivo;

$t$  = tempo de crescimento ou fermentação.

Assim:

$$X = X_0 \cdot 2^{t/g} \quad (3.3)$$

Aplicando-se  $\ln$  tem-se:

$$\ln X/X_0 = \ln 2^{t/g} \quad (3.4)$$

$$\ln X/X_0 = 0,69 t/g \quad (3.5)$$

Sabe-se experimentalmente que o aumento da população está relacionado com a quantidade populacional e uma constante de proporcionalidade  $\mu$  (taxa específica de crescimento), ou seja:

$$dX/dt = \mu \cdot X \quad (3.6)$$

Integrando-se a equação (3.6):

$$\ln X/X_0 = \mu \cdot t \quad (3.7)$$

Comparando-se a equação (3.5) e (3.7):

$$\mu = 0,69/g = 1/X \cdot (dX/dt) \quad (3.8)$$

O valor de  $\mu_{max}$  que corresponde à taxa específica máxima é determinado na fase linear da curva da equação (3.8).



### **Procedimento para a determinação de $\mu_{max}$ :**

O teste para determinação de  $\mu_{max}$  foi feito em duplicata para cada cepa a ser analisada juntamente com a cepa Padrão.

Foi feita a inoculação das cepas em meio estéril de pré-fermentação conforme descrito no item 3.3.3. Os frascos foram então colocados em "shaker" a 200 rpm, 32°C por 24 horas.

Passado esse período de tempo foram retirados, com pipeta estéril, 10 ml de fermentado dos frascos que foram inoculados em frascos com meio de cultivo para obtenção da curva de crescimento celular. Imediatamente após inoculação, retirou-se 1 ml de amostra de cada frasco diluindo a 10 ml em água destilada. Este procedimento era realizado de hora em hora para a leitura da densidade ótica (D.O.) em espectrofotômetro visível à 600 nm até a estabilidade da leitura indicando o término da fermentação (fase estacionária da curva de crescimento).

Construiu-se a curva  $\ln D.O$  versus tempo, sendo que na fase linear da curva de crescimento se obteve o valor de  $\mu_{max}$ , que corresponde ao coeficiente angular da reta.

### **3.3.5. Determinação dos Açúcares Redutores Totais**

Para a determinação do açúcar residual na fermentação foi utilizada a metodologia desenvolvida por MILLER (1959), baseada na reação colorimétrica do reagente DNS com o açúcar redutor e posterior leitura de absorbância. A concentração de açúcar é determinada relacionando-se a absorbância da amostra com a de uma curva padrão de concentração conhecida. A sensibilidade do método é 0,1 a 1,0 g/l, sendo portanto necessário diluições nas amostras com concentrações superiores a 1,0 g/l e hidrólise ácida quando o meio contém açúcares não redutores.

### 3.3.6. Determinação da Massa Seca Produzida

Para determinar a massa celular produzida na fermentação, pode-se utilizar métodos indiretos (curvas que relacionam densidade ótica ou porcentagem em volume de células úmidas versus massa seca) e diretos (filtração ou centrifugação de um determinado volume conhecido e posterior secagem).

Como a concentração final de células obtidas na fermentação foi baixa, o método direto de filtração à vácuo é o mais adequado para esse trabalho, tornando o resultado da análise mais preciso.

#### - Metodologia

Separaram-se duas amostras de 35 g aproximadamente do vinho bruto de cada fermentação e pesa-as em balança analítica.

Pesa-se previamente, para cada amostra, em balança analítica, um papel de filtro Millipore 0,2  $\mu\text{m}$ , juntamente com uma placa de Petri, recipiente para lhe dar suporte, obtendo-se o peso  $P_1$ .

As amostras do vinho fermentado são filtradas no filtro Millipore, a vácuo, em cada papel de filtro pesado. As células retidas no papel de filtro + o papel de filtro + a placa de Petri são pesadas obtendo-se o peso  $P_2$  e são levadas em estufa a 105° C e permanecidas até o tempo em que o peso  $P_2$  se torna constante (de 4 a 6 horas).

O valor da massa seca é calculado pela diferença de peso ( $P_2 - P_1$ ) dividido pelo peso do vinho bruto, convertendo o valor final em gramas de massa seca/100 gramas de vinho fermentado (porcentagem peso/peso).

### 3.3.7. Determinação do pH final

A determinação de pH foi feita com uma amostra do vinho bruto de cada fermentação utilizando o pHmetro previamente calibrado.

### 3.3.8. Determinação do Etanol Produzido

A análise de etanol foi feita por cromatografia gasosa, usando acetona 2% v/v como padrão interno. Foi utilizado o cromatógrafo VARIAN 3400, com coluna empacotada com Porapack-Q (comprimento: 1,0 m e diâmetro externo: 3,2 mm) e detector de ionização de chama. O injetor e o detector foram mantidos a 200 °C e 50 °C respectivamente, e a coluna foi operada isotermicamente a 160°C. Nitrogênio foi usado como gás de arraste, a uma vazão de 30 ml/minuto. Os gases de combustão foram hidrogênio e ar a 300 ml/minuto. As análises foram feitas em duplicata.

#### - Preparo da amostra

Para cada fermentação 25 ml de vinho bruto foi destilado em um destilador Tecnal modelo TE-012, com a finalidade de se obter uma solução hidroalcoólica, evitando assim a interferência de outros componentes do vinho bruto durante a cromatografia. As amostras destiladas foram diluídas na proporção 1:1 e estocadas, em freezer, em tubos de ensaio com tampas, até o momento da análise.

Para a análise as amostras foram descongeladas e misturadas com solução acetona 2% v/v na proporção 1:1 e 0,5  $\mu$ l de cada amostra foi injetada no cromatógrafo.

Os dados obtidos das amostras foram relacionados com os da curva padrão e determinou-se assim a concentração de etanol nas amostras.

#### - Preparo da curva padrão

Foram preparadas soluções hidroalcoólicas nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0 % de etanol em volume. Para se obter maior precisão no preparo das diversas concentrações de etanol para construção da curva padrão, foi mais adequado preparar uma solução de etanol a 10% (v/v) e a partir desta fazer as diluições necessárias.

As soluções de etanol foram misturadas na solução de acetona 2% na proporção 1:1 e 0,5  $\mu$ l foram injetadas no cromatógrafo, onde obteve-se dados de área de etanol e de

acetona. Com os resultados obtidos foi construída a curva padrão concentração de etanol versus área de etanol/área de acetona.

### 3.3.9. Determinação da Acidez Produzida

Os ácidos produzidos na fermentação foram titulados ao ponto final da fenolftaleína, após a expulsão do CO<sub>2</sub> e à quente para evitar redissolução do CO<sub>2</sub> ambiente.

#### - Reagentes:

Solução de fenolftaleína:

1 g de fenolftaleína + 60 ml de etanol 96%. O volume foi completado a 100 ml com água destilada.

Solução de biftalato de potássio 0,1 N:

O sal foi seco em estufa a 150°C, por 2 horas. Pesou-se 10,2115 g do sal, adicionou-se água destilada e completou-se o volume para 500 ml em balão volumétrico

Solução de NaOH 0,05 N fatorada:

Foi preparada uma solução estoque de NaOH 0,1 N (4 g NaOH em 1000 ml água destilada em balão volumétrico).

#### Padronização do NaOH:

Adicionou-se 100 ml de água destilada num erlenmeyer de 250 ml e aqueceu até o início da ebulição. Resfriou-se até 70 °C, onde foi adicionado 25 ml (pipeta volumétrica) de solução de biftalato de potássio 0,1 N e 5 gotas de fenolftaleína. A solução foi titulada com NaOH 0,1 N e anotou-se o volume gasto ( $V_{\text{NaOH}}$ ).

- o fator usado para o cálculo do preparo da solução de NaOH 0,05 fatorada foi:

$$\text{Fator} = \frac{25 \text{ ml biftalato de potássio } 0,1 \text{ N}}{V_{\text{NaOH}}} \quad (3.9)$$

- o volume de NaOH 0,1 N necessário para a diluição e obtenção de 1000 ml de solução de NaOH 0,05 N fatorada foi:

$$V_{\text{NaOH}} = \frac{500}{\text{fator}} \quad (3.10)$$

Este volume foi completado com água destilada em balão volumétrico a 1000 ml.

**- Procedimento para determinação da acidez:**

Foram adicionados 100 ml de água destilada num erlenmeyer de 250 ml e aqueceu-se até início da ebulição.

Foi esfriado até 70° C, onde adicionou 2 ml do sobrenadante do vinho obtido da fermentação com 4 a 5 gotas de fenolftaleína.

A solução foi titulada com NaOH 0,05 fatorada até coloração rósea.

Anotou-se o volume gasto ( $V_{\text{amostra}}$ ).

Foi feito um branco seguindo o mesmo procedimento e anotado o volume gasto ( $V_{\text{branco}}$ ).

Cálculo:

$$\text{Acidez sulfúrica (g/l)} = (V_{\text{amostra}} - V_{\text{branco}}) * 1,1225 \quad (3.11)$$

$$\text{onde: } 1,122 \text{ é o } \frac{\text{Eq. H}_2\text{SO}_4 = (98/2)}{\text{Eq. NaOH } 40} \quad (3.12)$$

### 3.3.10. Determinação do Glicerol

Nesta análise, a metodologia se baseia no princípio da mudança de cor do reagente e posterior leitura em espectrofotômetro.

## **Reagentes**

Kit para determinação de triglicerídeos da Labtest

### **- Preparo da curva padrão**

Solução estoque: foi pesado 1 g de glicerol e diluído a 100 ml com água destilada em balão volumétrico.

Solução trabalho: foi feita uma diluição para 100 mg glicerol/100 ml, onde tomou-se 10 ml da solução estoque e diluindo-a a 100 ml em balão volumétrico.

Da solução trabalho foram transferidos para 6 balões volumétricos de 50 ml as seguintes alíquotas: 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml e 6 ml, e completado o volume com água destilada, para obtenção das concentrações de 2, 4, 6, 8, 10 e 12 mg de glicerol por 100 ml, respectivamente.

Em 6 tubos de ensaio, foram transferidos 0,2 ml de cada concentração e em um 7º tubo foi colocado 0,2 ml de água destilada (branco). Acrescentou-se a cada tubo 0,5 ml de oxidante (Kit) e levado ao banho-maria por 30 segundos a 56° C. Adicionou-se 5 ml do reagente de cor (Kit) retornando novamente ao banho-maria por 5 minutos. Os tubos foram resfriados para a leitura de absorbância, em espectrofotômetro a 410 nm, zerando o aparelho com o branco.

Correlacionou-se a concentração de glicerol com os resultados de absorbância obtendo-se uma equação linear utilizada nos cálculos das amostras. Verificou-se o coeficiente de correlação. Se não estivesse acima de 0,95, uma nova curva padrão era feita.

### **Preparo da amostra**

Foi feita, primeiramente, uma diluição do sobrenadante do vinho fermentado. Como primeira tentativa, foi tomado 2 ml do sobrenadante e diluído com água destilada em balão volumétrico de 100 ml (1/50). Transferiu-se 0,2 ml da amostra diluída em um tubo de ensaio e acrescentou 0,5 ml de oxidante. Seguiu-se o mesmo procedimento descrito na construção da curva padrão. Caso a leitura de absorbância não estivesse dentro da faixa de

absorbância obtida na construção da curva padrão, a análise foi repetida com uma diluição conveniente. A concentração de glicerol foi determinada através da absorbância obtida das amostras e correlacionando com a equação obtida na construção da curva padrão.

### 3.3.11. Determinação da Tolerância do Etanol em Leveduras

JIMENEZ & VAN UDEN (1985) desenvolveram um método baseado no abaixamento de pH extracelular para testes rápidos de tolerância ao etanol. Neste método as leveduras tolerantes apresentam abaixamento de pH extracelular maior que as menos tolerantes, pelo fato de que o etanol causa retorno passivo de prótons para a célula, ocasionando o aumento de pH extracelular.

O valor do parâmetro  $k$ , que é uma constante exponencial de difusão de prótons, é determinado através da queda do pH em função da concentração de etanol. Na prática coloca-se uma suspensão de levedura na presença de solução de etanol de 0 a 10% (v/v), agitadas durante 2 horas a 32°C, fazendo-se a leitura do pH final da solução.

Quando as células são suspensas em água contendo glicose, prótons são liberados e o pH extracelular cai segundo uma curva característica de acidificação. O valor de pH é balanceado pela expulsão ativa e pela entrada passiva de prótons até uma condição de equilíbrio.

LEÃO & VAN UDEN (1984), estudaram a influência da concentração de etanol na entrada passiva de prótons e propuseram a seguinte equação:

$$k_p = C_0 * e^{kX} * [H^+]_f \quad (3.14)$$

onde  $k_p$  é a taxa de liberação ativa de prótons,  $[H^+]_f$  é a concentração de prótons no pH final,  $C_0$  é a constante de difusão na concentração zero de etanol,  $X$  a concentração de etanol e  $k$  a constante de entrada passiva de prótons. Aplicando logaritmo e rearranjando a equação 3.14, obtém-se a seguinte relação que expressa o pH final e a concentração de etanol:

$$\text{pH}_{\text{final}} = kX \log_{10} e + (\log C_0 - \log_{10} k_p) \quad (3.15)$$

Esta equação (3.15) é do tipo  $y = ax + b$  onde:

$y = \text{pH}_{\text{final}}$ ;

$x = \text{concentração de etanol em molaridade} * (\log_{10} e) = X * (\log_{10} e)$

$a = \text{coeficiente angular} = k \text{ (M}^{-1}\text{)}$ ;

$b = \text{coeficiente linear} = \log C_0 - \log k_p$

Em condições experimentais até 10% (v/v) de concentração de etanol, esta relação se mantém linear. Assim o valor de  $k$  é determinado através da correlação linear entre  $\text{pH}_{\text{final}}$  versus  $X \log_{10} e$ . Quanto maior o valor de  $k$ , maior será a sensibilidade da levedura ao etanol, ou seja, menor será sua tolerância ao mesmo. Isto indica que os valores de pH finais para as diversas concentrações de etanol são maiores devido à entrada passiva de prótons.

### **Metodologia para a obtenção da curva pH versus Concentração de etanol**

- a. foi preparada uma suspensão de levedura (vinho fermentado) 30% (v/v) previamente lavada.
- b. foram preparadas soluções de etanol nas concentrações de 0; 2,4; 4,8; 7,2; 9,6 e 12% (v/v).
- c. preparou-se solução de glicose a 20% p/v.

### **Procedimento**

Em frascos tipo soro de 20 ml foram adicionados:

10 ml de solução de etanol 0 a 12 % (v/v);

1 ml de suspensão de levedura a 30% (v/v);

1 ml de solução de glicose a 20%.

As suspensões foram colocadas em agitadores a 200 rpm, 32° C por 2 horas.



Fez-se a leitura do pH final. As amostras foram feitas em duplicata.

Graficou-se  $\text{pH}_{\text{final}}$  versus  $X_{\text{log e}}$ , e fez-se uma regressão linear para a obtenção do parâmetro  $k$ . O coeficiente de correlação obtido deve ser superior a 0,95 para que o resultado seja satisfatório.

### **3.4. Determinação dos Parâmetros de Produção Específica para obtenção do Potencial Fermentativo**

#### **3.4.1. Introdução**

O parâmetro Potencial Fermentativo foi definido por ANDRIETTA *et alli* (1995), com o objetivo de avaliar a capacidade fermentativa das leveduras do processo. Esse parâmetro fornece informações sobre o comportamento da levedura no processo e o quanto está sendo favorável ou prejudicial ao processo.

Na determinação do índice Potencial Fermentativo são necessários os valores de produção específica de cada produto (etanol, glicerol, ácidos e massa celular) obtidos da levedura que está sendo testada e os valores de produção específica de uma levedura referência (cepa padrão), que pode ser aquela que foi inoculada no início da safra.

Os itens 3.4.2 a 3.4.9 mostram as equações de balanço de massa necessárias para a obtenção do parâmetro Potencial Fermentativo.

#### **3.4.2. Determinação da massa de açúcar redutor total (ART) consumido na Fermentação**

A massa de ART consumido em gramas na fermentação é calculada pela diferença entre a massa de açúcar redutor inicial no mosto e a massa de açúcar residual no vinho bruto:

$$\text{ART}_{\text{CON}} = \frac{(\text{ART}_{\text{meioestéril}}) * P_{\text{mosto}}}{(\text{DENS}_{\text{mosto}}) * 1000} - \frac{(\text{ART}_{\text{vinho}}) * P_{\text{vinho}}}{(\text{DENS}_{\text{vinho}}) * 1000} \quad (3.16)$$

$$ART_{res} = \frac{(ART_{vinho}) * P_{vinho}}{(DENS_{vinho}) * 1000} \quad (3.17)$$

onde:

$ART_{CON}$  = massa de ART consumido durante a fermentação (g);

$ART_{meio\ estéril}$  = concentração de ART no meio de fermentação (mosto) estéril (g/l);

$P_{mosto}$  = massa do mosto (g);

$DENS_{mosto}$  = densidade do mosto (g/ml). Considerou-se 1,06 g/ml;

$ART_{vinho}$  = concentração de  $ART_{final}$  no vinho bruto (g/l);

$P_{vinho}$  = massa de vinho bruto (g);

$DENS_{vinho}$  = densidade do vinho bruto (g/ml). Considerou-se 1,0 g/ml;

1000 = correção de unidade (ml para l);

$ART_{res}$  = massa de ART residual no vinho bruto.

### 3.4.3. Determinação da massa de etanol produzido na Fermentação ( $ET_{PROD}$ )

A massa de etanol produzida é dada pela relação:

$$ET_{PROD} = \frac{P_{vinho} * ETANOL * (DENS_{etanol})}{100 * (DENS_{vinho})} \quad (3.18)$$

onde:

$ET_{PROD}$  = massa de etanol produzido durante a fermentação (g);

$P_{vinho}$  = massa de vinho bruto (g);

ETANOL = porcentagem do volume de etanol no vinho bruto (ml/100 ml);

$DENS_{etanol}$  = densidade do etanol (g/ml) = 0,79 g/ml;

$DENS_{vinho}$  = densidade do vinho bruto (g/ml).

### 3.4.4. Determinação da massa celular produzida na Fermentação ( $CEL_{PROD}$ )

A massa celular produzida é dada pela seguinte relação:

$$CEL_{PROD} = (P_{vinho}) * (MS_{vinho}) - (P_{inóculo}) * (MS_{inóculo}) \quad (3.19)$$

onde:

$CEL_{PROD}$  = massa celular produzida durante a fermentação (g);

$P_{vinho}$  = massa de vinho bruto (g);

$MS_{vinho}$  = massa celular seca do vinho bruto/ massa de vinho bruto (g/g);

$P_{inóculo}$  = massa do inóculo (g);

$MS_{inóculo}$  = massa celular seca do inóculo. Foi considerado  $MS_{inóculo} = 0$ .

### 3.4.5. Determinação da massa de glicerol produzido na Fermentação ( $GLI_{PROD}$ )

A massa de glicerol produzido é dada pela seguinte relação:

$$GLI_{PROD} = \frac{P_{vinho} * GLICER}{100000} \quad (3.20)$$

onde:

$GLI_{PROD}$  = massa de glicerol produzido durante a fermentação (g);

$P_{vinho}$  = massa de vinho bruto (g);

$GLICER$  = massa de glicerol produzido/massa de vinho bruto (mg/100 g);

100000 = correção de unidade (mg/100 para g).

### 3.4.6. Determinação da massa de ácidos produzidos na Fermentação ( $AC_{PROD}$ )

A massa de ácidos produzidos será dada pela relação que se segue:

$$AC_{PROD} = \frac{P_{vinho} * AC_{vinho}}{1000 * (DENS_{vinho})} - \frac{P_{mosto} * AC_{mosto}}{1000 * (DENS_{mosto})} \quad (3.21)$$

onde:

$AC_{PROD}$  = massa de ácidos produzida durante a fermentação (g);

$P_{vinho}$  = massa de vinho bruto (g);

$AC_{vinho}$  = concentração de acidez no vinho bruto (g/l);

$DENS_{vinho}$  = densidade do vinho bruto (g/ml).

$P_{mosto}$  = massa do mosto (g);

$AC_{\text{mosto}}$  = concentração de ácidos no mosto (g/l);

$DENS_{\text{mosto}}$  = densidade do mosto (g/ml);

1000 = correção de unidade (ml para l)

### 3.4.7. Determinação da massa de gás carbônico produzido na Fermentação ( $CO_{2\text{PROD}}$ )

A quantidade de gás carbônico produzido durante a fermentação não é utilizada na determinação do potencial fermentativo, mas é interessante para comparar estequiometricamente com a massa de outros produtos, assim pode-se verificar se houve perdas de massa, análises corretas, entre outros.

Pela equação da fermentação alcoólica, o rendimento teórico em etanol ( $Y_{P/S}$ ) é:

$$Y_{P/S(1)} = \frac{\text{massa de etanol formado}}{\text{massa de açúcar consumido}} = 0,511 \quad (3.22)$$

O rendimento teórico em gás carbônico é:

$$Y_{P/S(2)} = \frac{\text{massa de } CO_2 \text{ formado}}{\text{massa de açúcar consumido}} = 0,489 \quad (3.23)$$

Como os valores de  $Y_{P/S(1)}$  e  $Y_{P/S(2)}$  são próximos um do outro, a massa de etanol formada deve ser próxima à massa de  $CO_2$  produzido.

O cálculo para determinação de massa de  $CO_2$  parte do princípio da perda de massa no vinho bruto durante a fermentação, dado pela seguinte relação:

$$CO_{2\text{PROD}} = F.I. - F.F. \quad (3.24)$$

onde:

$CO_{2\text{PROD}}$  = massa de gás carbônico produzido durante a fermentação (g);

F.I = peso do erlenmeyer + tampão de algodão + meio + inóculo no tempo inicial de fermentação (g);

F.F. = peso do erlenmeyer + tampão de algodão + meio + inóculo após 24 hs de fermentação (g).

### 3.4.8. Cálculo para determinação das produções específicas

Segundo ANDRIETTA *et alli* (1995), as produções específicas medem a capacidade que uma determinada cepa possui de transformar o ART consumido em etanol, massa celular, glicerol e ácidos orgânicos e gás carbônico e podem ser definidos pelas seguintes equações.

- produção específica de etanol (PEE):

$$PEE = \frac{ET_{PROD}}{ART_{CON}} \quad (3.25)$$

- produção específica de massa celular (PEC):

$$PEC = \frac{CEL_{PROD}}{ART_{CON}} \quad (3.26)$$

- produção específica de glicerol (PEG):

$$PEG = \frac{GLIC_{PROD}}{ART_{CON}} \quad (3.27)$$

- relação entre ART residual e ART consumido (PER):

$$PER = \frac{ART_{res}}{ART_{CON}} \quad (3.28)$$

- produção específica de ácidos orgânicos (PEAc):

$$PEAc = \frac{AC_{PROD}}{ART_{CON}} \quad (3.29)$$

- produção específica de gás carbônico (PECO<sub>2</sub>):

$$PECO_2 = \frac{CO_2_{PROD}}{ART_{CON}} \quad (3.30)$$

### 3.4.9. Cálculo dos Fatores de Produto

Esses fatores são obtidos da diferença entre a produção específica dos produtos (etanol, massa celular, glicerol e acidez) e do consumo de açúcar redutor com a produção específica dos produtos da cepa referência ou “padrão, usada na comparação dos

resultados. Na prática, esses fatores fornecem o desvio relativo dos produtos em relação a cepa referência, ou padrão, e podem ser obtidos pelas seguintes relações:

- fator etanol:

$$FE = \frac{(PEE - PEE_{\text{referência}})}{PEE_{\text{referência}}} * 100 \quad (3.31)$$

onde:

$PEE_{\text{referência}}$  = produção específica de etanol da cepa referência.

- fator glicerol:

$$FG = \frac{(PEG_{\text{referência}} - PEG)}{PEG_{\text{referência}}} * 100 \quad (3.32)$$

onde:

$PEG_{\text{referência}}$  = produção específica de glicerol da cepa referência.

- fator massa celular:

$$FC = \frac{(PEC_{\text{referência}} - PEC)}{PEC_{\text{referência}}} * 100 \quad (3.33)$$

onde:

$PEC_{\text{referência}}$  = produção específica de massa celular da cepa referência.

- fator acidez:

$$FAc = \frac{(PEAc_{\text{referência}} - PEAc)}{PEAc_{\text{referência}}} * 100 \quad (3.34)$$

onde:

$PEAc_{\text{referência}}$  = produção específica de ácidos orgânicos da cepa referência.

- fator açúcar redutor residual:

$$FR = \frac{(PER_{\text{referência}} - PER)}{PER_{\text{referência}}} * 100 \quad (3.35)$$

onde:

$PER_{referência}$  = relação entre ART residual e ART consumido da cepa referência.

### 3.4.10. Cálculo do Potencial Fermentativo (PF)

O Potencial Fermentativo foi definido por ANDRIETTA *et alli* (1995) como a soma dos fatores definidos no item anterior sendo que para cada fator foi atribuído um valor que representa seu grau de importância neste índice. Para cada um dos fatores definidos no item anterior foi atribuído um peso na constituição do índice geral (Potencial Fermentativo). Atribuiu-se para FE, FR, FC, FG e FAc os pesos 10, 5, 2, 1 e 0,25 respectivamente. A equação seguinte mostra o cálculo para o Potencial Fermentativo:

$$PF = 10*(FE) + 5*(FR) + 2*(FC) + 1*(FG) + 0,25*(FAc) \quad (3.36)$$

Segundo os autores acima, o valor desse parâmetro indica o quanto as características da cepa são apropriadas para a produção de álcool. Quando o resultado desse parâmetro for próximo de zero, esta cepa é considerada com características adequadas para os processos de fermentação. Caso o resultado seja positivo, indica que a cepa testada possui características fermentativas melhores que a cepa referência. No caso de valores negativos, indica que as características da cepa testada são menos apropriadas para a produção de álcool que a cepa referência.

Para ANDRIETTA *et alli* (1995), quando o valor de Potencial Fermentativo está dentro da faixa de +100 a -100, indica que a cepa tem a mesma capacidade fermentativa da cepa referência. Esta faixa é decorrente das variações das análises empregadas. Por exemplo, para uma analista com uma experiência média em análises de laboratório poderia se admitir uma variação nas análises de etanol, massa seca, glicerol, açúcares residuais e acidez de 5%, 5%, 10%, 5%, 15% respectivamente em função das características de cada análise. Como os fatores são multiplicados pelos pesos de 10, 2, 1, 5 e 0,25 para cada um desses parâmetros, o potencial fermentativo poderia variar de -100 a +100 ( $5*10 + 5*2 + 10*1 + 5*5 + 15*0,25$ ) sem que isto significasse uma diferenciação entre as cepas. À medida que o executor das análises estiver mais experiente evidentemente este número deve cair, devido à melhor precisão das análises.

### 3.5. Metodologia para os testes de Taxonomia Numérica para leveduras

#### 3.5.1. Introdução

A Taxonomia Numérica proposta por GRIFFITHS (1981), tem como objetivo ser mais uma ferramenta para se identificar leveduras isoladas, com a vantagem que os testes envolvidos na classificação foram reduzidos quando se compara à Taxonomia Clássica. Este pesquisador caracterizou 429 cepas conhecidas utilizando 21 características, das quais foram agrupadas em 7 grupos de 3 testes diferentes. Cada um deles recebe um valor numérico se positivo; se negativo o valor é igual a zero. Somam-se os valores de cada grupo de testes obtendo-se um código numérico de 7 dígitos, o qual vai ser comparado com os códigos das 429 cepas já caracterizadas. Os 21 testes a serem realizados, apenas 1 não é bioquímico (forma celular), o que fornece uma menor subjetividade nos resultados obtidos.

A tabela 3.3 apresenta os testes de fermentação e assimilação empregados na Taxonomia Numérica com os respectivos dígitos atribuídos em cada teste:

**Tabela 3.3:** Testes da Taxonomia Numérica

DÍGITO 1	maltose crescimento (4)*	galactose crescimento (2)	lactose crescimento (1)
DÍGITO 2	nitrato crescimento (4)	eritritol crescimento (2)	amido hidrólise (1)
DÍGITO 3	ribitol crescimento (4)	crescimento a 37°C (2)	crescimento glicose/NaCl (1)
DÍGITO 4	sacarose fermentação (4)	galactose fermentação (2)	glicose fermentação (1)
DÍGITO 5	sacarose crescimento (4)	inositol crescimento (2)	celobiose crescimento (1)
DÍGITO 6	rafinose crescimento (4)	manitol crescimento (2)	melbiose crescimento (1)
DÍGITO 7	lactose fermentação (4)	galactose crescimento (2)	células alongadas (1)

\* Os valores em 4, 2, e 1 em parênteses representam a pontuação quando o teste é positivo. Caso o teste seja negativo atribui-se o valor zero ao mesmo.



### 3.5.2. Condução dos testes

Depois das leveduras isoladas e estocadas em "slants" em PDA, os testes, com exceção da forma celular e hidrólise de amido, foram conduzidos com as leveduras inoculadas em meio de crescimento específico para leveduras, o meio YEPD (extrato de levedura/ peptona/ dextrose), e incubadas por 24 hs até 48 hs a  $32 \pm 1^\circ\text{C}$ .

#### *Meio YEPD:*

Extrato de levedura .....	10 g
Peptona.....	20 g
Dextrose.....	20 g
Água destilada.....	1000 ml

O meio foi distribuído em tubos de ensaio com 9,2 ml, fechados com tampões de algodão e esterilizados a  $121^\circ\text{C}$  por 15 minutos.

### 3.5.3. Preparo dos açúcares para assimilação e fermentação

Nos testes de assimilação de açúcares verifica-se se a levedura é capaz ou não de degradar certos açúcares para o seu crescimento e manutenção. Se a levedura degrada e utiliza o açúcar para o seu crescimento, nota-se a presença de um depósito de massa celular no fundo do tubo de ensaio e o teste é lido como positivo.

Nos testes de fermentação, o objetivo é verificar se a levedura utiliza os açúcares para o processo de fermentação, com produção de acetaldeído e gás carbônico. Se a levedura fermenta o açúcar verifica-se a formação de bolhas nos tubos de Duran e o teste é positivo.

A tabela 3.4 abaixo apresenta os açúcares utilizados para os testes de assimilação e fermentação na Taxonomia Numérica:

**Tabela 3.4.** Açúcares utilizados para os testes de Taxonomia Numérica

ASSIMILAÇÃO	FERMENTAÇÃO
Maltose	Glicose
Galactose	Galactose
Lactose	Lactose
Eritritol	-
Ribitol	-
Sacarose	Sacarose
Inositol	-
Celobiose	-
Rafinose	-
Manitol	-
Melobiose	-
Xilose	-

Todos os açúcares para os testes de fermentação e/ou assimilação foram dissolvidos em uma solução basal, com concentração a 2% de açúcares descrita a seguir:

*Solução basal:*

Sulfato de amônio.....	5 g
Fosfato monobásico.....	1 g
Sulfato de magnésio.....	0,5 g
Açúcar a ser testado*.....	20 g
Água destilada.....	1000 ml

Tempo de esterilização: 3 minutos a 121°C. (Tempo necessário para que não ocorra caramelização total dos açúcares)

\* Para o caso de Rafinose utilizou-se uma concentração final de 4%.

Em todos os tubos de ensaio foram colocados 9,2 ml das soluções dos açúcares a serem testados. Nos tubos referentes aos açúcares a serem fermentados, tubos de Duram foram adicionados. Colocou-se tampões de algodão e a seguir foram esterilizados.

Os tubos de Duran nada mais são que captadores de gás, para indicar se a levedura desprende ou não o gás carbônico (CO<sub>2</sub>). Se ocorreu desprendimento de gás indica que a levedura foi capaz de fermentar o açúcar.

O meio esterilizado é inoculado com 0,1 ml das leveduras crescidas em meio YEPD como descrito no item anterior, no prazo máximo de dois dias, para não haver contaminação do meio, decorrente do curto tempo de esterilização.

É importante que somente uma pequena quantidade (0,1 ml) de suspensão da levedura seja inoculada nesses açúcares. Maior quantidade de suspensão que essa pode ser relatado como falso positivo, que significa sinais residuais de inóculo interpretado como assimilação e/ou fermentação positiva.

Faz-se necessário um tubo com 9,2 ml de solução basal sem o açúcar, denominado "branco". Inocula-se 0,1 ml de suspensão de levedura e verifica se houve crescimento. Se houve, é sinal que ainda existe dextrose residual em YEPD e esse crescimento, que pode ser visto como um pequeno depósito de material celular no fundo dos tubos, não pode ser interpretado como teste positivo.

O acompanhamento dos testes é feito diariamente, para que o líquido após a fermentação, não reabsorva o gás formado.

#### **3.5.4. Assimilação de Nitrato de Potássio (KNO<sub>3</sub>)**

Este teste determina se a levedura é capaz ou não de assimilar o nitrato. O meio basal é o mesmo para os testes de açúcares, sendo que no lugar do açúcar adiciona-se 1 g de nitrato de potássio e 1,7 g de ágar.

A quantidade de nitrato é pequena, sem efeito inibidor no crescimento. Coloca-se a solução de nitrato em volume igual a 9,2 ml em tubos de ensaio. Os tubos são fechados com tampão de algodão, protegidos com papel impermeável e esterilizados por 15 minutos a 121°C.

Após esterilização, os tubos são inoculados com 0,1 ml da levedura crescida em YEPD como descrito anteriormente e incubados a  $32 \pm 1^\circ\text{C}$  por 48 hs.

Passado esse período de tempo acrescenta-se na solução 3 gotas da solução A e 3 gotas da solução B, que estão descritas a seguir:

#### Solução A

N, N, Dimethyl - 1 - Naphtyl-Amine.....0,6 g  
Ácido acético 5M q.s.p.....100 ml

#### Solução B

Ácido sulfanílico .....0,8 g  
Ácido acético 5M q.s.p.....100 ml

Para a solução B dissolve-se aproximadamente 90 ml do ácido acético com o ácido sulfanílico sob aquecimento em capela. Após a dissolução completa-se o volume para 100 ml em balão volumétrico.

Reação positiva - rósea a vermelho

Reação negativa - meio não alterado

Confirmação do teste: Se a reação for negativa adiciona-se um pouco de zinco ao meio. Se o nitrato não for utilizado, o zinco o reduzirá a nitrito formando uma cor vermelha.

#### 3.5.5. Crescimento a alta concentração osmótica

Este teste verifica se a levedura cresce em alta concentração osmótica. O meio utilizado está descrito a seguir:

*Crescimento em NaCl 10%*

Glicose.....	20 g
Peptona.....	20 g
Extrato de levedura.....	10 g
Cloreto de Sódio.....	100 g
Água destilada.....	1000 ml

Tempo de esterilização: 3 minutos a 121°C. (Tempo necessário para que não ocorra caramelização total dos açúcares)

Colocou-se 9,2 ml da solução pronta em tubos de ensaio. Os tubos foram fechados com tampão de algodão e esterilizados. Inoculou-se ao meio 0,1 ml das leveduras crescidas em meio YEPD como descrito anteriormente, no prazo máximo de dois dias, para não haver contaminação do meio, decorrente do curto tempo de esterilização. Os tubos foram incubados a  $32 \pm 1^\circ\text{C}$  por 72 hs e verificando-se o crescimento a cada 24 hs.

**3.5.6. Crescimento em glicose 50%**

Para verificar o crescimento em 50% de glicose, utilizou-se o mesmo meio basal descrito no item 3.5.2 sendo que o açúcar utilizado para este meio foi glicose a 500 g/l.

Tubos de ensaio foram preenchidos com 9,2 ml da solução pronta. Foram fechados com tampões de algodão e esterilizados por 15 minutos a 121°C. A inoculação foi feita como descrito anteriormente (item 3.5.3). Os tubos foram incubados a  $32 \pm 1^\circ\text{C}$  por 72 hs e verificou-se o crescimento a cada 24 hs.

**3.5.7. Hidrólise do Amido**

Este teste determina a capacidade da levedura de hidrolisar o amido.

*Meio contendo amido:*

Amido.....	20 g
Extrato de levedura.....	10 g
Peptona.....	10 g
Ágar.....	15 g
Água destilada.....	1000 ml

Tempo de esterilização: 15 minutos a 121°C.

Após esterilizado o meio foi distribuído em placas estéreis (cerca de 20 ml/placa).

A levedura foi estriada no meio com amido e incubada a  $32 \pm 1^\circ \text{C}$  por 24-48 hs. Após o crescimento, com o auxílio de uma agulha estéril, transferiu-se a colônia então crescida para outra placa contendo o mesmo meio de amido. Foi feito esse procedimento para que houvesse esgotamento de todo o açúcar pela utilização deste pela levedura. A placa foi incubada por 24-48 hs a  $32^\circ \text{C}$ . Após o crescimento da cultura foi adicionada uma gota de Lugol.

Reação positiva: formação de halo ao redor da colônia

Reação negativa: não formação de halo ao redor da colônia.

**Lugol**

Iodeto de potássio.....	2 g
Iodo metálico.....	1 g
Água destilada.....	300 ml

Preparo da solução de Lugol: dissolve-se o iodeto de potássio em 150 ml de água destilada. Adiciona-se o iodo metálico aos poucos. Completa-se o volume para 300 ml.

**3.5.8. Crescimento a  $37^\circ \text{C}$** 

Teste para determinar se a levedura cresce a  $37^\circ \text{C}$ . O teste é dado como positivo se há formação de massa celular no fundo do tubo.

Foram colocados 9,0 ml do meio YEPD em tubos de ensaio, que foram fechados com tampões de algodão e esterilizados. Foi feita então a inoculação com 0,1 ml da levedura crescida em YEPD como descrito anteriormente. Os tubos então inoculados foram incubados a 37° C por 24-48 hs.

### 3.5.9. Forma celular

Este teste determina a forma celular para se avaliar a ocorrência de células alongadas ou não. Dos testes descritos para a taxonomia numérica é o que apresenta maior subjetividade.

Como a ocorrência da forma alongada é uma característica que muda em função do meio em que a levedura se desenvolveu, o meio utilizado para verificar a forma celular deve ser sempre o mesmo.

O meio utilizado foi o *extrato de malte*:

Extrato de Malte.....6 g/l

Maltose.....6 g/l

Dextrose.....6 g/l

Extrato de levedura.....1,2 g/l

Tempo de esterilização: 15 minutos a 121° C.

Foram colocados 9,2 ml da solução pronta em tubos de ensaio, que foram fechados com tampão de algodão e esterilizados.

Fez-se a inoculação com 0,1 ml da levedura crescida em YEPD como descrito anteriormente. Os tubos foram incubados por 24 hs a 32 ±1° C.

Foi feita a observação em microscópio (400x) em lâmina úmida sem coloração.

Como foi dito anteriormente, se o teste for positivo ele recebe o valor correspondente ao peso do teste (4, 2 ou 1). Se for negativo atribuir-se-à o valor zero. A soma de cada grupo (num total de 7 grupos) de 3 testes fornecerá um número e estes na seqüência formarão o código numérico da levedura. Este código deve ser comparado com

os valores obtidos por GRIFFITS (1981), o qual codificou 429 leveduras, para obtenção do gênero e espécie da levedura em estudo.

A tabela 3.5 representa o quadro geral para a obtenção do código numérico.

**Tabela 3.5 Tabela de Pontuação**

		24 hs	48 hs	72 hs	Pontuação
MALTOSE ASSIMILAÇÃO	4				
GALACTOSE ASSIMILAÇÃO	2				
LACTOSE ASSIMILAÇÃO	1				
TOTAL	7				
NITRATO ASSIMILAÇÃO	4				
ERITRITOL ASSIMILAÇÃO	2				
AMIDO HIDRÓLISE	1				
TOTAL	7				
RIBITOL ASSIMILAÇÃO	4				
37° C ASSIMILAÇÃO	2				
50% GL + 10% NaCL ASSIMIL.	1				
TOTAL	7				
SACAROSE FERMENTAÇÃO	4				
GALACTOSE FERMENTAÇÃO	2				
GLICOSE FERMENTAÇÃO	1				
TOTAL	7				
SACAROSE ASSIMILAÇÃO	4				
INOSITOL ASSIMILAÇÃO	2				
CELOBIOSE ASSIMILAÇÃO	1				
TOTAL	7				
RAFINOSE ASSIMILAÇÃO	4				
MANITOL ASSIMILAÇÃO	2				
MELOBIOSE ASSIMILAÇÃO	1				
TOTAL	7				
LACTOSE FERMENTAÇÃO	4				
XILOSE ASSIMILAÇÃO	2				
CÉLULAS ALONGADAS	1				
TOTAL	7				

### **3.6 Estudo comparativo dos Potenciais Fermentativos da cepa padrão utilizando diferentes marcas comerciais de extrato de levedura na composição do meio**

Quando se avalia as produções específicas obtidas de uma fermentação de uma cepa e compara com as produções específicas de outra fermentação com essa mesma cepa, conduzidas sempre nas mesmas condições de temperatura, agitação, composição do meio,



pH inicial, quantidade inoculada, entre outros; se espera que o resultado do Potencial Fermentativo seja zero, ou próximo de zero, quando se escolhe uma delas como referência.

Este item tem como objetivo verificar se isto de fato ocorre utilizando-se as mesmas condições físicas, o mesmo procedimento e a mesma composição do meio de fermentação variando somente a marca comercial de extrato de levedura. O objetivo é verificar se a mudança de marca comercial de extrato de levedura ocasiona interferência no crescimento das leveduras, através da análise do Potencial Fermentativo.

Para isto foram formulados 3 meios de pré-fermentação e fermentação com as seguintes marcas de extrato de levedura:

- Meio 1: extrato de levedura DIFCO;
- Meio 2: extrato de levedura OXOID;
- Meio 3: extrato de levedura BIOBRÁS.

Inoculou-se a cepa padrão, cultivada em meio PDA por 2 dias, em pré e depois em fermentação nos três meios. As fermentações foram feitas em duplicata, seguindo sempre os procedimentos descritos no item 3.3.3.

Após a fermentação foram realizados os testes de:

- determinação da concentração de açúcar redutor total residual (ART residual) (item 3.3.5);
- determinação da massa celular produzida (item 3.3.6);
- determinação da concentração de etanol produzido (item 3.3.8);
- determinação da concentração de ácidos produzidos (item 3.3.9);
- determinação da concentração de glicerol produzido (item 3.3.10);

Após a determinação da concentração dos produtos, calculou-se o Potencial Fermentativo (item 3.4) das cepas padrão crescidas em meios com extrato Difco e Oxoid, utilizando como cepa referência a cepa padrão crescida em extrato Biobrás.

### 3.7. Avaliação da Metodologia proposta

Este item tem como objetivo avaliar a metodologia para cepas isoladas que apresentam características diferentes daquela de processo. Escolheu-se duas cepas mantidas no Laboratório de Bioengenharia da FEA/UNICAMP para serem analisadas: uma cepa atípica ao processo isolada da Usina Diamante (SP), e a levedura *Candida tropicalis*.

As duas cepas foram inoculadas em meio de pré-fermentação e fermentação, paralelamente com a cepa padrão usada nesse estudo. Fez-se as fermentações em duplicata, seguindo os procedimentos descritos no item 3.3.3.

Foram então realizados todos os testes necessários para o cálculo do Potencial Fermentativo, além da velocidade específica máxima de crescimento ( $u_{max}$ ).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como citado no capítulo anterior, todas as fermentações foram conduzidas em duplicata nas mesmas condições de composição do meio, temperatura (32°C), agitação e tempo de fermentação (24 hs). As fermentações foram sempre realizadas paralelamente à cepa padrão. Neste capítulo serão apresentados os seguintes resultados dos testes de:

- determinação da velocidade específica máxima ( $u_{max}$ ) (item 4.1);
- determinação da álcool-tolerância ( $k$ ) (item 4.2);
- determinação das produções específicas e do Potencial Fermentativo (item 4.3);
- classificação taxonômica das leveduras usando Taxonomia Numérica (item 4.4)

### **4.1. Resultados da Determinação da velocidade específica máxima de crescimento ( $u_{max}$ )**

Os resultados das curvas de crescimento, bem como o ajuste feito da fase exponencial por regressão linear para obtenção da reta e o do coeficiente angular que fornece o valor de  $u_{max}$  se encontram nos gráficos de resultados no Apêndice A.

A tabela 4.1 apresenta os resultados da determinação da velocidade específica máxima das cepas analisadas. Analisando-se os valores de  $u_{max}$  médio das cepas individualmente e o respectivo valor da cepa padrão, verifica-se uma boa concordância entre os valores com exceção da cepa 3, que apresenta um desvio maior (0,056).

**Tabela 4.1.** Resultados dos testes de  $\mu_{max}$ 

Cepa	$\mu_{max}$ (teste A) (h <sup>-1</sup> )	R	$\mu_{max}$ (teste B) (h <sup>-1</sup> )	R	$\mu_{max}$ médio (h <sup>-1</sup> )	$\sigma$ ( $\mu_{max_{testeA}}$ e $\mu_{max_{testeB}}$ )	$\mu_{max}$ cepa padrão (h <sup>-1</sup> )	R	$\sigma$ ( $\mu_{max}$ médio e $\mu_{max}$ cepa padrão)
1	0,58	0,991	0,58	0,991	<b>0,58</b>	0	<b>0,58</b>	0,985	0
2	0,48	0,998	0,48	0,999	<b>0,48</b>	0	<b>0,49</b>	0,998	0,007
3	0,48	0,990	0,47	0,993	<b>0,48</b>	0,006	<b>0,55</b>	0,998	0,056
4	0,50	0,999	0,51	0,999	<b>0,51</b>	0,005	<b>0,52</b>	0,999	0,013
5	0,53	0,995	0,54	0,998	<b>0,54</b>	0,004	<b>0,51</b>	0,998	0,017
6	0,56	0,997	0,59	0,999	<b>0,58</b>	0,016	<b>0,56</b>	0,999	0,008
7	0,55	0,991	0,51	0,997	<b>0,53</b>	0,002	<b>0,54</b>	0,996	0,006
8	0,53	0,996	0,51	0,995	<b>0,52</b>	0,010	<b>0,52</b>	0,997	0
9	0,51	0,998	0,47	0,998	<b>0,49</b>	0,020	<b>0,53</b>	0,997	0,025
10	0,53	0,999	0,51	0,999	<b>0,52</b>	0,012	<b>0,52</b>	0,999	0,002
11	0,48	0,999	0,46	0,998	<b>0,47</b>	0,009	<b>0,48</b>	0,999	0,005
12	0,50	0,999	0,54	0,999	<b>0,52</b>	0,008	<b>0,50</b>	0,999	0,014
13	0,52	0,987	0,50	0,986	<b>0,51</b>	0,008	<b>0,48</b>	0,999	0,021
Média					<b>0,52</b>		<b>0,52</b>		
desvio padrão					<b>0,03</b>		<b>0,03</b>		

Na tabela 4.1 pode-se observar que a média aritmética dos valores de  $\mu_{max}$  para as cepas analisadas e a média aritmética dos valores de  $\mu_{max}$  para a cepa padrão são semelhantes. Nota-se que o desvio padrão apresenta valor de 0,03 para as 13 cepas e 0,03 para a cepa padrão indicando que o desvio em relação à média não é suficiente elevado para concluir que alguma das 13 cepas analisadas apresentem  $\mu_{max}$  diferente das demais.

#### 4.2. Avaliação do Parâmetro de Tolerância ao Etanol

A tabela 4.2 a seguir fornece resumidamente os resultados obtidos do parâmetro  $k$ , podendo-se observar que os valores de  $k$  para as 13 cepas analisadas estão muito próximos ao valor médio. Nota-se que a média aritmética dos valores de  $k_{médios}$  e a média dos valores de  $k$  das cepas padrão foram os mesmos: 0,32 M<sup>-1</sup>. O desvio padrão para as 13 cepas estudadas e para a cepa padrão foram bem baixos. Estes resultados indicam que tanto as cepas analisadas quanto a cepa padrão apresentam a mesma capacidade de tolerância ao etanol dentro das condições estudadas.

Tabela 4.2. Resultados do Parâmetro de Tolerância ao Etanol

CEPA	k (teste A) (M <sup>-1</sup> )	R k(A)	k (teste B) (M <sup>-1</sup> )	R k(B)	k <sub>médio</sub> (M <sup>-1</sup> )	k cepa padrão (M <sup>-1</sup> )	R k <sub>padrão</sub>
1	0,32	0,98	0,34	0,98	0,33	0,35	0,98
2	0,33	0,91	0,30	0,89	0,31	0,32	0,95
3	0,29	0,93	0,31	0,93	0,30	0,32	0,94
4	0,30	0,96	0,32	0,98	0,31	0,28	0,95
5	0,33	0,97	0,33	0,97	0,33	0,34	0,97
6	0,33	0,99	0,32	0,99	0,33	0,33	0,99
7	0,29	0,99	0,30	0,99	0,30	0,28	0,98
8	0,32	0,94	0,32	0,94	0,32	0,33	0,88
9	0,31	0,93	0,33	0,95	0,32	0,31	0,98
10	0,33	0,99	0,33	0,99	0,33	0,34	0,89
11	0,33	0,92	0,34	0,97	0,34	0,34	0,92
12	0,34	0,97	0,32	0,94	0,33	0,33	0,94
13	0,35	0,98	0,33	0,98	0,34	0,35	0,98
Média					0,32	0,32	
desvio padrão					0,01	0,02	

Os valores de  $pH_{final}$  versus concentração de etanol obtidos para o cálculo do parâmetro de tolerância ao etanol (k) de cada cepa e padrão se encontram nas tabelas de Resultados do Apêndice B (tabela B-6).

#### 4.3. Resultados das Produções Específicas e do Potencial Fermentativo

Os resultados dos testes de ART do meio estéril, ART residual, glicerol, etanol, massa celular produzidos; acidez do mosto e do vinho; densidade do vinho, teor de gás carbônico produzido foram necessários para o cálculo das Produções Específicas e Potencial Fermentativo. Os resultados dos testes da fermentação para as 13 cepas analisadas e a padrão estão apresentados detalhadamente nas tabelas do Apêndice B.

A tabela 4.3 exemplifica a planilha de cálculo para obter o valor do Potencial Fermentativo da cepa 1. Os demais valores dos produtos formados e do Potencial Fermentativo para as cepas 2 a 13 se encontram nas tabelas de resultados do Apêndice C.

Os desvios percentuais ou fatores mostrados na tabela 4.3 (e) foram calculados pela diferença das produções específicas da cepa analisada com a cepa padrão, dividindo-se o resultado com as produções específicas da cepa padrão. A cepa padrão escolhida como dito anteriormente foi a cepa inoculada inicialmente no processo e sabe-se que ela apresenta boa capacidade fermentativa.

Os (fatores\*pesos) que aparecem na tabela 4.3 (e) foram calculados multiplicando-se os desvios de PEE, PEC, PEG, PER, PEAc pelos pesos 10; 2; 1; 5 e 0,25 respectivamente. Esses números foram atribuídos de acordo com o grau de importância de cada produto em uma usina alcooleira, conforme ANDRIETTA *et alli* (1995).

O Potencial Fermentativo foi calculado somando-se os (fatores\*pesos). Potencial Fermentativo positivo e alto significa que a cepa analisada tem capacidade fermentativa maior que a cepa referência e está mais adequada para o processo.

O Potencial Fermentativo de uma cepa elevado quer dizer que a produção específica de etanol é relativamente maior que da cepa referência e que as produções específicas de massa celular, glicerol, e a relação ART residual e ART consumido são menores que as produções da cepa referência.

**Tabela 4.3** -Resultados dos testes de Fermentação alcoólica e determinação das Produções Específicas e do Potencial Fermentativo para a cepa 1 tomando como referência a cepa padrão.

Seqüência de cálculos como exemplo:

(a) primeiramente são calculadas as massas de mosto, vinho e inóculo:

$$P_{\text{mosto}} = F.E. - F.V.;$$

$$P_{\text{vinho}} = F.F. - F.V.;$$

$$P_{\text{inóculo}} = F.I. - F.E.$$

CEPA	F.V. (g)	F.E. (g)	F.I. (g)	F.F. (g)	P <sub>mosto</sub> (g)	P <sub>vinho</sub> (g)	P <sub>inóculo</sub> (g)
1-a	304,90	601,90	631,60	618,20	297,00	313,30	29,70
1-b	361,91	658,70	688,50	675,50	296,79	313,59	29,80
MÉDIA				646,85	296,90	313,45	29,75
PADRÃO	283,70	579,70	609,80	596,50	296,00	312,80	30,10

(b) apresentação dos resultados obtidos das análises de determinação de ART do meio estéril e do vinho, acidez e densidade do mosto e glicerol, massa seca, etanol e acidez do vinho.

CEPA	ART <sub>meioestéril</sub> (g/l)	ART <sub>vinho</sub> (g/l)	GLICER. (mg/100g)	MS <sub>mosto</sub> (g/g)	MS <sub>vinho</sub> (g/g)	ETANOL (v/v)	AC <sub>vinho</sub> (g/l)	AC <sub>mosto</sub> (g/l)	DENS <sub>mosto</sub> (g/ml)
1-a	134,04	20,78	502,94	0,00	0,0053	4,13	2,91	2,82	1,06
1-b	134,04	22,32	459,62	0,00	0,0050	5,67	2,85	2,82	1,06
MÉDIA	134,04	21,55	481,28	0,00	0,0052	4,90	2,88	2,82	1,06
PADRÃO	134,04	25,63	516,55	0,00	0,0054	5,05	2,94	2,82	1,06

(c) cálculo da massa de ART consumido e residual, etanol, glicerol, acidez, massa celular, gás carbônico produzidos, conforme equações descritas nos itens 3.4.2 a 3.4.7.

CEPA	ART <sub>CON</sub> (g)	ET <sub>PROD</sub> (g)	GLI <sub>PROD</sub> (g)	AC <sub>PROD</sub> (g)	ART <sub>res.</sub> (g)	CEL <sub>PROD</sub> (g)	CO <sub>2</sub> <sub>PROD</sub> (g)
1-a	31,05	10,22	1,58	0,91	6,51	1,68	13,40
1-b	30,53	14,04	1,44	0,89	7,00	1,57	13,00
MÉDIA	30,79	12,13	1,51	0,90	6,75	1,62	13,20
PADRÃO	29,41	12,49	1,62	0,92	8,02	1,69	13,30

(d) cálculos das Produções Específicas e da relação ART residual e ART consumido conforme equações descritas no item 3.4.8.

CEPA	PEE	PEC	PEG	PER	PEAc	PECO <sub>2</sub>
1-a	0,3293	0,0540	0,0508	0,2097	0,0294	0,4316
1-b	0,4599	0,0514	0,0472	0,2292	0,0293	0,4258
MÉDIA	0,3946	0,0527	0,0490	0,2194	0,0293	0,4287
PADRÃO	0,4246	0,0576	0,0549	0,2726	0,0313	0,4522

(e) cálculo dos fatores (FE, FC, FG, FR, Fac) e Potencial Fermentativo (PF) conforme equações descritas nos itens 3.4.9 a 3.4.10 respectivamente.

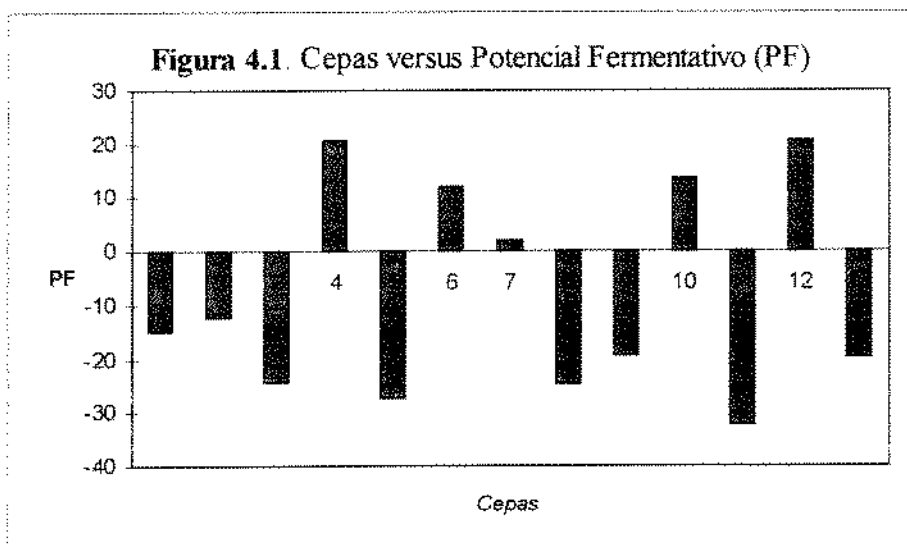
	CEPA 1	CEPA padrão		FATOR	peso	FATOR*peso
PEE	0,3946	0,4246	FE	-7,08	10	-70,78
PEC	0,0527	0,0576	FC	8,52	2	17,04
PEG	0,0490	0,0549	FG	10,84	1	10,84
PER	0,2194	0,2726	FR	5,32	5	26,59
PEAC	0,0293	0,0313	FAc	6,28	0,25	1,57
						PF = -14,7

Os valores obtidos das produções específicas e do Potencial Fermentativo das 13 cepas apresentam-se na tabela 4.4 a seguir:

**Tabela 4.4.** Resultados das Produções Específicas e Potencial Fermentativo para as 13 cepas analisadas.

cepa	PEE	PEC	PEG	PER	PEAc	PECO <sub>2</sub>	PF
1	0,3946	0,0527	0,0490	0,2194	0,0293	0,4287	-14,7
2	0,3395	0,0512	0,0520	0,1838	0,0313	0,4685	-12,3
3	0,3966	0,0571	0,0564	0,3145	0,0350	0,4834	-24,2
4	0,4153	0,0526	0,0523	0,2173	0,0323	0,4978	20,7
5	0,4451	0,0581	0,0594	0,3671	0,0361	0,4670	-27,3
6	0,3939	0,0584	0,0569	0,2508	0,0322	0,4805	12,0
7	0,3968	0,0460	0,0477	0,2268	0,0308	0,4695	2,1
8	0,3928	0,0557	0,0307	0,0156	0,0231	0,4475	-24,5
9	0,4091	0,0565	0,0408	0,0193	0,0286	0,4597	-19,4
10	0,4010	0,0561	0,0358	0,0175	0,0259	0,4536	13,6
11	0,4707	0,0607	0,0633	0,3710	0,0384	0,4766	-32,1
12	0,4176	0,0519	0,0402	0,0177	0,0290	0,4602	20,7
13	0,3376	0,0508	0,0496	0,1777	0,0274	0,4359	-19,8
<b>Média=</b>	<b>0,4008</b>	<b>0,0544</b>	<b>0,0488</b>	<b>0,1845</b>	<b>0,0307</b>	<b>0,4638</b>	
<b>desvio padrão=</b>	<b>0,0358</b>	<b>0,0040</b>	<b>0,0096</b>	<b>0,1307</b>	<b>0,0042</b>	<b>0,0193</b>	

A figura 4.1 a seguir fornece os resultados de Potencial Fermentativo das cepas analisadas.





Nota-se que houve diferença significativa da relação ART residual e consumido (PER) quando se compara as cepas 8, 9, 10 e 12 com às demais outras. Vale a pena citar que para as cepas 8, 9, 10, e 12 e as cepas padrão que correram paralelamente, as fermentações se realizaram com meio contendo extrato de levedura da marca comercial Difco enquanto para as demais cepas, o extrato de levedura utilizado foi da marca Biobrás. Como havia acabado o extrato de levedura Biobrás utilizou-se o da Difco sem saber que isto poderia interferir no crescimento da levedura. Como o padrão foi feito paralelamente o mesmo aconteceu com o PER obtido para ele, ou seja, a levedura não conseguiu utilizar todo o açúcar no meio com extrato Biobrás e o valor de PER foi alto em comparação com PER da cepa crescida em meio com Difco. Através da cepa padrão foi possível identificar a diferença da fonte de extrato de levedura das duas marcas comerciais.

As cepas 4, 6, 7, 10 e 12 apresentaram valores de Potencial Fermentativo (PF) positivos, indicando que apresentaram características fermentativas melhores que a cepa a padrão. As demais apresentaram PF negativo. No entanto os valores de Potencial Fermentativo para todas estiveram na faixa de +50 a -50, que segundo ANDRIETTA *et alli* (1995), é a faixa de tolerância dada para Potencial Fermentativo quando se quer designar uma mesma cepa. Neste trabalho a variação dos valores do Potencial Fermentativo oscilaram entre -32,1 a 20,7 indicando que não há diferença entre as cepas coletadas durante a safra e a padrão que foi utilizado para a propagação no início da safra. Além disso, os valores mostram que os erros experimentais foram relativamente baixos.

#### **4.4. Resultados da Taxonomia Numérica**

A tabela 4.5 a seguir apresenta os resultados dos testes microbiológicos e o código numérico obtido para a cepa 1. Os sinais (+) indicam que houve crescimento da cepa no meio e sinais (-) indicam que a cepa não se desenvolveu no meio. Para cada grupo de 3 testes obteve-se um dígito, totalizando 7 dígitos, os quais foram comparados à tabela de códigos numéricos de leveduras proposto por GRIFITTHS (1981) da onde se obteve a classificação taxonômica para a cepa 1.

Tabela 4.5 - Resultados dos Testes da Taxonomia Numérica para a Cepa 1

		24 hs	48 hs	72 hs	Pontuação
MALTOSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
GALACTOSE ASSIMILAÇÃO	2	+	+	+	2
LACTOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
<b>TOTAL</b>	<b>7</b>				<b>6</b>
NITRATO ASSIMILAÇÃO	4		-		0
ERITRITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
AMIDO HIDRÓLISE	1		-		0
<b>TOTAL</b>	<b>7</b>				<b>0</b>
RIBITOL ASSIMILAÇÃO	4	-	-	-	0
37° C ASSIMILAÇÃO	2	+	+	+	2
50% GL + 10%NaCL ASSIMIL.	1	+/+	+/+	+/+	1
<b>TOTAL</b>	<b>7</b>				<b>3</b>
SACAROSE FERMENTAÇÃO	4	+	+	+	4
GALACTOSE FERMENTAÇÃO	2	+	+	+	2
GLICOSE FERMENTAÇÃO	1	+	+	+	1
<b>TOTAL</b>	<b>7</b>				<b>7</b>
SACAROSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
INOSITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
CELOBIOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
<b>TOTAL</b>	<b>7</b>				<b>4</b>
RAFINOSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
MANITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
MELOBIOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
<b>TOTAL</b>	<b>7</b>				<b>4</b>
LACTOSE FERMENTAÇÃO	4	-	-	-	0
XILOSE ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
CÉLULAS ALONGADAS	1	+			1
<b>TOTAL</b>	<b>7</b>				<b>1</b>

CÓDIGO: 6 0 3 7 4 4 1

Os resultados dos testes microbiológicos para as cepas 2 a 13 analisadas se encontram nas tabelas de resultados do Apêndice D.

Os códigos numéricos encontrados para as 13 cepas analisadas e a padrão e a correspondente classificação taxonômica estão apresentados na tabela 4.6.

**Tabela 4.6.** Identificação das cepas através de Taxonomia Numérica

<i>levedura isolada</i>	<i>Pontuação obtida</i>	<i>Microrganismo correspondente</i>
1	6 0 3 7 4 4 1	<i>S. cerevisiae</i>
2	6 0 3 7 4 4 1	<i>S. cerevisiae</i>
3	6 0 3 7 4 4 1	<i>S. cerevisiae</i>
4	6 0 3 7 4 4 1	<i>S. cerevisiae</i>
5	6 0 3 7 4 4 1	<i>S. cerevisiae</i>
6	6 0 3 7 4 4 1	<i>S. cerevisiae</i>
7	6 0 3 7 4 4 1	<i>S. cerevisiae</i>
8	6 0 3 7 4 4 1	<i>S. cerevisiae</i>
9	6 0 3 7 4 4 1	<i>S. cerevisiae</i>
10	6 0 3 7 4 4 1	<i>S. cerevisiae</i>
11	6 0 3 7 4 4 1	<i>S. cerevisiae</i>
12	6 0 3 7 4 4 1	<i>S. cerevisiae</i>
13	6 0 3 7 4 4 1	<i>S. cerevisiae</i>
padrão	6 0 3 7 4 4 1	<i>S. cerevisiae</i>

Verifica-se que todas as cepas pertencem à mesma espécie de levedura, a *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados da Taxonomia Numérica confirmam os resultados do Potencial Fermentativo, ou seja, as capacidades fermentativas das 13 cepas são semelhantes à cepa de processo.

#### **4.5. Resultados dos Potenciais Fermentativos da cepa Padrão quando são utilizadas diferentes marcas comerciais de extrato de levedura.**

A tabela 4.7 a seguir mostra os resultados das produções específicas e o Potencial Fermentativo calculados para a cepa Padrão crescida em meio com extrato de levedura Difco, Oxoid e Biobrás. No cálculo de Potencial Fermentativo usou-se como referência a cepa Padrão crescida em meio com extrato de levedura Biobrás. Os resultados obtidos dos testes das fermentações para o cálculo das Produções Específicas e dos Potenciais Fermentativos estão apresentados nas tabelas de resultados do Apêndice E.

**Tabela 4.7** - Resultados das produções específicas, dos fatores e do Potencial Fermentativo das cepas padrão crescidas em meios com extrato de levedura Difco, Oxoid e Biobrás.

	Produções Específicas da cepa padrão crescida em extrato:			FATORES da cepa padrão em extrato:		FATORES*peso da cepa padrão em	
	Difco	Oxoid	Biobrás	Difco	Oxoid	Difco	Oxoid
PEE	0,3718	0,3210	0,3778	-1,58	-15,05	-15,84	-150,50
PEC	0,0577	0,0457	0,0527	-9,41	13,26	-18,81	26,52
PEG	0,0381	0,0420	0,0385	1,05	-9,03	1,05	-9,03
PER	0,0145	0,1274	0,0222	0,77	-10,53	3,83	-52,63
PEAc	0,0246	0,0286	0,0265	7,25	-7,93	1,81	-1,98
					<b>PF=</b>	<b>-28,0</b>	<b>-187,6</b>

Nota-se que as produções específicas da cepa Padrão com extrato de levedura Difco apresentaram valores próximos com as produções específicas da cepa padrão com extrato de levedura Biobrás e o Potencial Fermentativo encontrado para este caso foi de -27,6 estando dentro da faixa tolerada de valores de Potencial Fermentativo para uma mesma cepa. Isto mostra que os resultados das fermentações realizadas com meios compostos com extrato de levedura DIFCO e BIOBRÁS não apresentaram alterações significativas.

Já a cepa crescida em meio com extrato Oxoid apresentou variação significativa nos valores das produções específicas quando comparou-se à cepa crescida em meio com Biobrás. O Potencial Fermentativo para a cepa crescida em meio com extrato Oxoid foi bastante negativo: -187,6. Isto demonstra que variações podem ocorrer no crescimento das leveduras quando se troca a marca de extrato de levedura, podendo ocasionar resultados adversos do esperado.

Conclui-se, então, que é importante a utilização da mesma marca, se possível, o mesmo lote, de extrato de levedura no meio para a fermentação da cepa analisada e cepa referência. É por este motivo que se corre um padrão para cada fermentação nas mesmas condições.

#### 4.6. Avaliação da Metodologia Proposta

A tabela 4.8 abaixo mostra os resultados sumarizados obtidos da determinação da velocidade máxima específica de crescimento ( $u_{max}$ ), do parâmetro  $k$  de tolerância ao etanol, do Potencial Fermentativo e Taxonomia Numérica de duas cepas atípicas ao processo: a *Candida tropicalis* e uma cepa atípica isolada da Usina Diamante (SP), cujas fermentações ocorreram paralelamente com a cepa padrão. Os resultados dos testes de  $u_{max}$  estão descritos em gráficos no Apêndice A, os resultados das fermentações, das Produções Específicas e Potencial Fermentativo e as tabelas dos testes de Taxonomia Numérica estão descritos no Apêndice F.

**Tabela 4.8.** Resultados de  $u_{max}$ , de  $k$ , do Potencial Fermentativo (PF) e Taxonomia Numérica para as cepas *Candida tropicalis*, Cepa atípica isolada da Usina Diamante e Padrão.

Parâmetro estudado		Cepa Padrão	<i>Candida tropicalis</i>	Cepa isolada da Usina Diamante
$u_{max}$	$(h^{-1})$	0,58 (R = 0,99)	0,54 (R = 0,99)	0,45 (R = 0,99)
		0,59 (R = 0,99)	0,53 (R = 0,99)	0,48 (R = 0,98)
$u_{max}$	$(h^{-1})$	0,59	0,54	0,47
$k$	$(M^{-1})$	0,35 (R = 0,99)	1,31 (R = 0,99)	—
			1,22 (R = 0,99)	
$\bar{k}$	$(M^{-1})$	0,35	1,27	—
PF		—	+3,8	- 432,2
Taxonomia	código obtido	6037441	6177561	4035441
Numérica	nome	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>S. bayanus</i>

A cepa isolada da Usina Diamante apresenta velocidade máxima específica de crescimento ( $u_{max}$ ) menor que a cepa padrão e o Potencial Fermentativo é bastante negativo, indicando que esta cepa não apresenta características fermentativas favoráveis à produção de etanol, não sendo desejada no processo. Como os valores de  $u_{max}$  são próximos, esta cepa poderia causar problemas e prejuízos na fermentação caso ela encontrasse condições favoráveis para sua instalação no processo.

Para a cepa *Candida tropicalis* obteve-se valores de  $u_{max}$  um pouco menores que os da cepa padrão. O valor de Potencial Fermentativo está equiparado com a padrão indicando que a cepa apresenta características fermentativas favoráveis, porém é menos álcool-tolerante ( $k$  da *Candida* é maior que  $k$  da padrão).

#### 4.7. Resumo Final dos Resultados Obtidos

A tabela 4.9 abaixo apresenta todos os resultados obtidos do estudo da verificação do comportamento das cepas em relação aos parâmetros avaliados.

**Tabela 4.9** - Resultados dos parâmetros analisados e Taxonomia Numérica nas 13 cepas isoladas da Usina Clealco.

cepa	PF	$u_{max} (h^{-1})$	$k (M^{-1})$	Taxonomia Numérica
1	-14,7	0,51	0,33	<i>S. cerevisiae</i>
2	-12,3	0,42	0,31	<i>S. cerevisiae</i>
3	-24,2	0,47	0,30	<i>S. cerevisiae</i>
4	20,7	0,52	0,31	<i>S. cerevisiae</i>
5	-27,3	0,54	0,33	<i>S. cerevisiae</i>
6	12,0	0,57	0,33	<i>S. cerevisiae</i>
7	2,1	0,56	0,30	<i>S. cerevisiae</i>
8	-24,5	0,57	0,32	<i>S. cerevisiae</i>
9	-19,4	0,46	0,32	<i>S. cerevisiae</i>
10	13,6	0,52	0,33	<i>S. cerevisiae</i>
11	32,1	0,47	0,34	<i>S. cerevisiae</i>
12	20,7	0,50	0,33	<i>S. cerevisiae</i>
13	-19,8	0,51	0,34	<i>S. cerevisiae</i>
padrão		0,52	0,32	<i>S. cerevisiae</i>

Nota-se pela tabela 4.9 que as 13 cepas analisadas apresentaram Potencial Fermentativo com valores próximos de zero, os valores do parâmetro  $k$  se encontraram muito próximos dos valores de  $k$  da cepa padrão e a variação dos valores de  $u_{max}$  esteve dentro de uma faixa tolerada para uma mesma cepa.

A Taxonomia Numérica vem confirmar os resultados obtidos do Potencial Fermentativo, ou seja, as 13 cepas analisadas se tratam da mesma espécie da cepa padrão.

## 5. Conclusões

▷ Conclui-se pela análise de resultados obtidos que as cepas isoladas durante a safra de 1995 da Usina Clealco apresentaram características fermentativas semelhantes com a inicialmente propagada no processo, indicando que não houve problemas com contaminação por leveduras “selvagens”. Verificou-se que durante este período o rendimento de etanol manteve-se satisfatório.

▷ A metodologia proposta nesse trabalho alcançou o seu objetivo, o qual foi o acompanhamento do comportamento das leveduras com concentração acima de  $10^6$  UFC/ml existentes no processo durante o período da safra. Verificou-se que através dos resultados, a metodologia é válida para essa finalidade, sendo que o Potencial Fermentativo então analisado vem demonstrar as condições fermentativas das leveduras no processo, podendo-se tomar medidas preventivas, caso houver a detecção de leveduras com Potencial Fermentativo muito baixo em concentrações acima de  $10^6$  UFC/ml.

▷ Os métodos analíticos empregados podem ser facilmente implantados em usinas de álcool, onde ainda carece de equipamentos especializados e de mão-de-obra qualificada. A metodologia empregada também é importante quando se leva em conta a linha de ação das indústrias atualmente, que é o aumento da qualidade do produto que ela fornece com menor custo. Essa metodologia de verificação de uma possível contaminação por leveduras “selvagens” entra em concordância com o objetivo das indústrias de detectar algum problema na fermentação antes que se perca o controle do processo.

▷ Essa metodologia também pode vir a ser empregada em indústrias cervejeiras e vinícolas, onde o processo também tem como base a Fermentação Alcoólica por leveduras e também como nas usinas alcooleiras, algumas não são equipadas com equipamentos e linha de produção estéreis.

▷ Devido à variação dos resultados de fermentação para uma mesma cepa sempre nas mesmas condições físicas e de composição dos nutrientes no meio de fermentação, chega-se à conclusão que o nutriente extrato de levedura pode afetar o crescimento da levedura quando se altera o meio pela troca de uma marca comercial de extrato de levedura, mantendo sempre a mesma dosagem, ou até mesmo quando se varia somente o lote. No entanto, este efeito é eliminado com a execução da fermentação de uma cepa padrão em paralelo com a cepa em estudo.

### ***Propostas para trabalhos futuros***

Verificar o quanto os extratos de leveduras com diferentes marcas comerciais, ou seja, produzidos em laboratórios diferentes interferem no crescimento das leveduras durante a fermentação.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTERTHUM, F.; CRUZ, M. R. M.; VAIRO, GAMBASSI, D. M. Efeito dos Microrganismos Contaminantes da Fermentação Alcoólica nas Microdestilarias. **STAB - Açúcar, Álcool e Subprodutos**, 3,1 p.42-49,1984.
- AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; ZAGO E.A.; BASSO L.C. GALLO C.R. Processos de Fermentação Alcoólica, seu Controle e Monitoramento. Escola Superior de Agronomia Luis de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 1989.
- AMORIM, H. V. & OLIVEIRA, A. J. Infecção na Fermentação: como evitá-la. **STAB - Açúcar, Álcool e Subprodutos** 5: 12-18, 1982.
- ANDRIETTA, S. R., ANDRIETTA, M. G. S., RODRIGUES, M. I. Método de Caracterização de Leveduras de Processo Utilizando Parâmetros Cinéticos e Produção Específica. **STAB - Açúcar, Álcool e Subprodutos**, 13(4): 22-25, 1995.
- AQUARONE, E.; BARUFFALDI, R.; NACCO, R. Emprego das Associações de Antibióticos na Fabricação de Álcool por Fermentação. **Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, 6(2):257-308,1968.
- BARNETT, J. A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. Yeast: Characteristics and Identification. Cambridge, Cambridge University Press, 1983. 811 p.
- BARNETT, J. A. & PANKHURST, R. J. A New Key to the Yeasts. North Holland Publ. Co., Amsterdam e London, 1974.

- BERTELLI, A. Dezesesseis anos de Proálcool. **STAB - Açúcar, Álcool e Subprodutos**. 11(1):19-20,1992.
- BRUIJN, J. Deterioration of Sugar Cane After Harvesting. Part I. Changes in juice Composition. **The Internation Sugar Journal**. Vol LXVIII:331-334,1966.
- BOLETIM TÉCNICO COPERSUCAR. Controle Microbiológico na Fabricação de Açúcar e Álcool. 22, 2-17, 1983.
- CLARKE, M. A., ROBERTS E. J., GODSHALL M. A., BRANNAN M. A., CARPENTER F.J., COLL E. E. Sucrose loss in the Manufacture of Cane Sugar. **Sugar y Azucar**. 75(9)64-68, 1980.
- CONN & STUMPH. Introdução à Bioquímica, 4 ed., Edgar Brucher Ltda, São Paulo, 1980.525 p.
- COWAN, S. T. Development of Coding Schemes for Microbial Taxonomy. **Advances in Applied Microbiology** 7, 139-167, 1965.
- DEGREEÉ, R., THOMAS. D. Y., ASH, J, MAILHIOT, K., MORIN, A. e DUBORD, C. Wine Yeasts Strain Identification. **American Journal Enology Viticulture**, 40(4), p.309-315, 1989.
- GALLO, C. R. & CANHOS, V. P. Contaminantes Bacterianos na Fermentação Alcoólica - Revisão. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos** . p. 35-40, 1991.
- GALLO, C. R. & CANHOS, V. P. Efeito do tratamento Ácido no Fermento sobre a Microbiota Bacteriana Contaminante da Fermentação Alcoólica. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**. p. 35-37, 1991.

- GALLO, C. R. Determinação da Microbiota Bacteriana de Mosto e de Dornas de Fermentação Alcoólica. Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade de Campinas. 388p. Tese (Doutorado) 1990.
- GORIN, P. A. J. & SPENCER, J. F. T. Próton Magnetic Resonance Spectroscopy - An Aid in Identification and Chemataxonomy of Yeasts. **Advances in Applied Microbiology** 13, p. 25-89, 1970.
- GOODFELLOW, M.; JONES, D.; PRIEST, F. G. Computer-assisted Bacterial Systematics. Academic Press, 1985. 443 p.
- GRIFFITS, A. J. A Numericlature of the Yeast. **Antonie van Leeuwenhoek**, 47:547-63,1981.
- GUINARD, J. X. & LEWIS, M. J. Study of Phenomenon of Agglomeration in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of the Institute of Brewing**, 99(6):487-503, 1993.
- JIMENEZ, J. & VAN UDEN, N. Use of Extracellular Acidification for the Rapid Testing of Ethanol Tolerance in Yeasts. **Biotechnology and Bioengineering**, Vol. XXVII, P. 1596-1598, 1985.
- LEÃO, C. & VAN UDEN, N. Effects of Ethanol and Other Alkanols on the General Amino Acid Permease of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**. 26 (4), p. 403-405, 1984.
- LIMA, U. A.; GOLDONI J. S; CEREDA, M.P.; SOUZA L. G. Ocorrência de Microrganismos em Caldo Bruto, Caldo Misto e Água de Embebição em uma Usina de Açúcar de Cana. **Brasil Açucareiro**. (4) 337-343, 1974.

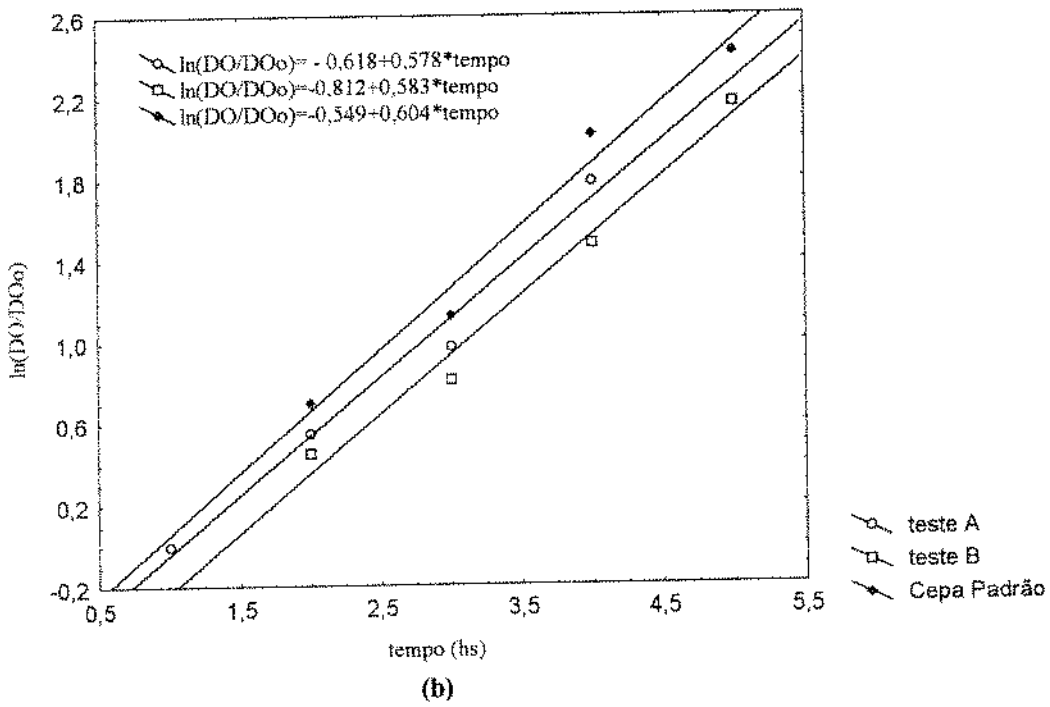
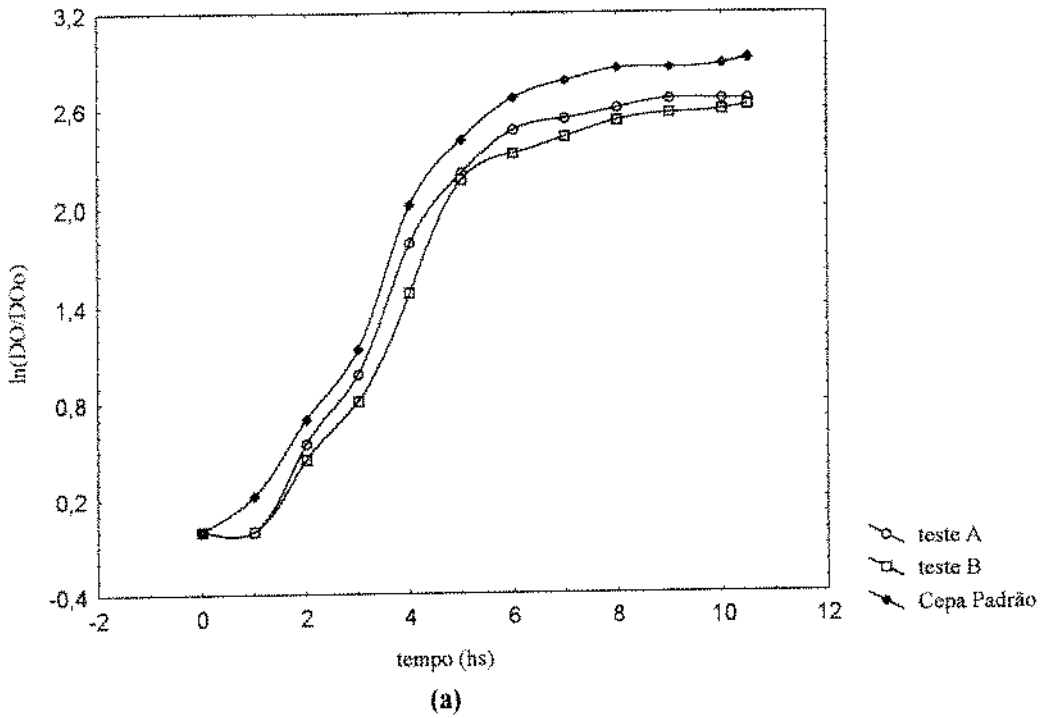
- LODDER, J. The Yeasts. 1 ed. North-Holland Publishing Company. London, 1970. 815 p.
- MEADEN, P. DNA Fingerprinting of Brewers Yeast: Current Perspectives. **Journal of the Institute of Brewing**, 96(4):195-200, 1990.
- MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, 31(3):426-428, 1959.
- PELCZAR, M. J.; REID, R.; CHAN, E. C. S. Microbiologia Vol. 1. McGraw-Hill do Brasil, 1980. 574 p.
- PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG N. R. Microbiologia - Conceitos e Aplicações Vol. 1, 2ª. ed.. Makron Books, 1996.
- PHAFF, H. J.; MILLER, M. W.; MRAK E. M. The Life of Yeasts. Harvard University Press, Cambridge, 1966, 186 p.
- PRIEST, F. G. & BARBOUR, E. A. Numerical Taxonomy of Lactic Acid Bacteria and Some Related Taxa. In: Goodfellow, M.; Jones, D.; Priest, F. G. Computer-assisted Bacterial Systematics. Academic Press, 1985. 443 p.
- QUAIN, D. E. Centenary Review Differentiation of Brewing Yeast. **Journal of the Institute of Brewing**, 92 p.435-438, 1986.
- RODINI, M. A. T. Bactérias contaminantes do Processo de Fermentação de Etanol e sua Sensibilidade Frente à Penicilina e Pentaclorofenol. **STAB -Açúcar, Álcool e Subprodutos**, 8(2):52-54, 1989.
- RODRIGUES, M. I. & ANDRIETTA, M. G. S. Controle da Fermentação Alcoólica Através de Testes Microbiológicos e Bioquímicos. Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos/ UNICAMP, 1995. 54 p. (curso de Extensão).

- RODRIGUES, M. I. Desenvolvimento de Técnicas para o Controle da Fermentação. I Reunião Técnica sobre Fermentação Alcolica - Copersucar, p. 27-60,1989.
- SATO, S.; BRAZZACH, M.L.; AQUARONE, E. Estudo Comparativo de Diversos Desinfetantes Usados na Fermentação Alcolica de Mostos de Melaço de Cana. **Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, 16(1/2):133-144,1980.
- SHEEHAN, C. A.; WEISS, A. S.; NEWSON, I. A.;FLINT, V.;O'DONNELL, D. C. Brewing Yeast Identification and cromossome analisys usyng Hight Resolution Chef Gel Eletrophoresis. **Journal of the Institute of Brewing**, 97(3), p. 163-167, 1991.
- SILVA, M. H. Control de Inversión en el Jugo del Molino. **Sugar y Azucar**, 69(8):41-43, 1974.
- SNEATH, P. H. A. & SOKAL, R. R. Numerical Taxonomy. Freeman San Francisco. Citado por Goodfellow *et alli* (1985), 1973.
- SOARES, E. V.; TEIXEIRA, J. A.; MOTA, M. Influence of Aeration and Glucose Concentration in the Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**. 13 (3), p. 207-212, 1991.
- TAVARES, F. C. A.; ECHEVERRIGARAY, S.; GOMES, L. H.; SOUBIHE, M. Identificação Molecular de Leveduras da Fermentação Alcolica. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**. 5 p. 34-39, 1992.
- TAVARES, F. C. A. Processo de Controle Seletivo de Leveduras Contaminantes. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**. 6 p. 45-49, 1992.

- THORNTON, R. J. & BUNKER, A. Characterization of Wine Yeasts for Genetically Modifiable Properties. **Journal of the Institute of Brewing**, 95(3), p. 181-184, 1989.
- TREDOUX, H. G., KOCK, J.L. F., LATEGAN, P. M., MULLER, H. B. A Rapid Identification Technique to Differentiate Between *Saccharomyces cerevisiae* Strains and Other Yeast Species in the Wine Industry. **American Journal Enology Viticulture**, 38(2), p. 161-164, 1987.
- VAN DER WALT, J. P. The Typological Yeast Species and its Delimitation. In: Rose, A. H. e Harrison, J. S. The Yeasts. London, Academic Press. V. 1, p. 95-121, 1987.
- VAN VURREN, H. J. J. & VAN DER MEER, L. J. Characterization of Brewing Yeast Strains by Numerical Analysis of Total Soluble Cell Protein Patterns. **Journal of the Institute of Brewing**, 94(4), p. 245-248, 1988.
- VAN VURREN, H. J. J. & VAN DER MEER, L. J. Fingerprinting of Yeasts by Protein Eletroforesis. **American Journal Enology Viticulture**, 38(1):49-53, 1987.
- YOKOYA, F. Problemas com Contaminantes na Fermentação Alcoólica. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**. V 1 p. 38-39, 1991.
- WHITING, C. J. Organic Acid Metabolism of Yeasts During Fermentation of Alcoholic Beverages - A Review. **Journal of the Institute of Brewing**, 82(2) 84-92, 1976.

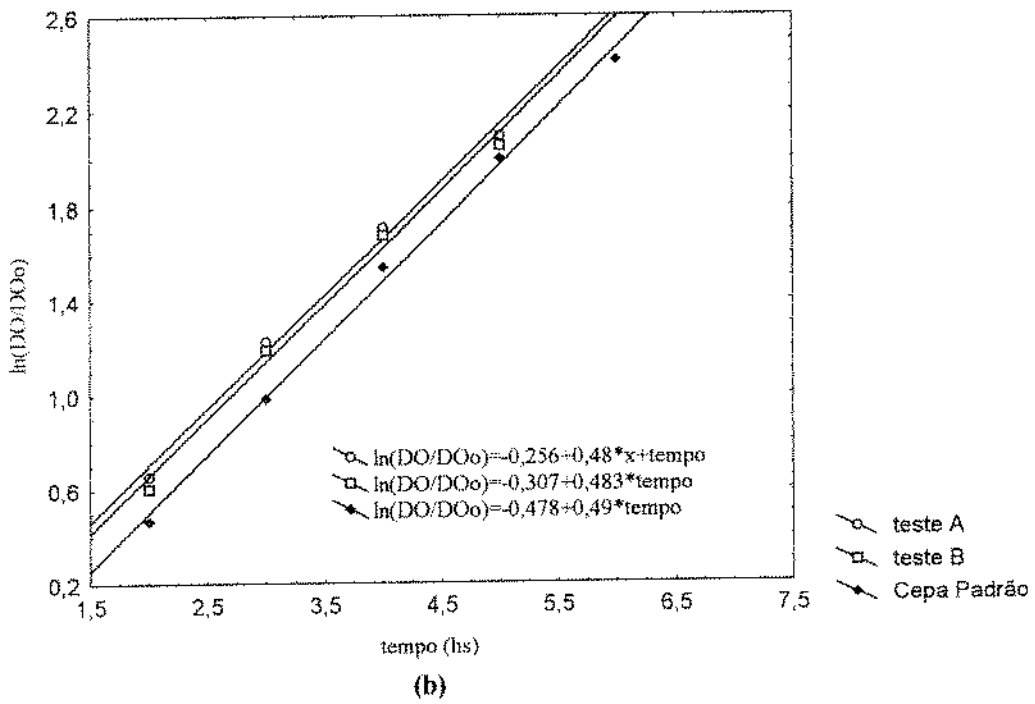
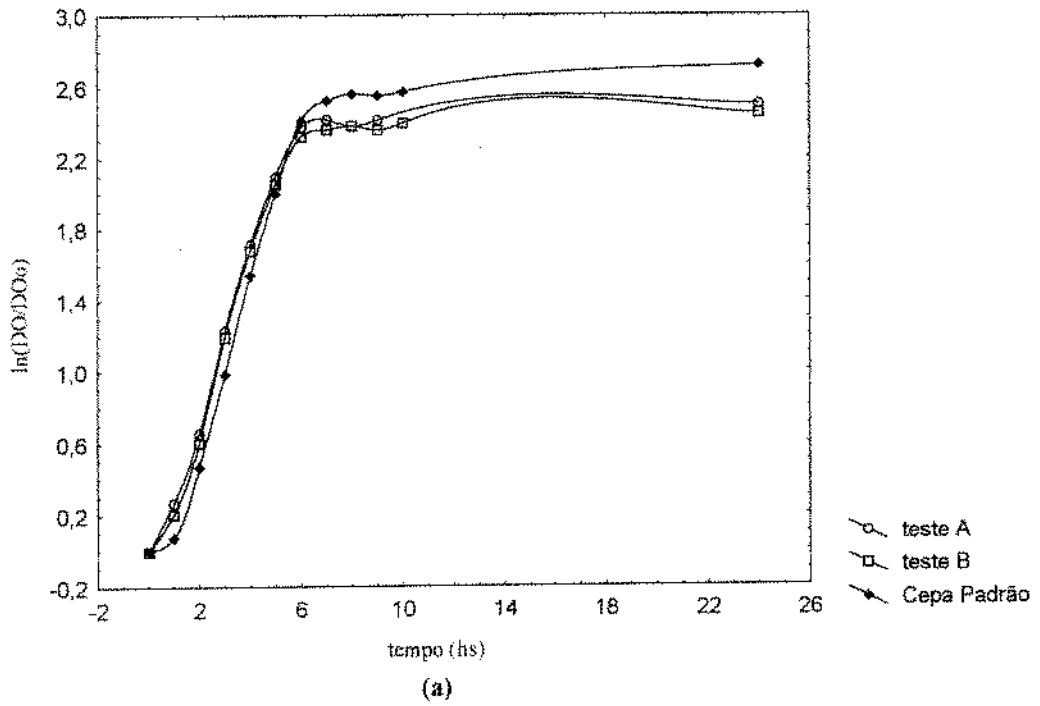
## APÊNDICE A

Resultados das Curvas de Crescimento e das Retas para  
Determinação de  $\mu_{max}$  para as 13 cepas analisadas, a padrão,  
e *C. tropicalis* e *S. bayanus*

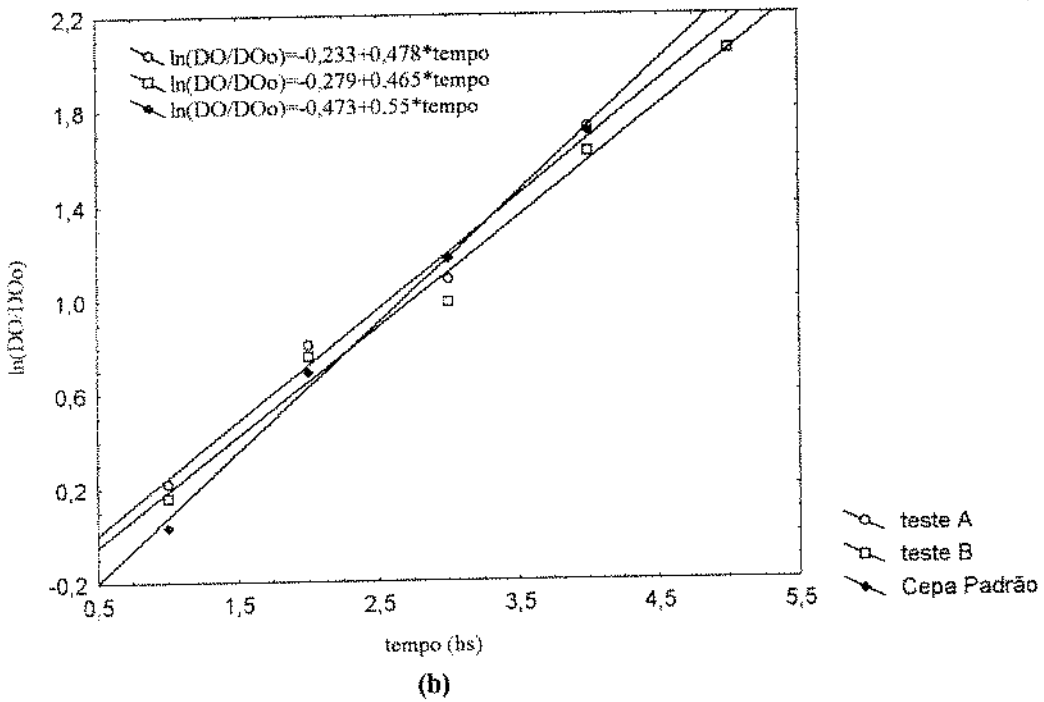
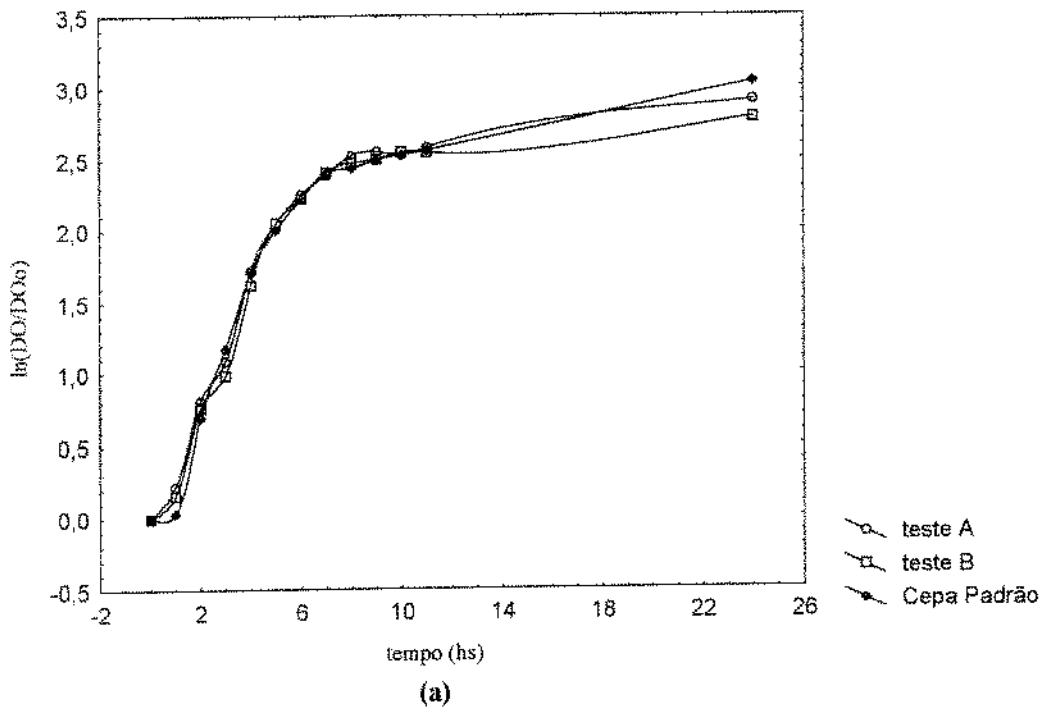


**Figura A-1:** (a) Curva de Crescimento para a cepa I-teste A, cepa I-teste B e cepa Padrão. Fermentações conduzidas a 200 rpm e 32°C.  
 (b) Regressão linear da fase exponencial da curva de crescimento para a cepa I e Padrão.

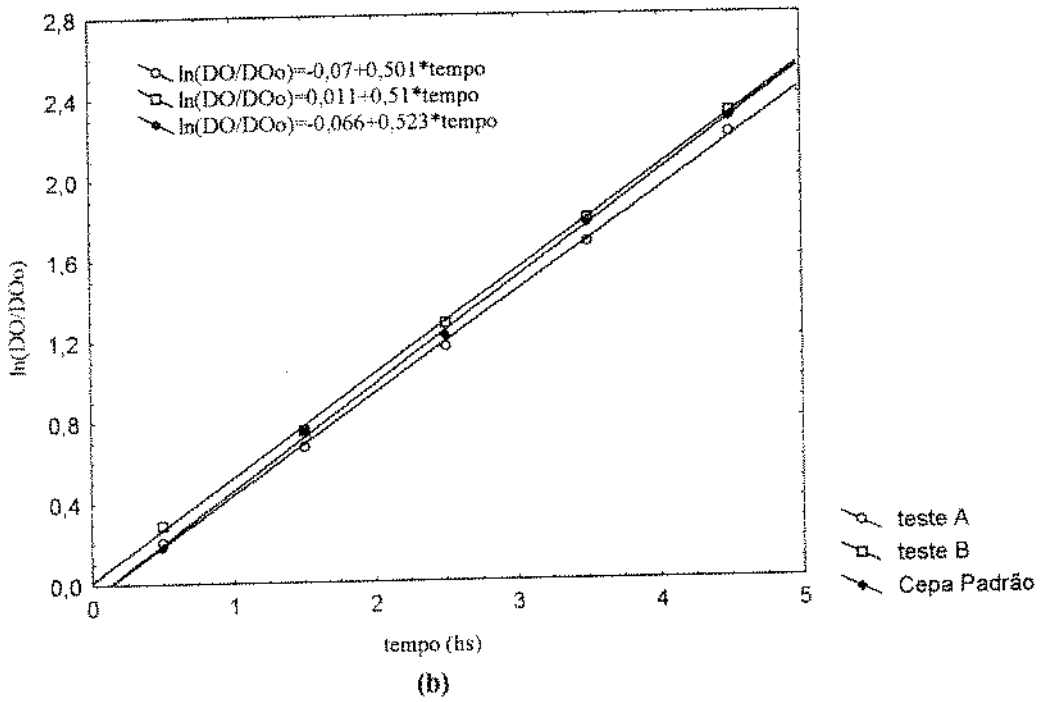
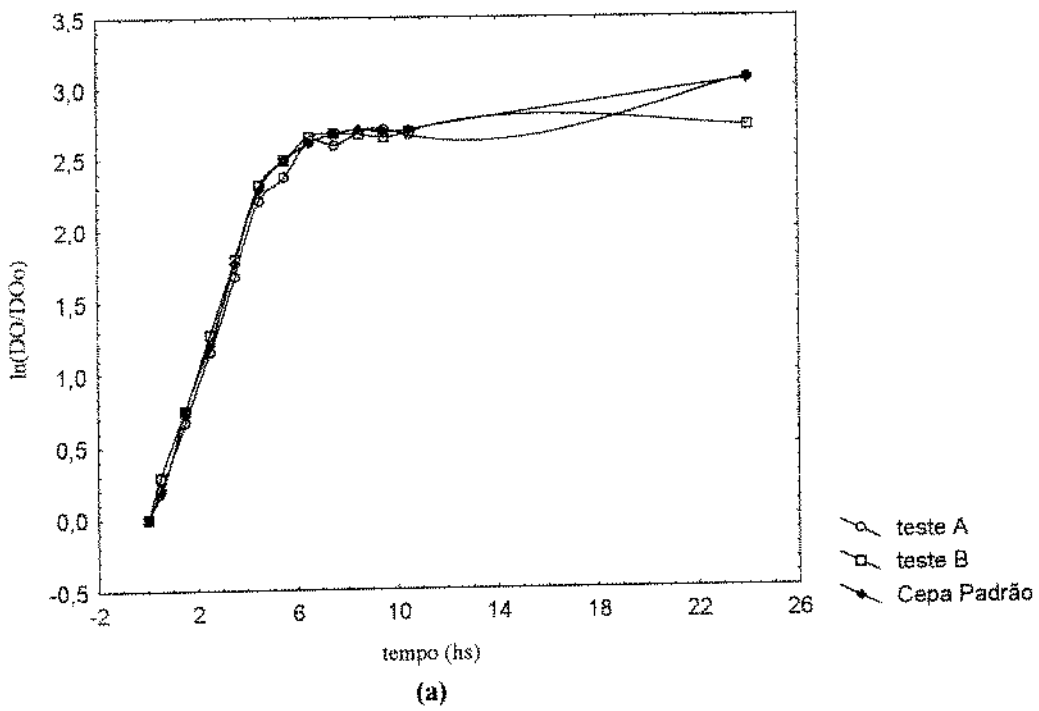




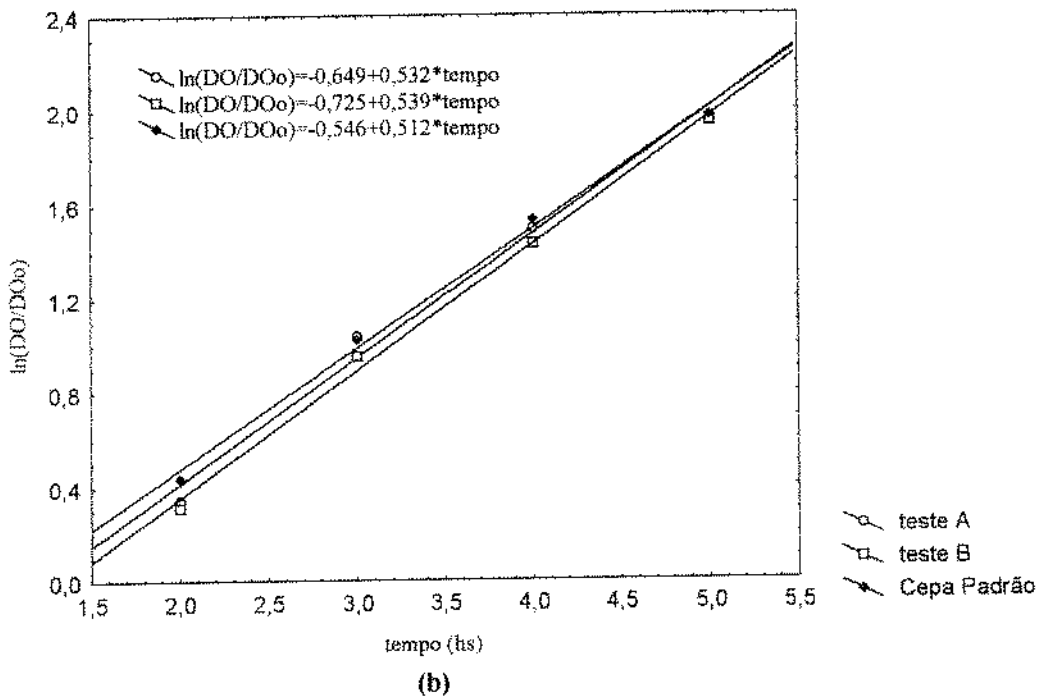
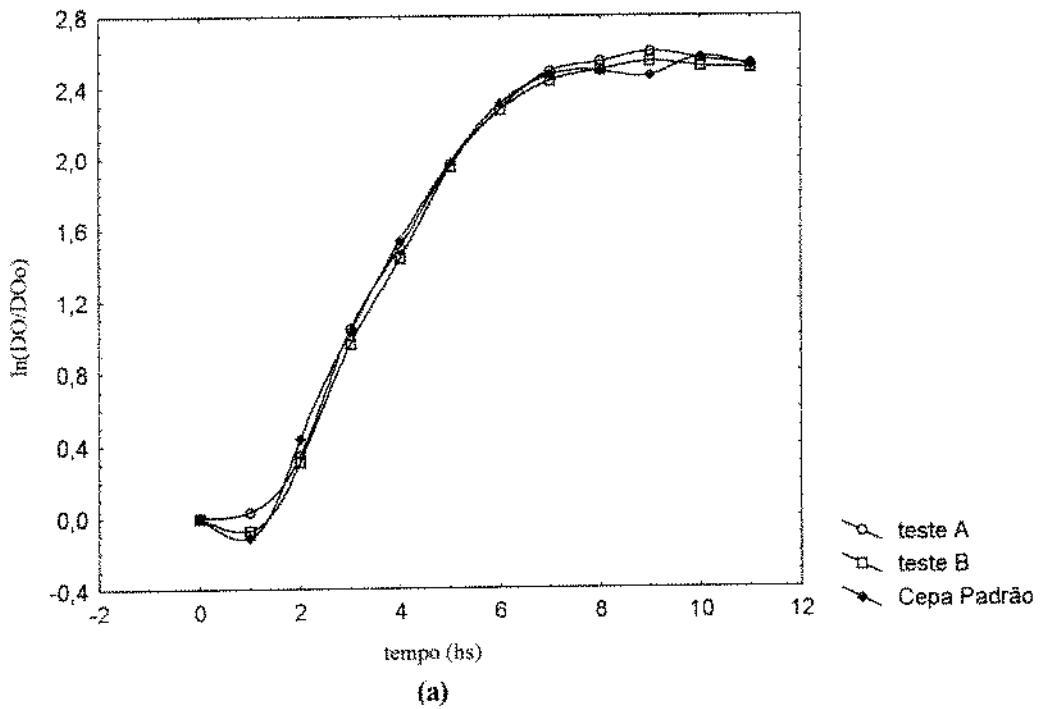
**Figura A-2:** (a) Curva de Crescimento para a cepa 2-teste A, cepa 2-teste B e cepa Padrão. Fermentações conduzidas a 200 rpm e 32°C.  
 (b) Regressão linear da fase exponencial da curva de crescimento para a cepa 2 e Padrão.



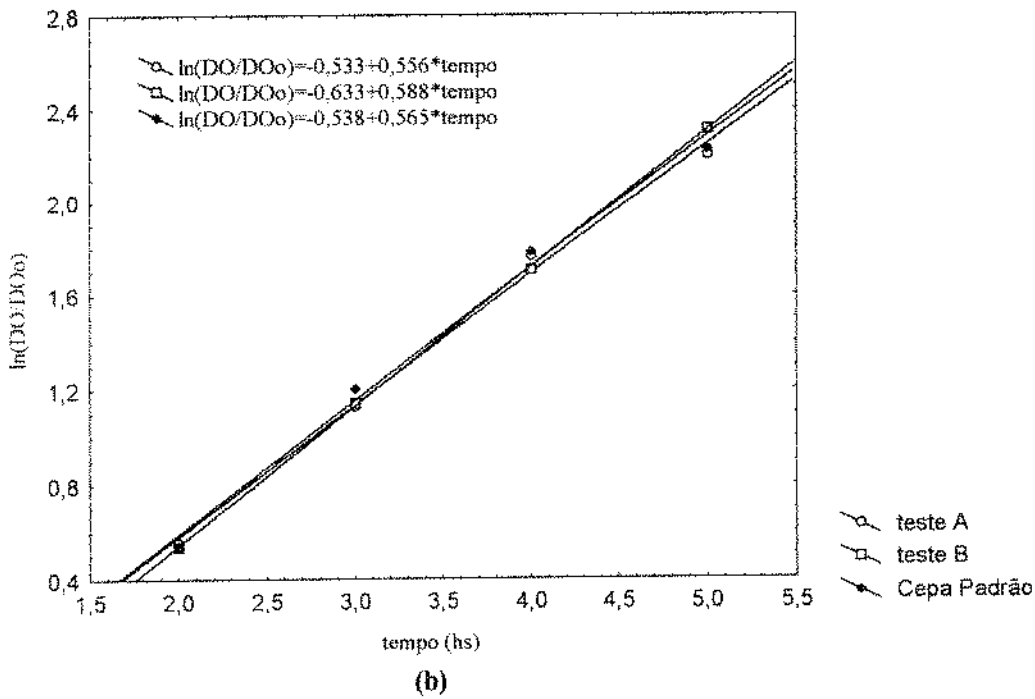
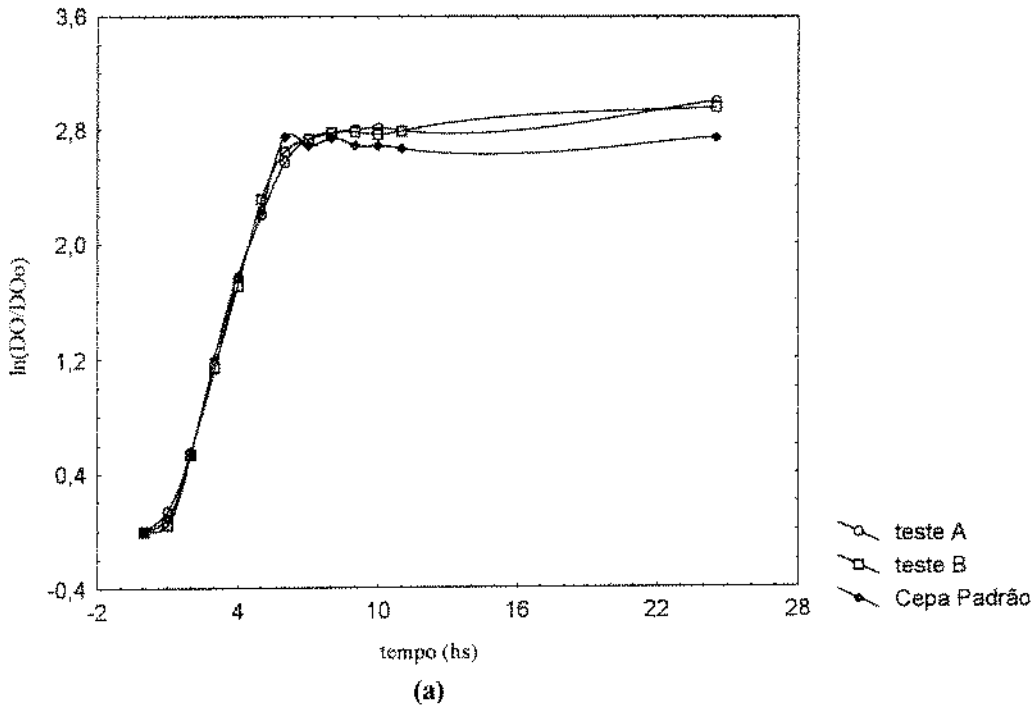
**Figura A-3.**(a) Curva de Crescimento para a cepa 3-teste A, cepa 3-teste B e cepa Padrão. Fermentações conduzidas a 200 rpm e 32°C.  
 (b) Regressão linear da fase exponencial da curva de crescimento para a cepa 3 e Padrão.



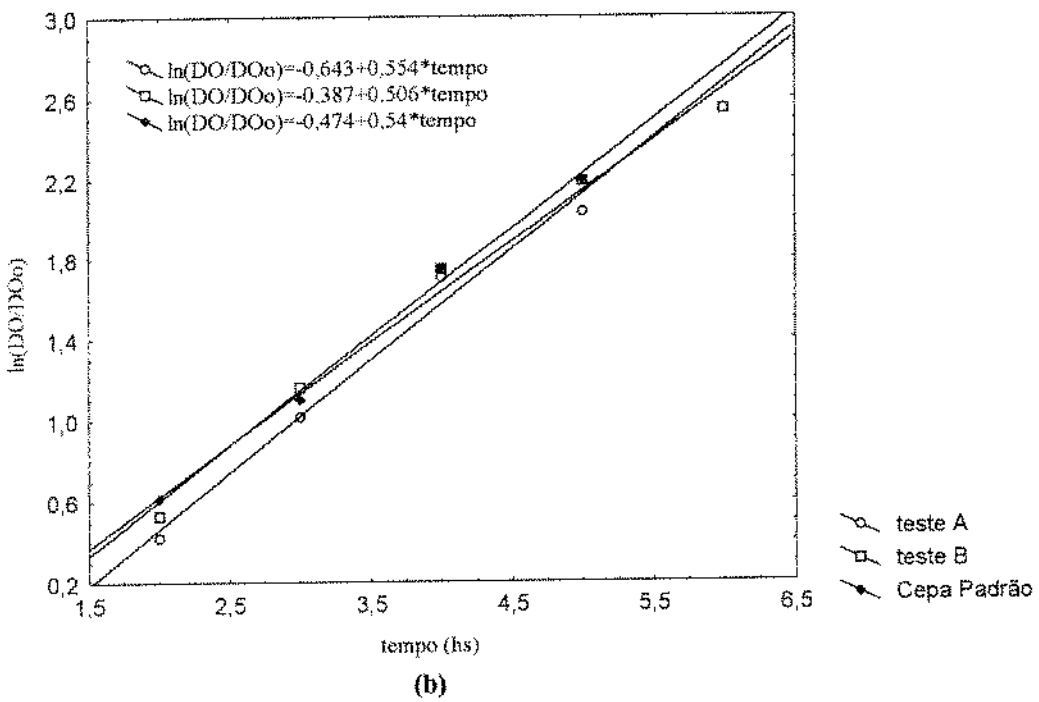
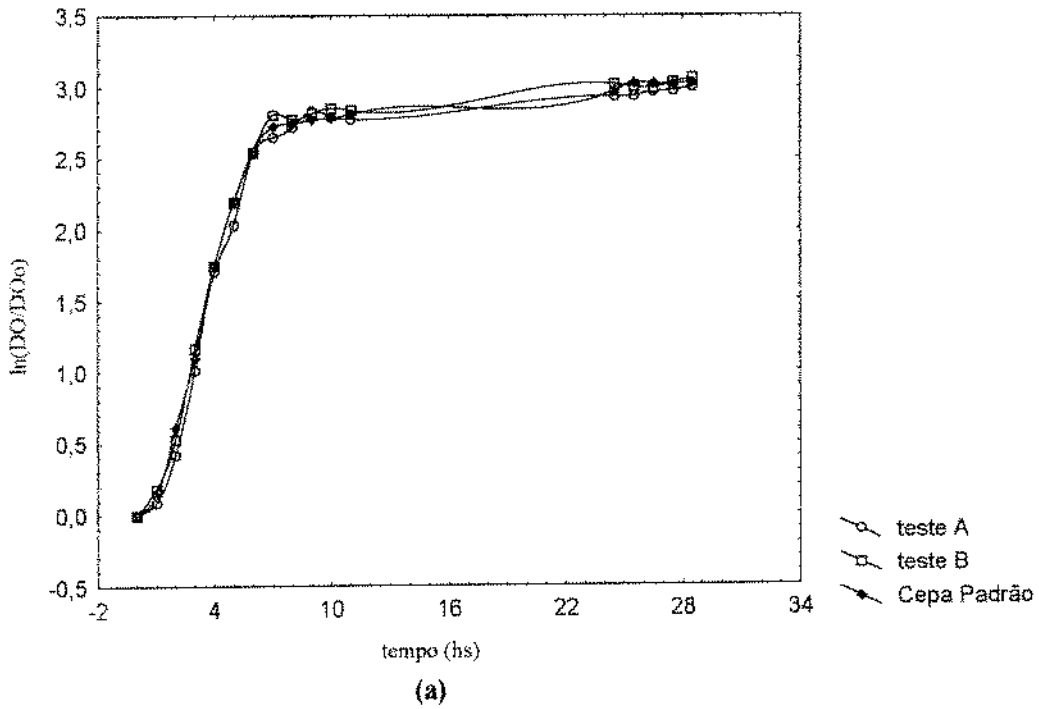
**Figura A-4:**(a) Curva de Crescimento para a cepa 4-teste A, cepa 4-teste B e cepa Padrão. Fermentações conduzidas a 200 rpm e 32°C.  
 (b) Regressão linear da fase exponencial da curva de crescimento para a cepa 4 e Padrão.



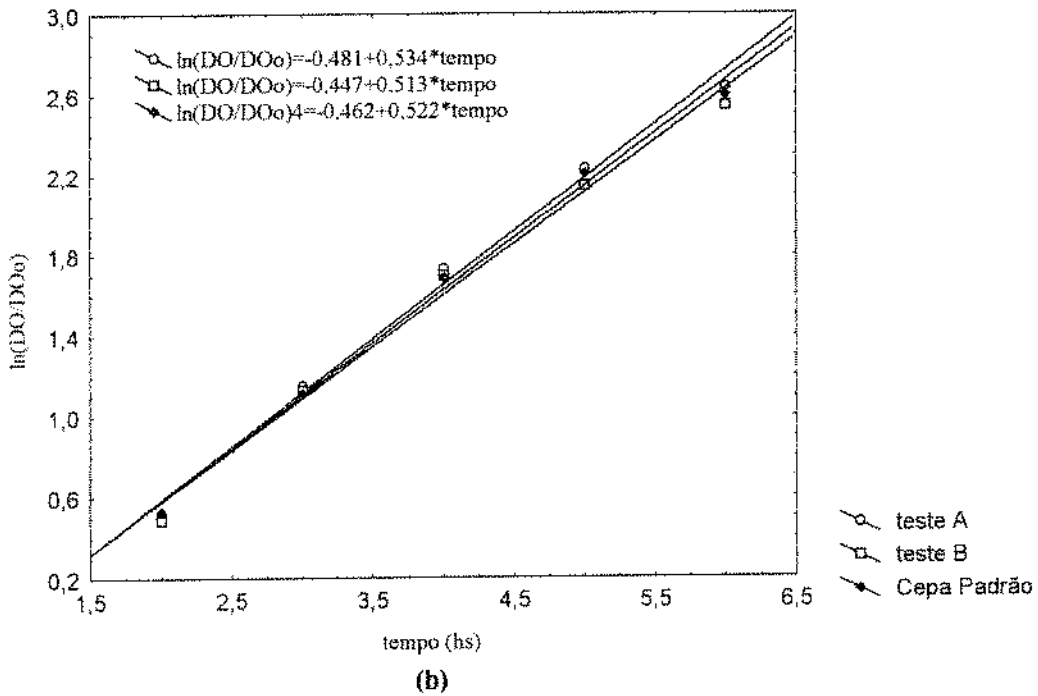
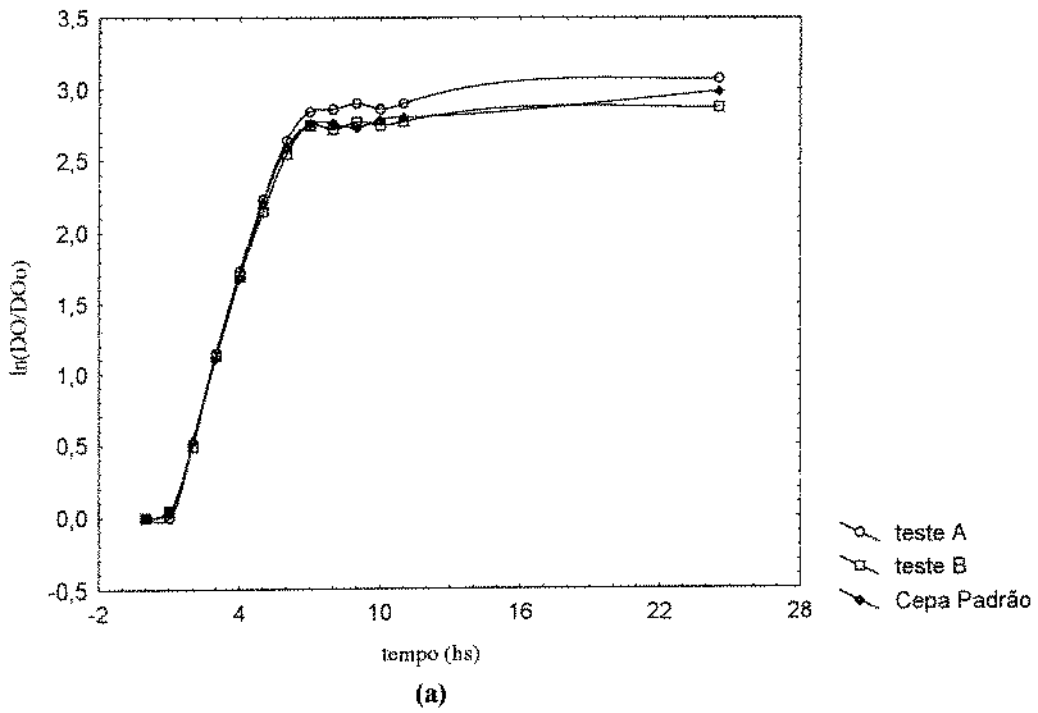
**Figura A-5:** (a) Curva de Crescimento para a cepa 5-teste A, cepa 5-teste B e cepa Padrão. Fermentações conduzidas a 200 rpm e 32°C.  
 (b) Regressão linear da fase exponencial da curva de crescimento para a cepa 5 e Padrão.



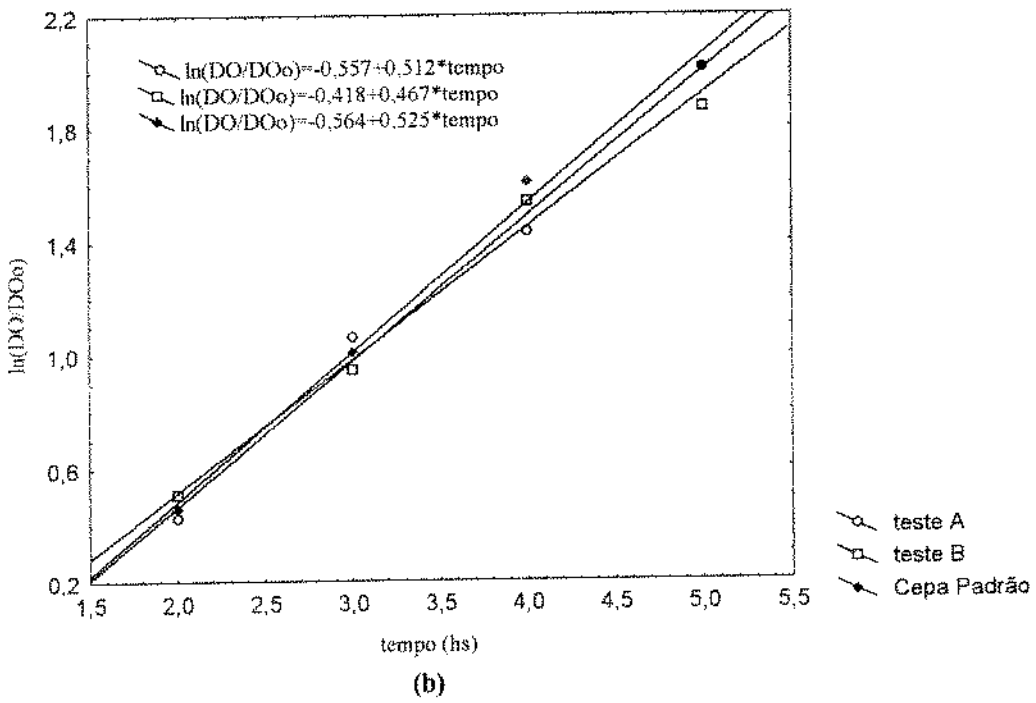
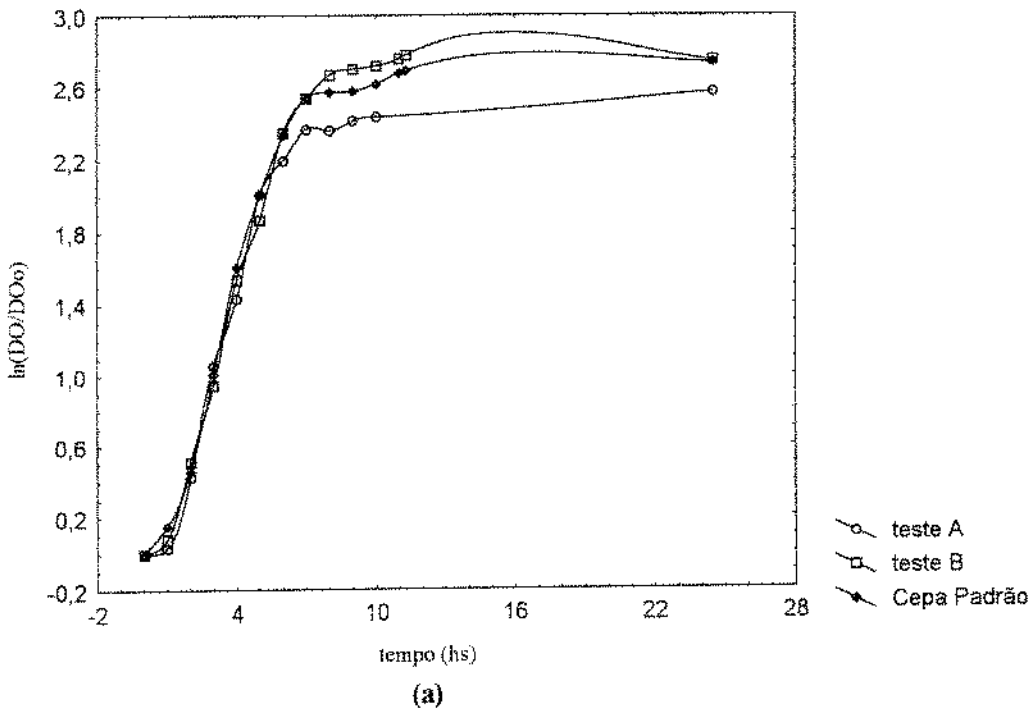
**Figura A-6:** (a) Curva de Crescimento para a cepa 6-teste A, cepa 6-teste B e cepa Padrão. Fermentações conduzidas a 200 rpm e 32°C.  
 (b) Regressão linear da fase exponencial da curva de crescimento para a cepa 6 e Padrão.



**Figura A-7:** (a) Curva de Crescimento para a cepa 7-teste A, cepa 7-teste B e cepa Padrão. Fermentações conduzidas a 200 rpm e 32°C.  
 (b) Regressão linear da fase exponencial da curva de crescimento para a cepa 7 e Padrão.

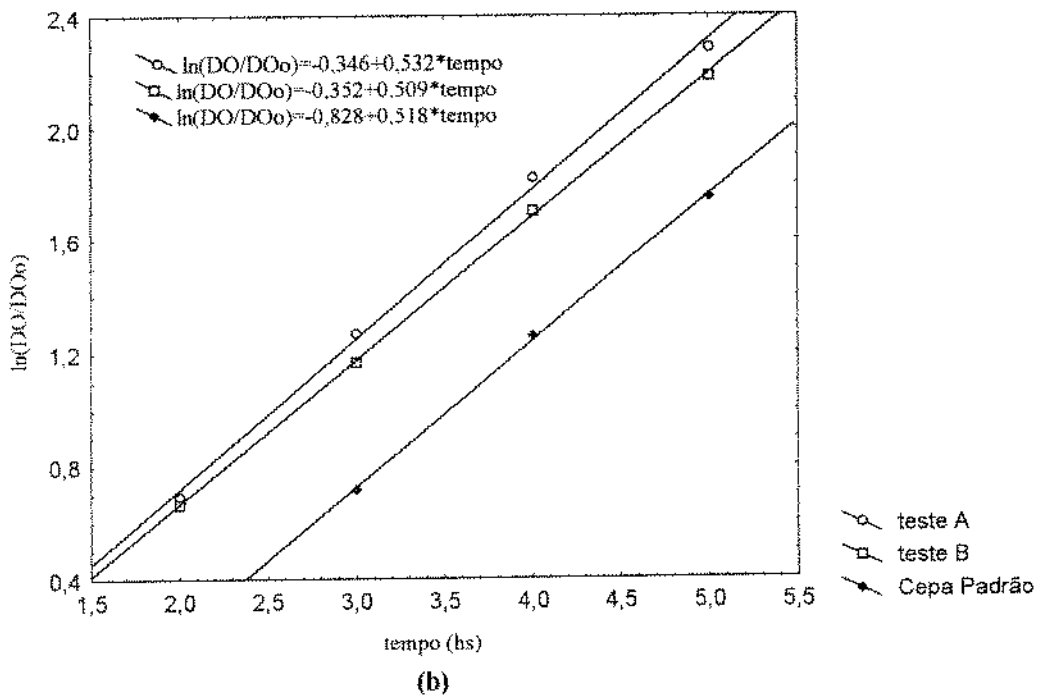
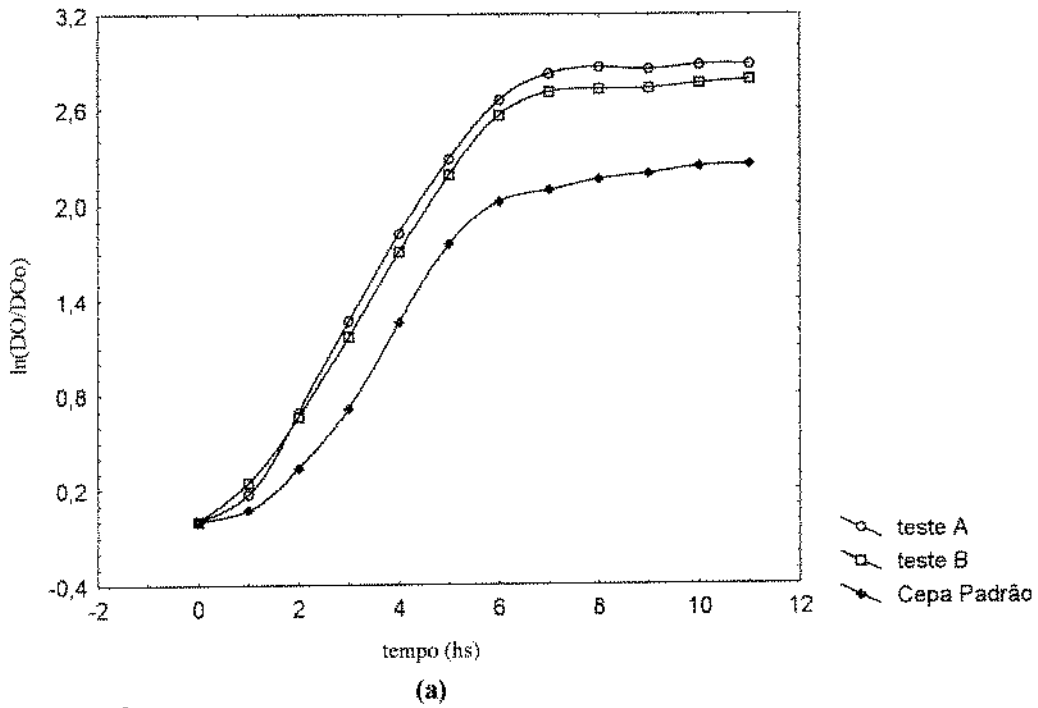


**Figura A-8:** (a) Curva de Crescimento para a cepa 8-teste A, cepa 8-teste B e cepa Padrão. Fermentações conduzidas a 200 rpm e 32°C. (b) Regressão linear da fase exponencial da curva de crescimento para a cepa 8 e Padrão.

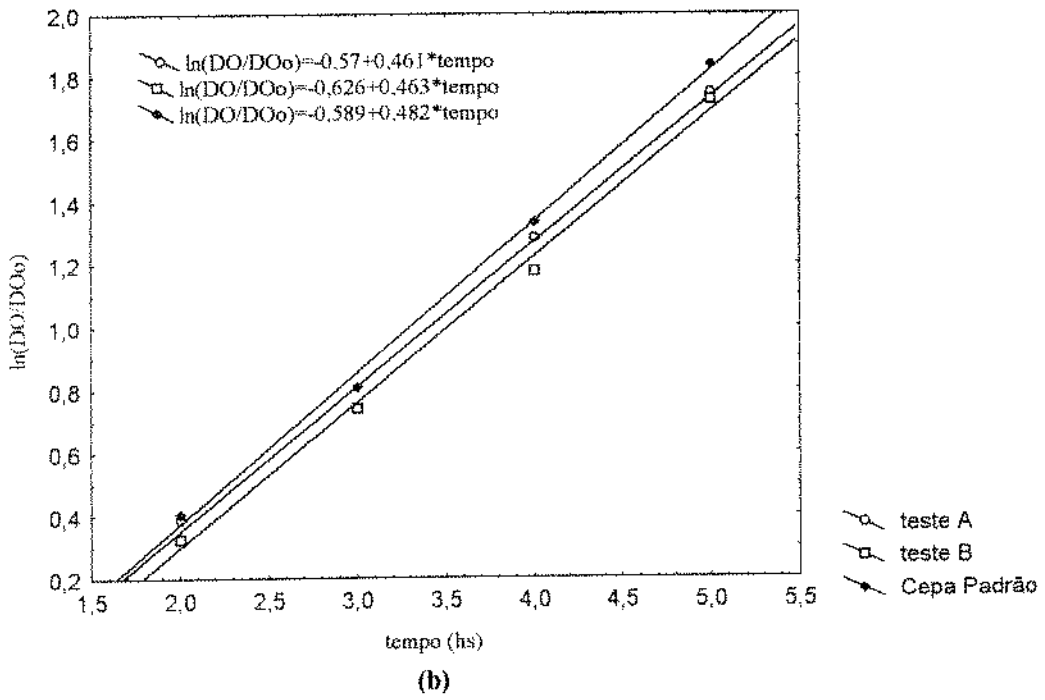
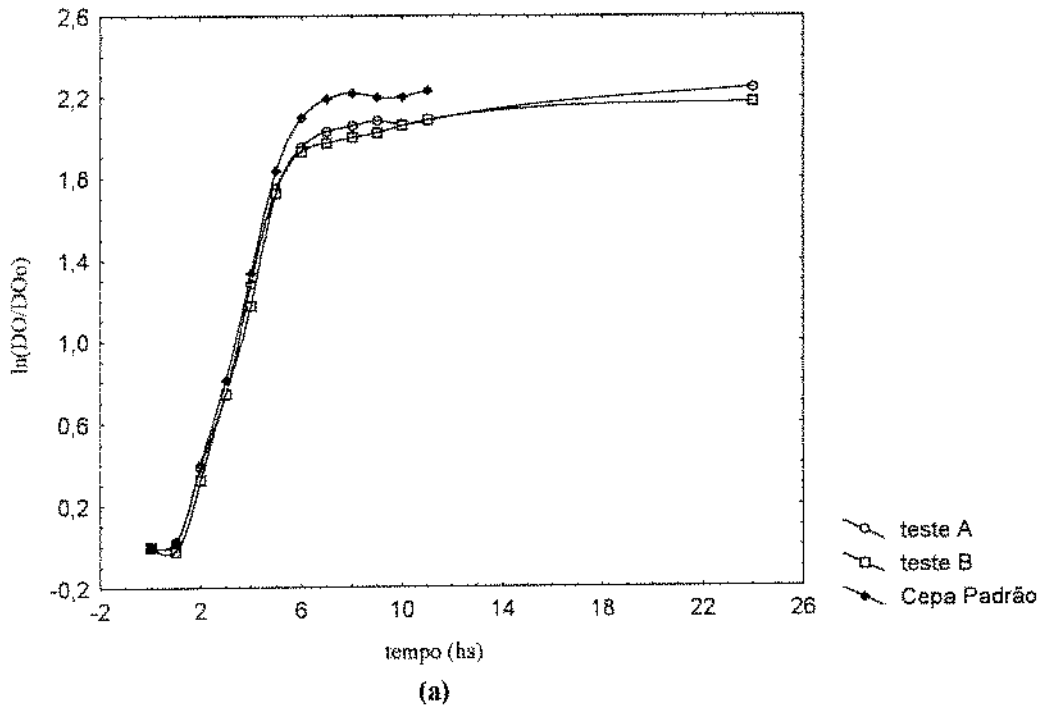


**Figura A-9:** (a) Curva de Crescimento para a cepa 9-teste A, cepa 9-teste B e cepa Padrão. Fermentações conduzidas a 200 rpm e 32°C.  
 (b) Regressão linear da fase exponencial da curva de crescimento para a cepa 9 e Padrão.

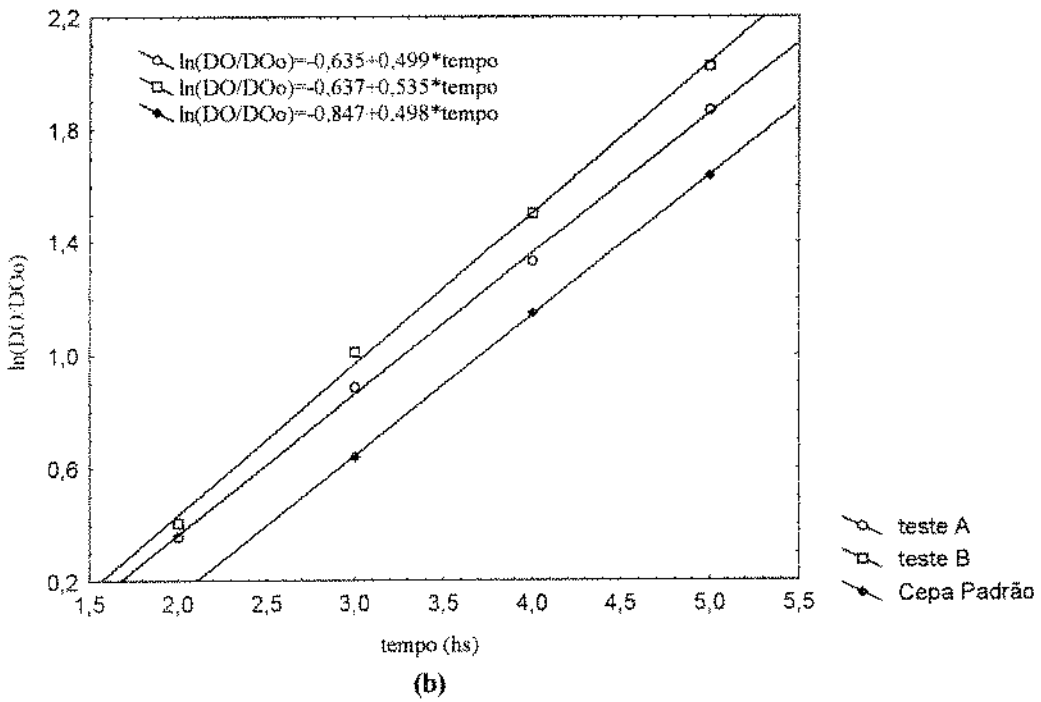
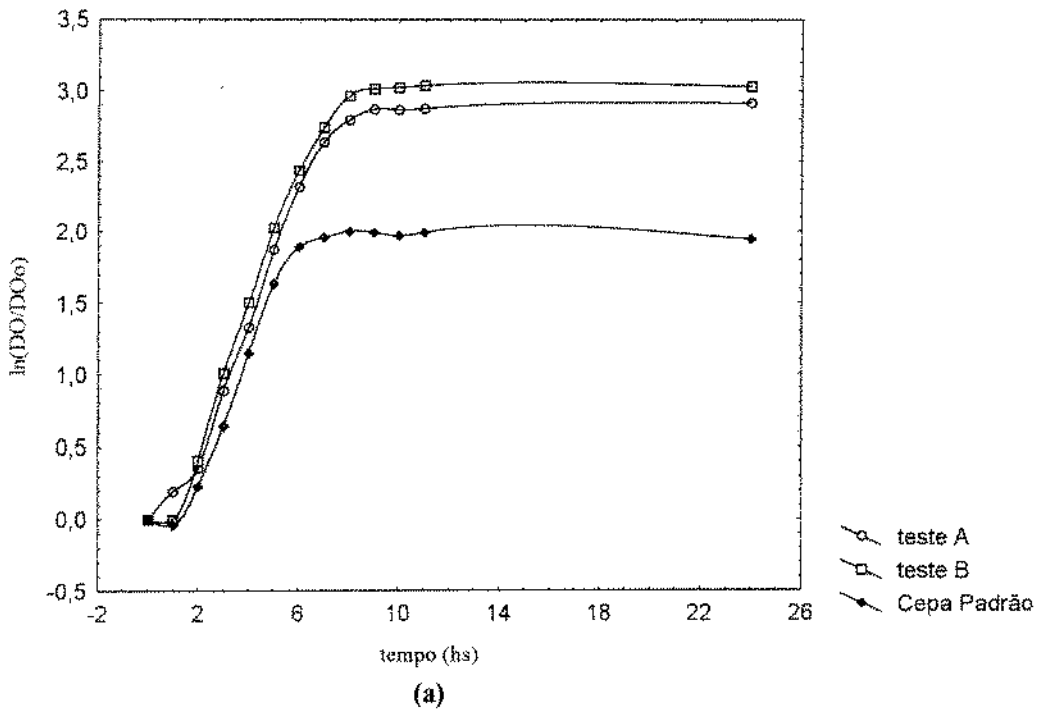




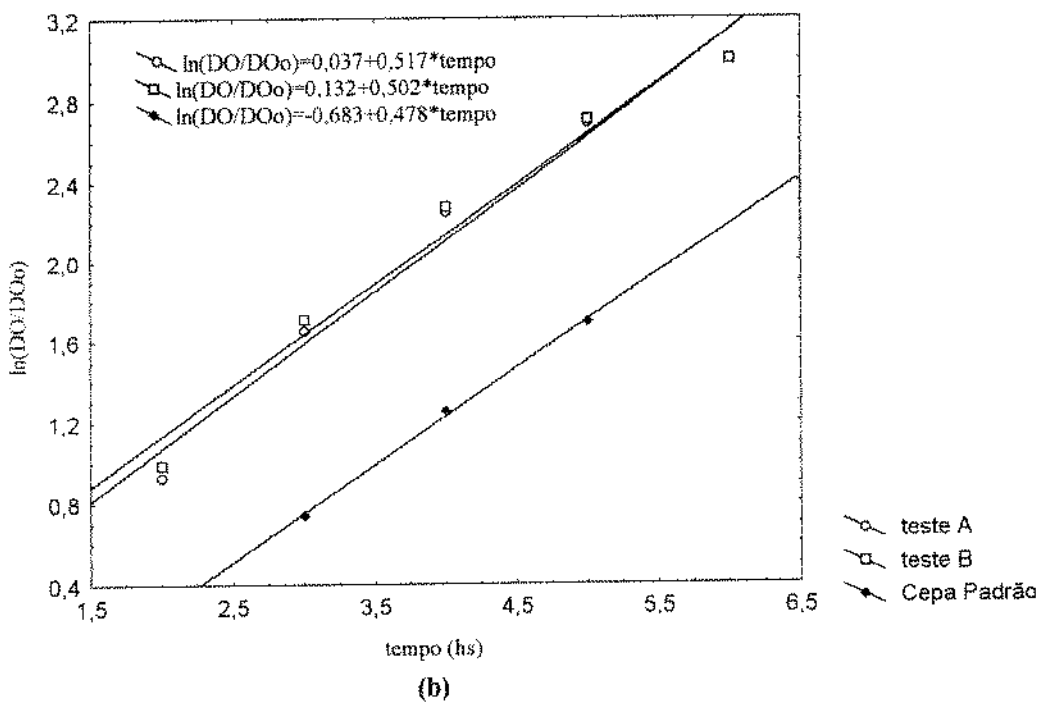
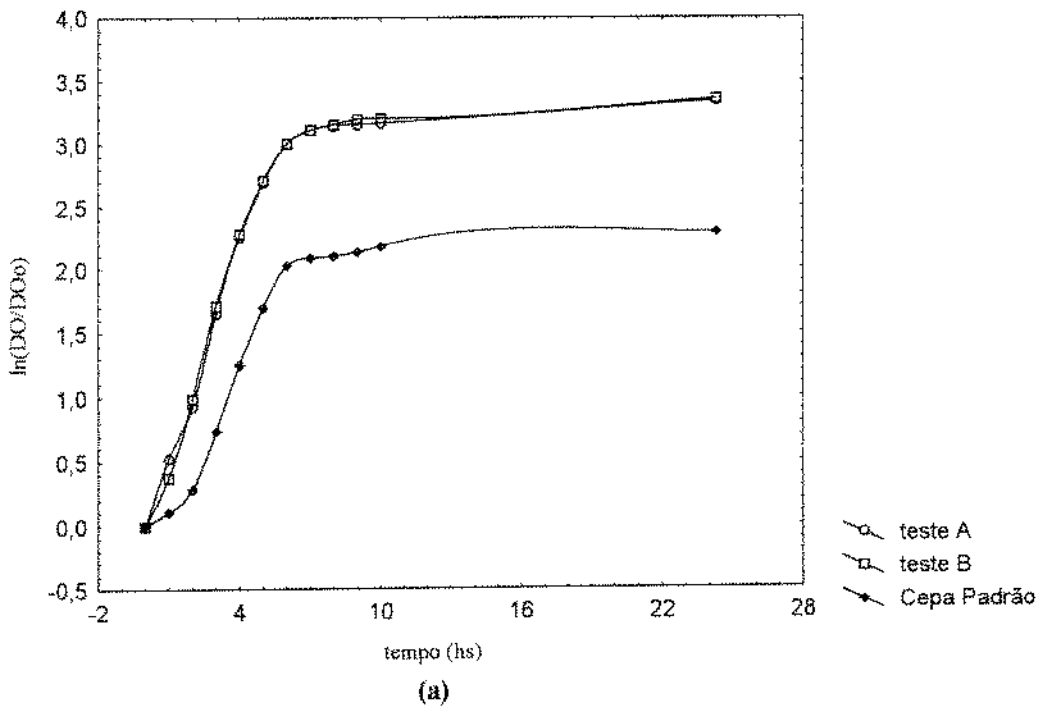
**Figura A-10:** (a) Curva de Crescimento para a cepa 10-teste A, cepa 10-teste B e cepa Padrão. Fermentações conduzidas a 200 rpm e 32°C. (b) Regressão linear da fase exponencial da curva de crescimento para a cepa 10 e Padrão.



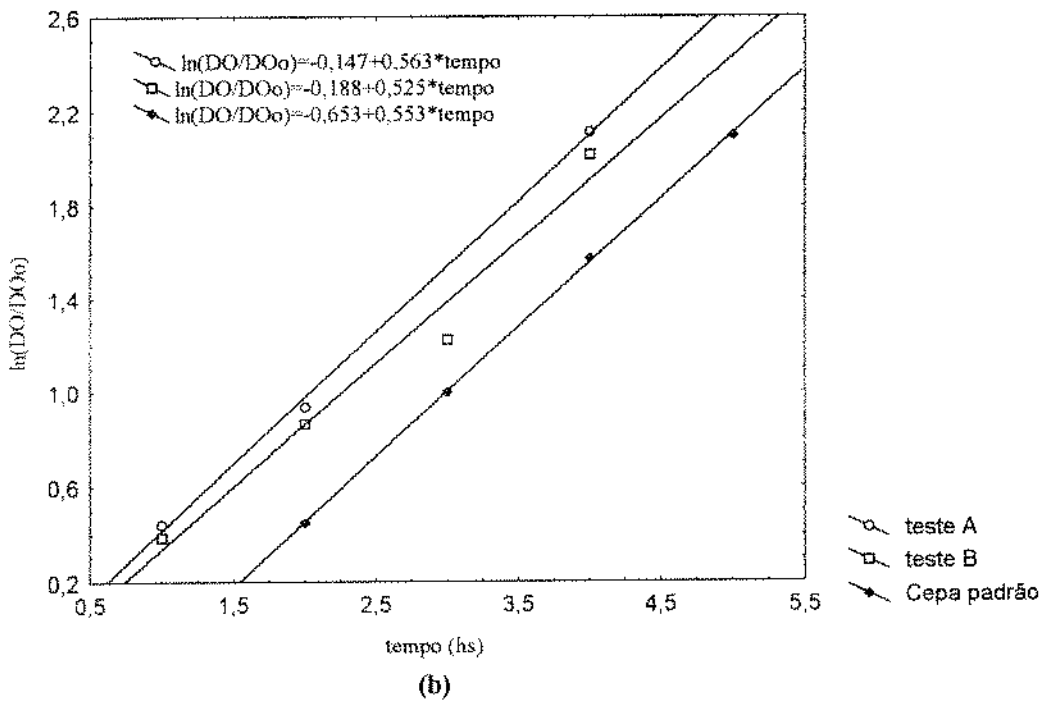
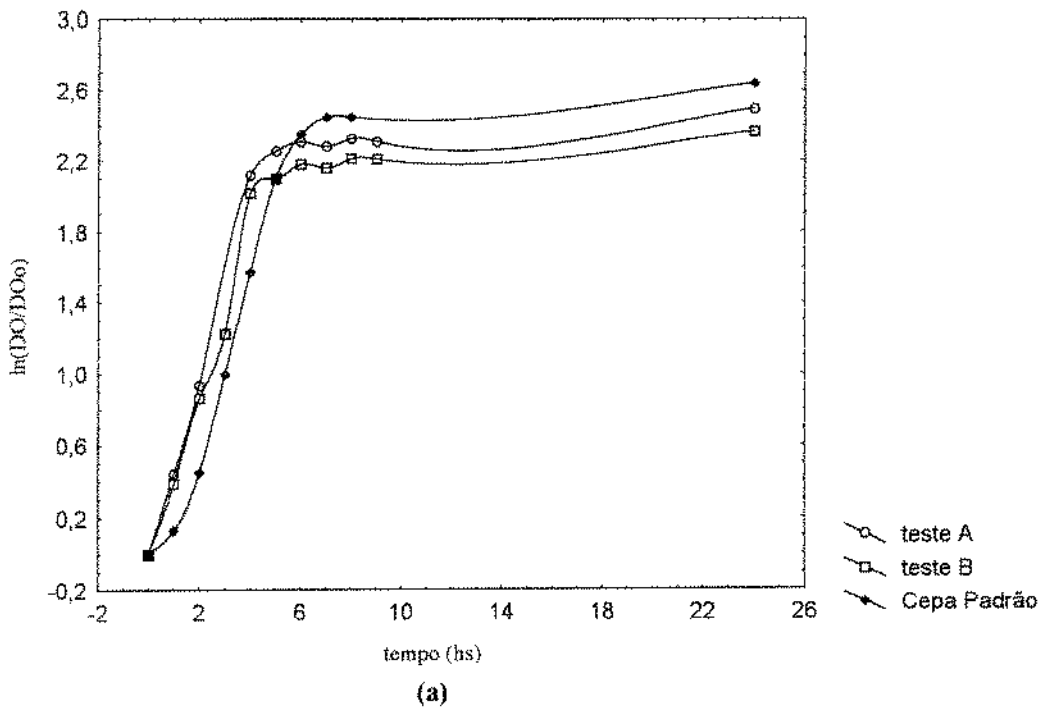
**Figura A-11:**(a) Curva de Crescimento para a cepta 11-teste A, cepta 11-teste B e cepta Padrão. Fermentações conduzidas a 200 rpm e 32°C.  
 (b) Regressão linear da fase exponencial da curva de crescimento para a cepta 11 e Padrão.



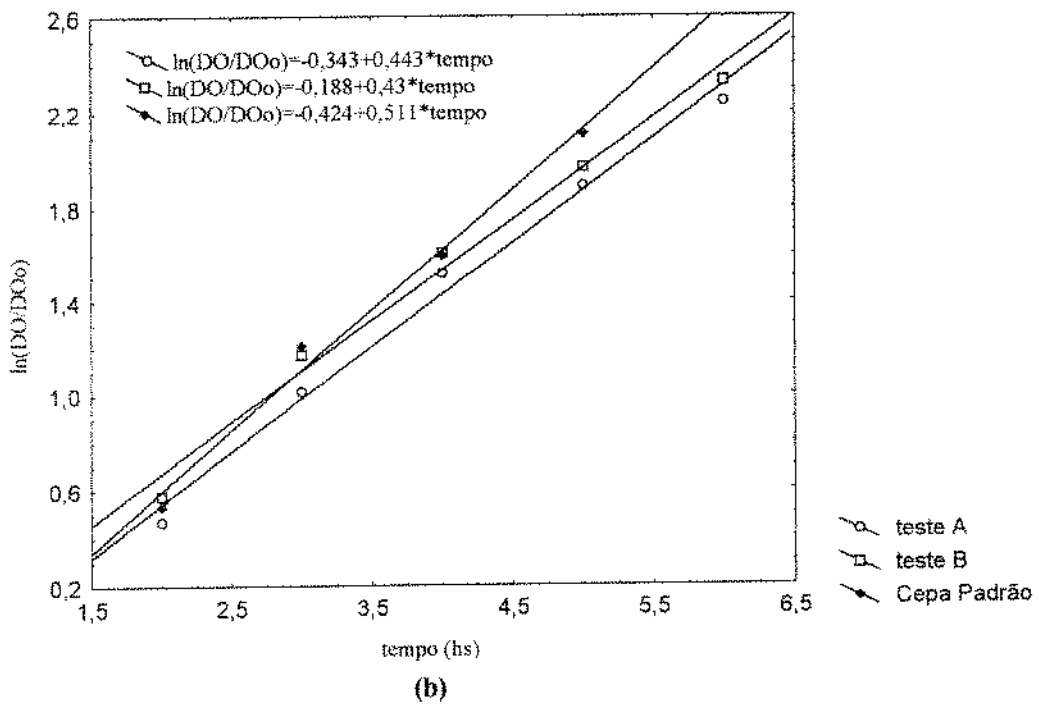
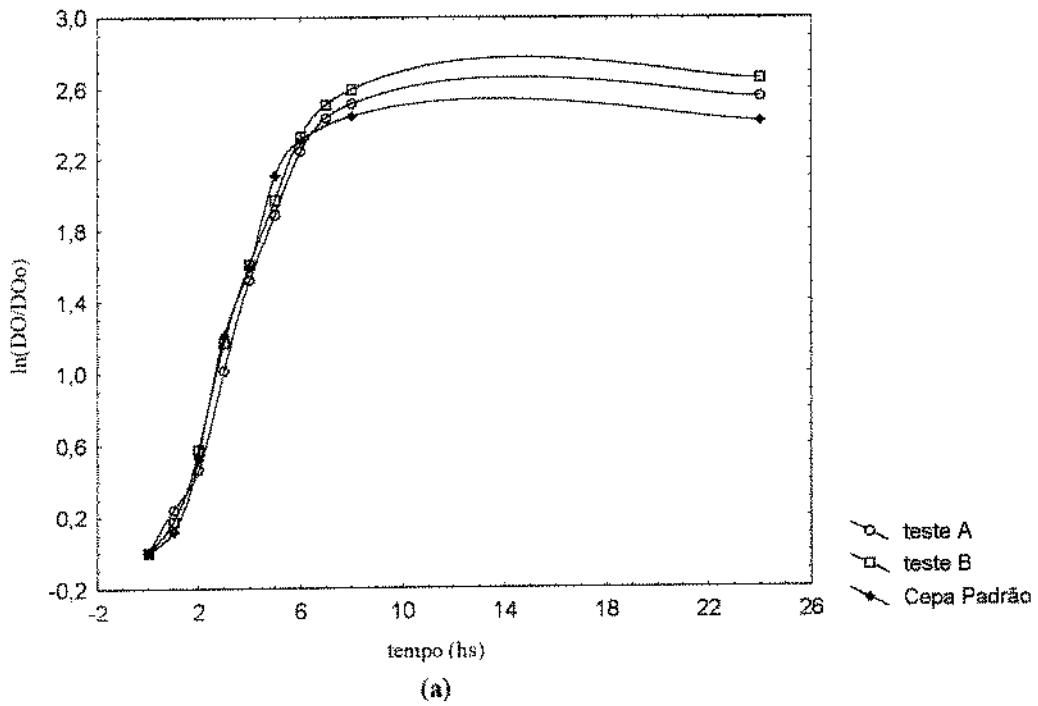
**Figura A-12:** (a) Curva de Crescimento para a cepa 12-teste A, cepa 12-teste B e cepa Padrão. Fermentações conduzidas a 200 rpm e 32°C.  
 (b) Regressão linear da fase exponencial da curva de crescimento para a cepa 12 e Padrão.



**Figura A-13:**(a) Curva de Crescimento para a cepa 13-teste A, cepa 13-teste B e cepa Padrão. Fermentações conduzidas a 200 rpm e 32°C.  
 (b) Regressão linear da fase exponencial da curva de crescimento para a cepa 13 e Padrão.



**Figura A-14:** (a) Curva de Crescimento para a cepa *C. tropicalis*-teste A, cepa *C. tropicalis*-teste B e cepa Padrão. Fermentações conduzidas a 200 rpm e 32°C. (b) Regressão linear da fase exponencial da curva de crescimento para a cepa *C. tropicalis* e Padrão.



**Figura A-15:** (a) Curva de Crescimento para a cepa *S. bayanus*-teste A, cepa *S. bayanus*-teste B e cepa Padrão. Fermentações conduzidas a 200 rpm e 32°C. (b) Regressão linear da fase exponencial da curva de crescimento para a cepa *S. bayanus* e Padrão.

## **APÊNDICE B**

Tabelas dos Resultados dos Testes da Fermentação das 13  
cepas analisadas e padrão

**Tabela B-1:** Determinação dos Açúcares Redutores Totais Residuais

$$\text{ART} = (2,3253 * \text{ABS.} + 0,03302) * \text{diluição}$$

Cepa	Absorbância	diluição	ART(g/l)	ARTmédio(g/l)	Desvio Padrão
1 - a	0,398	22	21,09	<b>20,78</b>	0,1884
	0,386	22	20,47		
1 - b	0,418	22	22,11	<b>22,31</b>	0,0837
	0,426	22	22,52		
Padrão	0,541	20	25,82	<b>25,63</b>	0,0692
	0,533	20	25,45		
2 - a	0,641	11	16,76	<b>16,84</b>	0,0118
	0,647	11	16,91		
2 - b	0,678	11	17,71	<b>17,91</b>	0,0837
	0,694	11	18,11		
Padrão	0,355	22	18,89	<b>18,94</b>	0,0052
	0,357	22	18,99		
3 - a	0,497	22	26,15	<b>26,05</b>	0,0209
	0,493	22	25,95		
3 - b	0,504	22	26,51	<b>26,48</b>	0,0013
	0,503	22	26,46		
Padrão	0,797	11	20,75	<b>21,00</b>	0,1309
	0,817	11	21,26		
4 - a	0,756	11	19,70	<b>19,39</b>	0,1884
	0,732	11	19,09		
4 - b	0,337	22	17,97	<b>18,09</b>	0,0327
	0,342	22	18,22		
Padrão	0,430	22	22,72	<b>22,31</b>	0,3350
	0,414	22	21,91		
5 - a	0,578	22	30,29	<b>30,63</b>	0,2211
	0,591	22	30,96		
5 - b	0,567	22	29,73	<b>30,06</b>	0,2211
	0,580	22	30,40		
Padrão	0,616	22	32,24	<b>31,60</b>	0,8178
	0,591	22	30,96		
6 - a	0,463	22	24,41	<b>24,31</b>	0,0209
	0,459	22	24,21		
6 - b	0,379	22	20,11	<b>20,40</b>	0,1583
	0,390	22	20,68		
Padrão	0,415	22	21,96	<b>22,47</b>	0,5234
	0,435	22	22,98		
7 - a	0,390	22	20,68	<b>21,06</b>	0,2944
	0,405	22	21,44		
7 - b	0,406	22	21,50	<b>20,17</b>	3,5382
	0,354	22	18,84		
Padrão	0,436	22	23,03	<b>23,36</b>	0,2211
	0,449	22	23,70		



Tabela B-1 - Continuação

8 - a	0,024	22	1,95	<b>2,01</b>	0,0052
	0,026	22	2,06		
8 - b	0,017	22	1,60	<b>1,67</b>	0,0118
	0,02	22	1,75		
Padrão	0,071	22	4,36	<b>4,38</b>	0,0013
	0,072	22	4,41		
9 - a	0,033	22	2,41	<b>2,44</b>	0,0013
	0,034	22	2,47		
9 - b	0,028	22	2,16	<b>2,11</b>	0,0052
	0,026	22	2,06		
Padrão	0,072	22	4,41	<b>4,38</b>	0,0013
	0,071	22	4,36		
10 - a	0,028	22	2,16	<b>2,18</b>	0,0013
	0,029	22	2,21		
10 - b	0,03	22	2,26	<b>2,24</b>	0,0013
	0,029	22	2,21		
Padrão	0,071	22	4,36	<b>4,38</b>	0,0013
	0,072	22	4,41		
11 - a	0,589	22	30,86	<b>30,73</b>	0,0327
	0,584	22	30,60		
11 - b	0,551	22	28,91	<b>28,17</b>	1,1005
	0,522	22	27,43		
Padrão	0,506	22	26,61	<b>27,74</b>	2,5333
	0,55	22	28,86		
12 - a	0,025	22	2,01	<b>2,01</b>	0
	0,025	22	2,01		
12 - b	0,027	22	2,11	<b>2,16</b>	0,0052
	0,029	22	2,21		
Padrão	0,071	22	4,36	<b>4,38</b>	0,0013
	0,072	22	4,41		
13 - a	0,328	22	17,51	<b>17,33</b>	0,0641
	0,321	22	17,15		
13 - b	0,336	22	17,92	<b>18,66</b>	1,1005
	0,365	22	19,40		
Padrão	0,799	11	20,80	<b>20,51</b>	0,1731
	0,776	11	20,21		

**Tabela B-2:** Determinação da Acidez produzida

$$\text{Acidez sulfúrica(g/l)} = (V_{\text{amostra}} - V_{\text{branco}}) * (\text{Eq. H}_2\text{SO}_4 / \text{Eq. NaOH})$$

$$\text{Eq. H}_2\text{SO}_4 / \text{Eq. NaOH} = (98/2) / 40 = 1,225$$

$$V_{\text{branco}} = 0,1 \text{ ml}$$

Cepa	Vamostra (ml)	Acidez (g/l)	Média Acidez(g/l)	<i>desvio da media</i>	<i>desvio padrao</i>
1 - a	2,50	2,94	<b>2,91</b>	0,0306	0,0019
	2,45	2,88			
1 - b	2,45	2,88	<b>2,85</b>	0,0306	0,0019
	2,40	2,82			
Padrão	2,30	2,70	<b>2,73</b>	0,0306	0,0019
	2,35	2,76			
2 - a	2,55	3,00	<b>3,00</b>	0	0
	2,55	3,00			
2 - b	2,65	3,12	<b>3,06</b>	0,0613	0,0075
	2,55	3,00			
Padrão	2,65	3,12	<b>3,09</b>	0,0306	0,0019
	2,60	3,06			
3 - a	2,35	2,76	<b>2,82</b>	0,0613	0,0075
	2,45	2,88			
3 - b	2,65	3,12	<b>3,03</b>	0,0919	0,0169
	2,50	2,94			
Padrão	2,55	3,00	<b>2,94</b>	0,0612	0,0075
	2,45	2,88			
4 - a	2,30	2,70	<b>2,63</b>	0,0612	0,0075
	2,20	2,57			
4 - b	2,50	2,94	<b>2,94</b>	0	0
	2,50	2,94			
Padrão	2,15	2,51	<b>2,48</b>	0,0306	0,0019
	2,10	2,45			
5 - a	2,50	2,94	<b>2,97</b>	0,0306	0,0019
	2,55	3,00			
5 - b	2,60	3,06	<b>3,00</b>	0,0613	0,0075
	2,50	2,94			
Padrão	2,60	3,06	<b>3,06</b>	0,0000	0,0000
	2,60	3,06			
6 - a	2,40	2,82	<b>2,88</b>	0,0613	0,0075
	2,50	2,94			
6 - b	2,40	2,82	<b>2,88</b>	0,0613	0,0075
	2,50	2,94			
Padrão	2,65	3,12	<b>3,09</b>	0,0306	0,0019
	2,60	3,06			

Tabela B-2 - Continuação

7 - a	2,40	2,82			
	2,50	2,94	<b>2,88</b>	0,0613	0,0075
7 - b	2,30	2,70			
	2,35	2,76	<b>2,73</b>	0,0306	0,0019
Padrão	2,10	2,45			
	2,00	2,33	<b>2,39</b>	0,0613	0,0075
8 - a	2,80	3,31			
	2,75	3,25	<b>3,28</b>	0,0306	0,0019
8 - b	2,55	3,00			
	2,60	3,06	<b>3,03</b>	0,0306	0,0019
Padrão	2,60	3,06			
	2,50	2,94	<b>3,00</b>	0,0613	0,0075
9 - a	2,60	3,06			
	2,40	2,82	<b>2,94</b>	0,1225	0,0300
9 - b	2,60	3,06			
	2,45	2,88	<b>2,97</b>	0,0919	0,0169
Padrão	2,50	2,94			
	2,65	3,12	<b>3,03</b>	0,0919	0,0169
10 - a	2,35	2,76			
	2,00	2,33	<b>2,54</b>	0,2144	0,0919
10 - b	2,65	3,12			
	2,45	2,88	<b>3,00</b>	0,1225	0,0300
Padrão	2,65	3,12			
	2,60	3,06	<b>3,09</b>	0,0306	0,0019
11 - a	2,60	3,06			
	2,65	3,12	<b>3,09</b>	0,0306	0,0019
11 - b	2,60	3,06			
	2,50	2,94	<b>3,00</b>	0,0613	0,0075
Padrão	2,60	3,06			
	2,55	3,00	<b>3,03</b>	0,0306	0,0019
12 - a	2,70	3,19			
	2,70	3,19	<b>3,19</b>	0	0
12 - b	2,60	3,06			
	2,60	3,06	<b>3,06</b>	0	0
Padrão	2,55	3,00			
	2,75	3,25	<b>3,12</b>	0,1225	0,0300
13 - a	2,35	2,76			
	2,50	2,94	<b>2,85</b>	0,0919	0,0169
13 - b	2,65	3,12			
	2,45	2,88	<b>3,00</b>	0,1225	0,0300
Padrão	2,50	2,94			
	2,45	2,88	<b>2,91</b>	0,0306	0,0019

Tabela B-3: Resultados da Determinação de etanol por Cromatografia Gasosa

$$\frac{\text{Área etanol}}{\text{área acetona}} = -0,00745 + 0,4502 * (\text{Concentração etanol})$$

Cepa	A etanol	Acetona	$\frac{\text{A etanol}}{\text{A acetona}}$	Con. etanol (%) v/v	diluição 1:2 (*2)	Conc. média etanol v/v	desvio da média
1 - a	179853	194887	0,9229	2,07	4,13	<b>4,13</b>	0,0018
	167302	181446	0,9220	2,06	4,13		
1 - b	164586	129785	1,2681	2,83	5,67	<b>5,67</b>	0,0016
	168503	132799	1,2689	2,83	5,67		
Padrão	192218	171913	1,1181	2,50	5,00	<b>5,05</b>	0,0535
	179766	157384	1,1422	2,55	5,11		
2 - a	176671	199236	0,8867	1,99	3,97	<b>3,92</b>	0,0474
	162580	187869	0,8654	1,94	3,88		
2 - b	174896	186414	0,9382	2,10	4,20	<b>4,20</b>	0,0029
	167249	178516	0,9369	2,10	4,20		
Padrão	177977	188912	0,9421	2,11	4,22	<b>4,22</b>	0,0013
	178035	188859	0,9427	2,11	4,22		
3 - a	169366	181011	0,9357	2,09	4,19	<b>4,18</b>	0,0122
	155040	166680	0,9302	2,08	4,17		
3 - b	162434	172630	0,9409	2,11	4,21	<b>4,21</b>	0,0057
	143151	152551	0,9384	2,10	4,20		
Padrão	183097	189018	0,9687	2,17	4,34	<b>4,36</b>	0,0192
	170667	174624	0,9773	2,19	4,37		
4 - a	156072	144011	1,0838	2,42	4,85	<b>4,84</b>	0,0031
	160096	147914	1,0824	2,42	4,84		
4 - b	172968	183309	0,9436	2,11	4,22	<b>4,22</b>	0,0027
	173962	184599	0,9424	2,11	4,22		
Padrão	153746	150776	1,0197	2,28	4,56	<b>4,44</b>	0,1252
	168954	175385	0,9633	2,16	4,31		
5 - a	161698	152612	1,0595	2,37	4,74	<b>4,74</b>	0,0024
	163126	154117	1,0585	2,37	4,74		
5 - b	160717	156485	1,0270	2,30	4,60	<b>4,58</b>	0,0197
	166194	163225	1,0182	2,28	4,56		
Padrão	163769	153185	1,0691	2,39	4,78	<b>4,73</b>	0,0533
	176368	168759	1,0451	2,34	4,68		
6 - a	154911	151387	1,0233	2,29	4,58	<b>4,55</b>	0,0274
	174359	172468	1,0110	2,26	4,52		
6 - b	169129	173049	0,9773	2,19	4,37	<b>4,35</b>	0,0239
	179713	185927	0,9666	2,16	4,33		
Padrão	149153	154433	0,9658	2,16	4,32	<b>4,29</b>	0,0337
	152320	160226	0,9507	2,13	4,26		
7 - a	174833	173556	1,0074	2,25	4,51	<b>4,49</b>	0,0226
	164478	164945	0,9972	2,23	4,46		
7 - b	162371	156678	1,0363	2,32	4,64	<b>4,65</b>	0,0113
	161299	154881	1,0414	2,33	4,66		
Padrão	172611	167417	1,0310	2,31	4,61	<b>4,60</b>	0,0126
	161630	157633	1,0254	2,29	4,59		

Tabela B-3 - Continuação

8 - a	327411	266274	1,2296	2,75	5,50	<b>5,48</b>	0,0175
	318774	260923	1,2217	2,73	5,46		
8 - b	357272	255201	1,4000	3,13	6,25	<b>6,24</b>	0,0109
	340165	243836	1,3951	3,12	6,23		
Padrão	358478	254305	1,4096	3,15	6,30	<b>6,06</b>	0,2357
	352078	270099	1,3035	2,91	5,82		
9 - a	342363	253770	1,3491	3,01	6,03	<b>6,01</b>	0,0179
	353092	263298	1,3410	3,00	5,99		
9 - b	456088	262020	1,7407	3,88	7,77	<b>6,17</b>	1,5930
	260241	254265	1,0235	2,29	4,58		
Padrão	358478	254305	1,4096	3,15	6,30	<b>6,06</b>	0,2357
	352078	270099	1,3035	2,91	5,82		
10 - a	320952	262821	1,2212	2,73	5,46	<b>5,45</b>	0,0107
	324301	266617	1,2164	2,72	5,44		
10 - b	402823	263391	1,5294	3,41	6,83	<b>6,99</b>	0,1580
	426220	266307	1,6005	3,57	7,14		
Padrão	358478	254305	1,4096	3,15	6,30	<b>6,06</b>	0,2357
	352078	270099	1,3035	2,91	5,82		
11 - a	174087	164968	1,0553	2,36	4,72	<b>4,66</b>	0,0650
	163550	159400	1,0260	2,30	4,59		
11 - b	171603	158820	1,0805	2,42	4,83	<b>4,81</b>	0,0208
	173119	161624	1,0711	2,40	4,79		
Padrão	164916	149237	1,1051	2,47	4,94	<b>4,91</b>	0,0306
	183463	168115	1,0913	2,44	4,88		
12 - a	312127	224641	1,3894	3,10	6,21	<b>6,30</b>	0,0960
	339140	236723	1,4326	3,20	6,40		
12 - b	360464	265056	1,3600	3,04	6,07	<b>6,16</b>	0,0866
	354702	253550	1,3989	3,12	6,25		
Padrão	358478	254305	1,4096	3,15	6,30	<b>6,06</b>	0,2357
	352078	270099	1,3035	2,91	5,82		
13 - a	178389	184154	0,9687	2,17	4,34	<b>4,35</b>	0,0148
	184581	189246	0,9753	2,18	4,37		
13 - b	172329	190329	0,9054	2,03	4,06	<b>4,05</b>	0,0022
	159357	176191	0,9045	2,03	4,05		
Padrão	178911	187719	0,9531	2,13	4,27	<b>4,29</b>	0,0234
	135753	140878	0,9636	2,16	4,31		

**Tabela B-4:** Resultados da Determinação de Glicerol

Curva Padrão:

Absorbância =  $0,00193 + 0,05489 * [\text{concentração glicerol}(\text{mg}/100\text{ml água})]$ 

R= 0,99973

Diluição: 1:50

Cepa	Abs (1)	Abs(2)	Conc. glic. . (1) (mg/ml)	Conc. glic. . (2) (mg/ml)	Conc. glic. media (mg/ml)	Conc. glic.med. (*diluição)(*50) (mg/ml)	<i>desvio padrao</i>
1 - a	0,530	0,561	9,77	10,35	10,06	<b>502,94</b>	0,1645
1 - b	0,505	0,508	9,17	9,22	9,19	<b>459,62</b>	0,0015
Padrão	0,569	0,569	10,33	10,33	10,33	<b>516,55</b>	0
2 - a	0,522	0,538	9,62	9,92	9,77	<b>488,60</b>	0,0438
2 - b	0,537	0,535	9,90	9,86	9,88	<b>494,15</b>	0,0007
Padrão	0,521	0,526	9,61	9,70	9,65	<b>482,59</b>	0,0043
3 - a	0,513	0,516	9,31	9,37	9,34	<b>466,91</b>	0,0015
3 - b	0,510	0,536	9,26	9,73	9,49	<b>474,65</b>	0,1122
Padrão	0,488	0,498	9,00	9,18	9,09	<b>454,38</b>	0,0171
4 - a	0,494	0,485	9,11	8,94	9,02	<b>451,14</b>	0,0139
4 - b	0,494	0,485	9,11	8,94	9,02	<b>451,14</b>	0,0139
Padrão	0,472	0,478	8,70	8,81	8,75	<b>437,72</b>	0,0062
5 - a	0,525	0,540	9,68	9,96	9,82	<b>490,92</b>	0,0385
5 - b	0,525	0,540	9,68	9,96	9,82	<b>490,92</b>	0,0385
Padrão	0,514	0,508	9,33	9,22	9,27	<b>463,72</b>	0,0060
6 - a	0,554	0,547	10,06	9,93	9,99	<b>499,70</b>	0,0081
6 - b	0,561	0,559	10,35	10,31	10,33	<b>516,36</b>	0,0007
Padrão	0,547	0,540	9,93	9,80	9,87	<b>493,32</b>	0,0081
7 - a	0,475	0,480	8,62	8,71	8,66	<b>433,20</b>	0,0041
7 - b	0,475	0,480	8,62	8,71	8,66	<b>433,20</b>	0,0041
Padrão	0,429	0,434	7,78	7,87	7,83	<b>391,30</b>	0,0041
8 - a	0,390	0,374	7,07	6,78	6,92	<b>346,21</b>	0,0425
8 - b	0,416	0,414	7,54	7,51	7,53	<b>376,27</b>	0,0007
Padrão	0,518	0,523	9,40	9,49	9,45	<b>472,37</b>	0,0041
9 - a	0,511	0,515	9,42	9,49	9,46	<b>472,88</b>	0,0027
9 - b	0,525	0,529	9,68	9,75	9,72	<b>485,83</b>	0,0027
Padrão	0,518	0,523	9,40	9,49	9,45	<b>472,37</b>	0,0041
10 - a	0,480	0,476	8,71	8,64	8,67	<b>433,66</b>	0,0027
10 - b	0,484	0,496	8,78	9,00	8,89	<b>444,59</b>	0,0239
Padrão	0,518	0,523	9,40	9,49	9,45	<b>472,37</b>	0,0041
11 - a	0,535	0,573	9,71	10,40	10,06	<b>502,89</b>	0,2396
11 - b	0,541	0,549	9,98	10,12	10,05	<b>502,48</b>	0,0110
Padrão	0,566	0,559	10,44	10,31	10,37	<b>518,67</b>	0,0084
12 - a	0,513	0,516	9,31	9,37	9,34	<b>466,91</b>	0,0015
12 - b	0,509	0,536	9,38	9,88	9,63	<b>481,67</b>	0,1248
Padrão	0,518	0,523	9,40	9,49	9,45	<b>472,37</b>	0,0041
13 - a	0,555	0,556	10,08	10,09	10,09	<b>504,25</b>	0,0002
13 - b	0,555	0,55	10,08	9,98	10,03	<b>501,52</b>	0,0041
Padrão	0,563	0,547	10,22	9,93	10,08	<b>503,80</b>	0,0425

**Tabela B-5:** Resultados da Determinação de Massa Seca

Cepa	MS(1) (g/g)	MS(2) (g/g)	MS medio (g/g)	<i>desvio padrao</i>
1 - a	0,534	0,535	<b>0,535</b>	3,04E-07
1 - b	0,483	0,518	<b>0,501</b>	6,16E-04
Padrão	0,548	0,536	<b>0,542</b>	6,8E-05
2 - a	0,472	0,469	<b>0,471</b>	2,42E-06
2 - b	0,491	0,505	<b>0,498</b>	9,52E-05
Padrão	0,565	0,555	<b>0,560</b>	5,2E-05
3 - a	0,469	0,466	<b>0,467</b>	6,12E-06
3 - b	0,481	0,492	<b>0,486</b>	6,16E-05
Padrão	0,473	0,560	<b>0,516</b>	3,83E-03
4 - a	0,440	0,455	<b>0,448</b>	1,13E-04
4 - b	0,454	0,467	<b>0,461</b>	8,45E-05
Padrão	0,487	0,472	<b>0,479</b>	1,18E-04
5 - a	0,476	0,469	<b>0,473</b>	2,52E-05
5 - b	0,506	0,470	<b>0,488</b>	6,32E-04
Padrão	0,460	0,464	<b>0,462</b>	9,68E-06
6 - a	0,521	0,524	<b>0,522</b>	5,45E-06
6 - b	0,507	0,535	<b>0,521</b>	4,06E-04
Padrão	0,480	0,489	<b>0,485</b>	0
7 - a	0,415	0,433	<b>0,424</b>	1,57E-04
7 - b	0,416	0,410	<b>0,413</b>	1,98E-05
Padrão	0,462	0,486	<b>0,474</b>	2,9E-04
8 - a	0,647	0,661	<b>0,654</b>	1,02E-04
8 - b	0,674	0,645	<b>0,659</b>	4,15E-04
Padrão	0,602	0,602	<b>0,602</b>	3,78E-05
9 - a	0,665	0,667	<b>0,666</b>	2,88E-06
9 - b	0,670	0,659	<b>0,664</b>	5,83E-05
Padrão	0,602	0,602	<b>0,602</b>	0
10 - a	0,651	0,640	<b>0,646</b>	5,41E-05
10 - b	0,644	0,644	<b>0,644</b>	0
Padrão	0,602	0,602	<b>0,602</b>	0
11 - a	0,463	0,484	<b>0,473</b>	2,16E-04
11 - b	0,483	0,502	<b>0,492</b>	1,9E-04
Padrão	0,482	0,488	<b>0,485</b>	1,68E-05
12 - a	0,582	0,614	<b>0,598</b>	5,25E-04
12 - b	0,615	0,639	<b>0,627</b>	2,81E-04
Padrão	0,602	0,602	<b>0,602</b>	0
13 - a	0,513	0,527	<b>0,520</b>	9,52E-05
13 - b	0,511	0,509	<b>0,510</b>	1,45E-06
Padrão	0,520	0,520	<b>0,520</b>	0

**Tabela B-6:** Valores de concentração de etanol com seu correspondente valor de  $pH_{final}$  das 13 cepas estudadas e cepa padrão para determinação do coeficiente angular  $k$ .

Concentração de etanol (X) (v/v)	(X)*log <sub>10</sub> e (molar)	$pH_{final}$ cepa 1- a	$pH_{final}$ cepa 1- b	$pH_{final}$ cepa padrão	$pH_{final}$ cepa 2- a	$pH_{final}$ cepa 2- b	$pH_{final}$ cepa padrão
0	0	3,51	3,50	3,50	3,73	3,73	3,60
2%	0,15	3,61	3,61	3,61	3,86	3,88	3,72
4%	0,30	3,64	3,64	3,65	3,95	3,95	3,77
6%	0,45	3,67	3,68	3,69	4,00	3,99	3,78
8%	0,60	3,72	3,73	3,73	3,97	3,96	3,82
10%	0,75	3,77	3,78	3,79	4,01	4,00	3,87

Concentração de etanol (X) (v/v)	(X)*log <sub>10</sub> e (molar)	$pH_{final}$ cepa 3- a	$pH_{final}$ cepa 3- b	$pH_{final}$ cepa padrão	$pH_{final}$ cepa 4- a	$pH_{final}$ cepa 4- b	$pH_{final}$ cepa padrão
0	0	3,75	3,78	3,68	3,62	3,68	3,75
2%	* 0,15	3,88	3,88	3,81	3,67	3,77	3,86
4%	0,30	3,91	3,91	3,86	3,72	3,80	3,89
6%	0,45	3,92	3,93	3,88	3,78	3,85	3,89
8%	0,60	3,95	3,94	3,92	3,76	3,87	3,94
10%	0,75	4,01	4,00	3,94	3,81	3,94	4,00

Concentração de etanol (X) (v/v)	(X)*log <sub>10</sub> e (molar)	$pH_{final}$ cepa 5- a	$pH_{final}$ cepa 5- b	$pH_{final}$ cepa padrão	$pH_{final}$ cepa 6- a	$pH_{final}$ cepa 6- b	$pH_{final}$ cepa padrão
0	0	3,66	3,65	3,69	3,70	3,70	3,71
2%	0,15	3,77	3,77	3,81	3,78	3,79	3,80
4%	0,30	3,82	3,81	3,76	3,82	3,82	3,85
6%	0,45	3,84	3,84	3,88	3,85	3,86	3,88
8%	0,60	3,88	3,88	3,92	3,90	3,90	3,92
10%	0,75	3,94	3,93	3,97	3,97	3,96	3,98

Concentração de etanol (X) (v/v)	(X)*log <sub>10</sub> e (molar)	$pH_{final}$ cepa 7- a	$pH_{final}$ cepa 7- b	$pH_{final}$ cepa padrão	$pH_{final}$ cepa 8- a	$pH_{final}$ cepa 8- b	$pH_{final}$ cepa padrão
0	0	3,64	3,64	3,64	3,58	3,61	3,52
2%	0,15	3,71	3,71	3,73	3,73	3,74	3,68
4%	0,30	3,75	3,75	3,76	3,79	3,78	3,76
6%	0,45	3,78	3,78	3,80	3,82	3,83	3,75
8%	0,60	3,83	3,83	3,82	3,83	3,84	3,77
10%	0,75	3,87	3,88	3,87	3,88	3,88	3,81



Tabela B-6 - Continuação

Concentração de etanol (X) (v/v)	(X)*log <sub>10</sub> e (molar)	pH <sub>final</sub> cepa 9- a	pH <sub>final</sub> cepa 9- b	pH <sub>final</sub> cepa padrão	pH <sub>final</sub> cepa 10- a	pH <sub>final</sub> cepa 10- b	pH <sub>final</sub> cepa padrão
0	0	3,36	3,39	3,61	3,28	3,31	3,59
2%	0,15	3,47	3,44	3,71	3,35	3,34	3,77
4%	0,30	3,48	3,47	3,75	3,38	3,37	3,81
6%	0,45	3,50	3,49	3,78	3,42	3,41	3,83
8%	0,60	3,52	3,55	3,82	3,49	3,49	3,85
10%	0,75	3,65	3,67	3,86	3,73	3,62	3,89

Concentração de etanol (X) (v/v)	(X)*log <sub>10</sub> e (molar)	pH <sub>final</sub> cepa 11- a	pH <sub>final</sub> cepa 11- b	pH <sub>final</sub> cepa padrão	pH <sub>final</sub> cepa 12- a	pH <sub>final</sub> cepa 12- b	pH <sub>final</sub> cepa padrão
0	0	3,68	3,68	3,67	3,50	3,45	3,57
2%	0,15	3,81	3,83	3,83	3,60	3,59	3,70
4%	0,30	3,83	3,88	3,87	3,67	3,63	3,76
6%	0,45	3,86	3,90	3,89	3,70	3,65	3,78
8%	0,60	3,92	3,91	3,90	3,73	3,68	3,80
10%	0,75	3,99	3,98	3,98	3,77	3,73	3,85

Concentração de etanol (X) (v/v)	(X)*log <sub>10</sub> e (molar)	pH <sub>final</sub> cepa 13- a	pH <sub>final</sub> cepa 13- b	pH <sub>final</sub> cepa padrão
0	0	3,55	3,56	3,56
2%	0,15	3,64	3,66	3,66
4%	0,30	3,71	3,71	3,72
6%	0,45	3,74	3,74	3,75
8%	0,60	3,79	3,77	3,78
10%	0,75	3,85	3,83	3,85

## **APÊNDICE C**

**Tabelas dos Resultados dos Testes da Fermentação e Determinação das  
Produções Específicas e do Potencial Fermentativo das 13 cepas analisadas e  
padrão**

**Tabela C-1: Resultados dos testes da Fermentação Alcoólica e determinação das Produções Específicas e do Potencial Fermentativo para a cepa 1.**

CEPA	F.V. (g)	F.E. (g)	F.I. (g)	F.F. (g)	P <sub>mosto</sub> (g)	P <sub>vinho</sub> (g)	P <sub>inóculo</sub> (g)
1-a	304,90	601,90	631,60	618,20	297,00	313,30	29,70
1-b	361,91	658,70	688,50	675,50	296,79	313,59	29,80
<b>MÉDIA</b>				646,85	296,90	313,45	29,75
<b>PADRÃO</b>	283,70	579,70	609,80	596,50	296,00	312,80	30,10

CEPA	ART <sub>meioestéril</sub> (g/l)	ART <sub>vinho</sub> (g/l)	GLICER. (mg/100g)	MS <sub>mosto</sub> (g/g)	MS <sub>vinho</sub> (g/g)	ETANOL (v/v)	AC <sub>vinho</sub> (g/l)	AC <sub>mosto</sub> (g/l)	DENS <sub>mosto</sub> (g/ml)
1-a	134,04	20,78	502,94	0,00	0,0053	4,13	2,91	2,82	1,06
1-b	134,04	22,32	459,62	0,00	0,0050	5,67	2,85	2,82	1,06
<b>MÉDIA</b>	134,04	21,55	481,28	0,00	0,0052	4,90	2,88	2,82	1,06
<b>PADRÃO</b>	134,04	25,63	516,55	0,00	0,0054	5,05	2,94	2,82	1,06

CEPA	ART <sub>CON</sub> (g)	ET <sub>PROD</sub> (g)	GLIC <sub>PROD</sub> (g)	AC <sub>PROD</sub> (g)	ART <sub>res</sub> (g)	CEL <sub>PROD</sub> (g)	CO <sub>2</sub> <sub>PROD.</sub> (g)
1-a	31,05	10,22	1,58	0,91	6,51	1,68	13,40
1-b	30,53	14,04	1,44	0,89	7,00	1,57	13,00
<b>MÉDIA</b>	30,79	12,13	1,51	0,90	6,75	1,62	13,20
<b>PADRÃO</b>	29,41	12,49	1,62	0,92	8,02	1,69	13,30

CEPA	PEE	PEC	PEG	PER	PEAc	PECO <sub>2</sub>
1-a	0,3293	0,0540	0,0508	0,2097	0,0294	0,4316
1-b	0,4599	0,0514	0,0472	0,2292	0,0293	0,4258
<b>MÉDIA</b>	0,3946	0,0527	0,0490	0,2194	0,0293	0,4287
<b>PADRÃO</b>	0,4246	0,0576	0,0549	0,2726	0,0313	0,4522

	CEPA 1	padrão 1	FATOR	FATOR * peso
PEE	0,3946	0,4246	-7,08	-70,78
PEC	0,0527	0,0576	8,52	17,04
PEG	0,0490	0,0549	10,84	10,84
PER	0,2194	0,2726	5,32	26,59
PEAc	0,0293	0,0313	6,28	1,57
			PF =	-14,7

**Tabela C-2: Resultados dos testes da Fermentação Alcoólica e determinação das Produções Específicas e do Potencial Fermentativo para a cepa 2.**

CEPA	F.V. (g)	F.E. (g)	F.I. (g)	F.F. (g)	P <sub>mosto</sub> (g)	P <sub>vinho</sub> (g)	P <sub>inóculo</sub> (g)
2-a	281,01	576,70	606,60	592,60	295,69	311,59	29,90
2-b	383,21	678,30	708,30	694,70	295,09	311,49	30,00
<b>MÉDIA</b>				643,65	295,39	311,54	29,95
<b>PADRÃO</b>	305,01	600,40	630,20	616,40	295,39	311,39	29,80

CEPA	ART <sub>meioestéril</sub> (g/l)	ART <sub>vinho</sub> (g/l)	GLICER. (mg/100g)	MS <sub>mosto</sub> (g/g)	MS <sub>vinho</sub> (g/g)	ETANOL (v/v)	AC <sub>vinho</sub> (g/l)	AC <sub>mosto</sub> (g/l)	DENS <sub>mosto</sub> (g/ml)
2-a	125,11	16,84	488,6	0,00	0,0047	3,93	2,94	2,82	1,06
2-b	125,11	17,91	494,2	0,00	0,0050	4,20	2,97	2,82	1,06
<b>MÉDIA</b>	125,11	17,37	491,4	0,00	0,0048	4,06	2,96	2,82	1,06
<b>PADRÃO</b>	125,11	18,94	482,6	0,00	0,0056	4,22	3,03	2,82	1,06

CEPA	ART <sub>CON</sub> (g)	ET <sub>PROD</sub> (g)	GLIC <sub>PROD</sub> (g)	AC <sub>PROD</sub> (g)	ART <sub>res</sub> (g)	CEL <sub>PROD</sub> (g)	CO <sub>2</sub> <sub>PROD</sub> (g)
2-a	29,65	9,66	1,52	0,92	5,25	1,47	14,00
2-b	29,25	10,33	1,54	0,93	5,58	1,55	13,60
<b>MÉDIA</b>	29,45	10,00	1,53	0,92	5,41	1,51	13,80
<b>PADRÃO</b>	28,97	10,38	1,50	0,94	5,90	1,74	13,80

CEPA	PEE	PEC	PEG	PER	PEAc	PECO <sub>2</sub>
2-a	0,3258	0,0494	0,0513	0,1769	0,0309	0,4721
2-b	0,3532	0,0531	0,0526	0,1907	0,0316	0,4650
<b>MÉDIA</b>	0,3395	0,0512	0,0520	0,1838	0,0313	0,4685
<b>PADRÃO</b>	0,3584	0,0602	0,0519	0,2036	0,0326	0,4764

	CEPA 2	padrão 2	FATOR	FATOR *peso
PEE	0,3395	0,3584	-5,27	-52,69
PEC	0,0512	0,0602	14,86	29,71
PEG	0,0520	0,0519	-0,20	-0,20
PER	0,1838	0,2036	1,98	9,88
PEAc	0,0313	0,0326	4,07	1,02
			PF =	-12,3

**Tabela C-3: Resultados dos testes da Fermentação Alcoólica e determinação das Produções Específicas e do Potencial Fermentativo para a cepa 3.**

CEPA	F.V. (g)	F.E. (g)	F.I. (g)	F.F. (g)	P <sub>mosto</sub> (g)	P <sub>vinho</sub> (g)	P <sub>inóculo</sub> (g)
3-a	313,82	603,70	633,60	621,00	289,88	307,18	29,90
3-b	336,44	626,00	655,80	643,60	289,56	307,16	29,80
<b>MÉDIA</b>				632,30	289,72	307,17	29,85
<b>PADRÃO</b>	325,20	615,10	645,40	632,80	289,90	307,60	30,30

CEPA	ART <sub>meioestéril</sub> (g/l)	ART <sub>vinho</sub> (g/l)	GLICER. (mg/100g)	MS <sub>mosto</sub> (g/g)	MS <sub>vinho</sub> (g/g)	ETANOL (v/v)	AC <sub>vinho</sub> (g/l)	AC <sub>mosto</sub> (g/l)	DENS <sub>mosto</sub> (g/ml)
3-a	123,37	26,05	466,9	0,00	0,0047	4,18	2,82	2,82	1,06
3-b	123,37	26,48	474,6	0,00	0,0049	4,21	3,03	2,82	1,06
<b>MÉDIA</b>	123,37	26,27	470,8	0,00	0,0048	4,19	2,92	2,82	1,06
<b>PADRÃO</b>	123,37	21,01	454,4	0,00	0,0052	4,36	2,94	2,82	1,06

CEPA	ART <sub>CON</sub> (g)	ET <sub>PROD</sub> (g)	GLIC <sub>PROD</sub> (g)	AC <sub>PROD</sub> (g)	ART <sub>res</sub> (g)	CEL <sub>PROD</sub> (g)	CO <sub>2</sub> <sub>PROD.</sub> (g)
3-a	25,74	10,14	1,43	0,87	8,00	1,44	12,60
3-b	25,57	10,21	1,46	0,93	8,13	1,49	12,20
<b>MÉDIA</b>	25,65	10,17	1,45	0,90	8,07	1,46	12,40
<b>PADRÃO</b>	27,28	10,58	1,40	0,90	6,46	1,59	12,60

CEPA	PEE	PEC	PEG	PER	PEAc	PECO <sub>2</sub>
3-a	0,3939	0,0558	0,0557	0,3109	0,0336	0,4896
3-b	0,3993	0,0584	0,0570	0,3182	0,0364	0,4772
<b>MÉDIA</b>	0,3966	0,0571	0,0564	0,3145	0,0350	0,4834
<b>PADRÃO</b>	0,3880	0,0582	0,0512	0,2369	0,0332	0,4619

	CEPA 3	padrão 3	FATOR	FATOR *peso
PEE	0,3966	0,3880	2,22	22,23
PEC	0,0571	0,0582	1,94	3,87
PEG	0,0564	0,0512	-10,04	-10,04
PER	0,3145	0,2369	-7,77	-38,85
PEAc	0,0350	0,0332	-5,66	-1,41
			PF =	-24,2

**Tabela C-4: Resultados dos testes da Fermentação Alcoólica e determinação das Produções Específicas e do Potencial Fermentativo para a cepa 4.**

CEPA	F.V. (g)	F.E. (g)	F.I. (g)	F.F. (g)	P <sub>mosto</sub> (g)	P <sub>vinho</sub> (g)	P <sub>inóculo</sub> (g)
4-a	340,46	623,20	652,70	639,80	282,74	299,34	29,50
4-b	386,54	671,10	700,90	688,00	284,56	301,46	29,80
<b>MÉDIA</b>				663,90	283,65	300,40	29,65
<b>PADRÃO</b>	364,60	646,80	676,20	664,80	282,20	300,20	29,40

CEPA	ART <sub>meioestéril</sub> (g/l)	ART <sub>vinho</sub> (g/l)	GLICER. (mg/100g)	MS <sub>mosto</sub> (g/g)	MS <sub>vinho</sub> (g/g)	ETANOL (v/v)	AC <sub>vinho</sub> (g/l)	AC <sub>mosto</sub> (g/l)	DENS <sub>mosto</sub> (g/ml)
4-a	117,90	19,39	451,1	0,00	0,0045	4,84	2,63	2,82	1,06
4-b	117,90	18,09	451,1	0,00	0,0046	4,22	2,94	2,82	1,06
<b>MÉDIA</b>	117,90	18,74	451,1	0,00	0,0045	4,53	2,79	2,82	1,06
<b>PADRÃO</b>	117,90	22,31	437,7	0,00	0,0048	4,44	2,48	2,82	1,06

CEPA	ART <sub>CON</sub> (g)	ET <sub>PROD</sub> (g)	GLIC <sub>PROD</sub> (g)	AC <sub>PROD</sub> (g)	ART <sub>res</sub> (g)	CEL <sub>PROD</sub> (g)	CO <sub>2</sub> <sub>PROD.</sub> (g)
4-a	25,64	11,46	1,35	0,79	5,81	1,34	12,90
4-b	26,20	10,06	1,36	0,89	5,45	1,39	12,90
<b>MÉDIA</b>	25,92	10,76	1,36	0,84	5,63	1,36	12,90
<b>PADRÃO</b>	24,69	10,52	1,31	0,74	6,70	1,44	11,40

CEPA	PEE	PEC	PEG	PER	PEAc	PECO <sub>2</sub>
4-a	0,4468	0,0522	0,0527	0,2264	0,0307	0,5031
4-b	0,3839	0,0530	0,0519	0,2082	0,0338	0,4924
<b>MÉDIA</b>	0,4153	0,0526	0,0523	0,2173	0,0323	0,4978
<b>PADRÃO</b>	0,4263	0,0583	0,0532	0,2713	0,0302	0,4617

	CEPA 4	padrão 4	FATOR	FATOR *peso
PEE	0,4153	0,4263	-2,58	-25,76
PEC	0,0526	0,0583	9,72	19,43
PEG	0,0523	0,0532	1,75	1,75
PER	0,2173	0,2713	5,40	27,01
PEAc	0,0323	0,0302	-7,03	-1,76
			<b>PF =</b>	<b>20,67</b>

**Tabela C-5:** Resultados dos testes da Fermentação Alcoólica e determinação das Produções Específicas e do Potencial Fermentativo para a cepa 5.

CEPA	F.V. (g)	F.E. (g)	F.I. (g)	F.F. (g)	P <sub>mosto</sub> (g)	P <sub>vinho</sub> (g)	P <sub>inóculo</sub> (g)
5-a	313,20	606,60	636,60	624,60	293,40	311,40	30,00
5-b	312,21	609,30	639,60	627,40	297,09	315,19	30,30
<b>MÉDIA</b>				626,00	295,25	313,30	30,15
<b>PADRÃO</b>	322,72	616,20	646,00	633,90	293,48	311,18	29,80

CEPA	ART <sub>meioestéril</sub> (g/l)	ART <sub>vinho</sub> (g/l)	GLICER. (mg/100g)	MS <sub>mosto</sub> (g/g)	MS <sub>vinho</sub> (g/g)	ETANOL (v/v)	AC <sub>vinho</sub> (g/l)	AC <sub>mosto</sub> (g/l)	DENS <sub>mosto</sub> (g/ml)
5-a	127,11	30,63	490,9	0,00	0,0047	4,74	2,97	2,82	1,06
5-b	127,11	30,06	490,9	0,00	0,0049	4,58	3,00	2,82	1,06
<b>MÉDIA</b>	127,11	30,35	490,9	0,00	0,0048	4,66	2,99	2,82	1,06
<b>PADRÃO</b>	127,11	31,60	463,7	0,00	0,0046	4,73	3,06	2,82	1,06

CEPA	ART <sub>CON</sub> (g)	ET <sub>PROD</sub> (g)	GLIC <sub>PROD</sub> (g)	AC <sub>PROD</sub> (g)	ART <sub>res</sub> (g)	CEL <sub>PROD</sub> (g)	CO <sub>2</sub> <sub>PROD</sub> (g)
5-a	25,65	11,66	1,53	0,93	9,54	1,47	12,00
5-b	26,15	11,39	1,55	0,95	9,48	1,54	12,20
<b>MÉDIA</b>	25,90	11,52	1,54	0,94	9,51	1,51	12,10
<b>PADRÃO</b>	25,36	11,63	1,44	0,95	9,83	1,44	12,10

CEPA	PEE	PEC	PEG	PER	PEAc	PECO <sub>2</sub>
5-a	0,4545	0,0574	0,0596	0,3719	0,0361	0,4679
5-b	0,4357	0,0588	0,0592	0,3624	0,0362	0,4665
<b>MÉDIA</b>	0,4451	0,0581	0,0594	0,3671	0,0361	0,4672
<b>PADRÃO</b>	0,4584	0,0567	0,0569	0,3877	0,0376	0,4771

	CEPA 5	padrão 5	FATOR	FATOR *peso
PEE	0,4451	0,4584	-2,91	-29,11
PEC	0,0581	0,0567	-2,54	-5,09
PEG	0,0594	0,0569	-4,37	-4,37
PER	0,3671	0,3877	2,06	10,31
PEAC	0,0361	0,0376	3,87	0,97
			<b>PF =</b>	<b>-27,3</b>

**Tabela C-6:** Resultados dos testes da Fermentação Alcoólica e determinação das Produções Específicas e do Potencial Fermentativo para a cepa 6.

CEPA	F.V. (g)	F.E. (g)	F.I. (g)	F.F. (g)	P <sub>mosto</sub> (g)	P <sub>vinho</sub> (g)	P <sub>inóculo</sub> (g)
6-a	306,40	597,00	626,90	614,10	290,60	307,70	29,90
6-b	365,39	660,90	690,70	676,90	295,51	311,51	29,80
<b>MÉDIA</b>				645,50	293,06	309,61	29,85
<b>PADRÃO</b>	308,70	600,40	630,20	616,80	291,70	308,10	29,80

CEPA	ART <sub>meioestéril</sub> (g/l)	ART <sub>vinho</sub> (g/l)	GLICER. (mg/100g)	MS <sub>mosto</sub> (g/g)	MS <sub>vinho</sub> (g/g)	ETANOL (v/v)	AC <sub>vinho</sub> (g/l)	AC <sub>mosto</sub> (g/l)	DENS <sub>mosto</sub> (g/ml)
6-a	125,12	24,31	499,7	0,00	0,0052	4,55	2,88	2,82	1,06
6-b	125,12	20,40	516,4	0,00	0,0052	4,35	2,88	2,82	1,06
<b>MÉDIA</b>	125,12	22,35	508,0	0,00	0,0052	4,45	2,88	2,82	1,06
<b>PADRÃO</b>	123,37	22,47	493,3	0,00	0,0048	4,29	3,09	2,82	1,06

CEPA	ART <sub>CON</sub> (g)	ET <sub>PROD</sub> (g)	GLIC <sub>PROD</sub> (g)	AC <sub>PROD</sub> (g)	ART <sub>res</sub> (g)	CEL <sub>PROD</sub> (g)	CO <sub>2</sub> <sub>PROD.</sub> (g)
6-a	26,82	11,06	1,54	0,89	7,48	1,61	12,80
6-b	28,53	10,71	1,61	0,90	6,35	1,62	13,80
<b>MÉDIA</b>	27,67	10,89	1,57	0,89	6,92	1,62	13,30
<b>PADRÃO</b>	27,03	10,44	1,52	0,95	6,92	1,49	13,40

CEPA	PEE	PEC	PEG	PER	PEAc	PECO <sub>2</sub>
6-a	0,4125	0,0599	0,0573	0,2789	0,0330	0,4772
6-b	0,3753	0,0569	0,0564	0,2227	0,0314	0,4837
<b>MÉDIA</b>	0,3939	0,0584	0,0569	0,2508	0,0322	0,4805
<b>PADRÃO</b>	0,3863	0,0553	0,0562	0,2561	0,0353	0,4958

	CEPA 6	padrão 6	FATOR	FATOR *peso
PEE	0,3939	0,3863	1,96	19,63
PEC	0,0584	0,0553	-5,68	-11,36
PEG	0,0569	0,0562	-1,10	-1,10
PER	0,2508	0,2561	0,53	2,66
PEAC	0,0322	0,0353	8,59	2,15
			PF =	12,0



**Tabela C-7: Resultados dos testes da Fermentação Alcoólica e determinação das Produções Específicas e do Potencial Fermentativo para a cepa 7.**

CEPA	F.V. (g)	F.E. (g)	F.I. (g)	F.F. (g)	P <sub>mosto</sub> (g)	P <sub>vinho</sub> (g)	P <sub>inóculo</sub> (g)
7-a	309,54	598,50	628,40	615,00	288,96	305,46	29,90
7-b	366,25	655,30	685,10	672,40	289,05	306,15	29,80
MÉDIA				643,70	289,01	305,81	29,85
PADRÃO	284,67	573,30	603,20	589,10	288,63	304,43	29,90

CEPA	ART <sub>meioestéril</sub> (g/l)	ART <sub>vinho</sub> (g/l)	GLICER. (mg/100g)	MS <sub>mosto</sub> (g/g)	MS <sub>vinho</sub> (g/g)	ETANOL (v/v)	AC <sub>vinho</sub> (g/l)	AC <sub>mosto</sub> (g/l)	DENS <sub>mosto</sub> (g/ml)
7-a	125,09	21,06	433,20	0,00	0,00	4,49	2,88	2,82	1,06
7-b	125,09	20,17	433,20	0,00	0,00	4,65	2,73	2,82	1,06
MÉDIA	125,09	20,61	433,20	0,00	0,00	4,57	2,80	2,82	1,06
PADRÃO	125,09	23,36	391,30	0,00	0,00	4,60	2,39	2,82	1,06

CEPA	ART <sub>CON</sub> (g)	ET <sub>PROD</sub> (g)	GLIC <sub>PROD</sub> (g)	AC <sub>PROD</sub> (g)	ART <sub>res</sub> (g)	CEL <sub>PROD</sub> (g)	CO <sub>2</sub> <sub>PROD</sub> (g)
7-a	27,67	10,82	1,32	0,88	6,43	1,30	13,40
7-b	27,94	11,24	1,33	0,83	6,17	1,26	12,70
MÉDIA	27,80	11,03	1,32	0,86	6,30	1,28	13,05
PADRÃO	26,95	11,06	1,19	0,73	7,11	1,44	14,10

CEPA	PEE	PEC	PEG	PER	PEAc	PECO <sub>2</sub>
7-a	0,3912	0,0468	0,0478	0,2325	0,0318	0,4843
7-b	0,4024	0,0452	0,0475	0,2210	0,0299	0,4546
MÉDIA	0,3968	0,0460	0,0477	0,2268	0,0308	0,4695
PADRÃO	0,4105	0,0536	0,0442	0,2639	0,0270	0,5232

	CEPA 7	padrão 7	FATOR	FATOR *peso
PEE	0,3968	0,4105	-3,33	-33,35
PEC	0,0460	0,0536	14,09	28,18
PEG	0,0477	0,0442	-7,80	-7,80
PER	0,2268	0,2639	3,72	18,58
PEAC	0,0308	0,0270	-14,23	-3,56
			PF =	2,1

**Tabela C-8: Resultados dos testes da Fermentação Alcoólica e determinação das Produções Específicas e do Potencial Fermentativo para a cepa 8.**

CEPA	F.V. (g)	F.E. (g)	F.I. (g)	F.F. (g)	P <sub>mosto</sub> (g)	P <sub>vinho</sub> (g)	P <sub>inóculo</sub> (g)
8-a	315,59	600,90	630,70	614,80	285,31	299,21	29,80
8-b	339,50	623,50	653,20	637,60	284,00	298,10	29,70
<b>MÉDIA</b>				626,20	284,66	298,66	29,75
<b>PADRÃO</b>	341,18	625,90	655,80	640,00	284,72	298,82	29,90

CEPA	ART <sub>meioestéril</sub> (g/l)	ART <sub>vinho</sub> (g/l)	GLICER. (mg/100g)	MS <sub>mosto</sub> (g/g)	MS <sub>vinho</sub> (g/g)	ETANOL (v/v)	AC <sub>vinho</sub> (g/l)	AC <sub>mosto</sub> (g/l)	DENS <sub>mosto</sub> (g/ml)
8-a	133,11	2,01	346,2	0,00	0,0065	5,48	2,97	2,82	1,06
8-b	133,11	1,67	376,3	0,00	0,0066	6,24	2,48	2,82	1,06
<b>MÉDIA</b>	133,11	1,84	361,2	0,00	0,0066	5,86	2,73	2,82	1,06
<b>PADRÃO</b>	133,11	4,38	472,4	0,00	0,0060	6,06	3,61	2,82	1,06

CEPA	ART <sub>CON</sub> (g)	ET <sub>PROD</sub> (g)	GLIC <sub>PROD</sub> (g)	AC <sub>PROD</sub> (g)	ART <sub>res</sub> (g)	CEL <sub>PROD</sub> (g)	CO <sub>2</sub> <sub>PROD</sub> (g)
8-a	35,23	12,95	1,04	0,89	0,60	1,96	15,90
8-b	35,16	14,70	1,12	0,74	0,50	1,97	15,60
<b>MÉDIA</b>	35,20	13,82	1,08	0,81	0,55	1,96	15,75
<b>PADRÃO</b>	34,44	14,31	1,41	1,08	1,31	1,80	15,80

CEPA	PEE	PEC	PEG	PER	PEAc	PECO <sub>2</sub>
8-a	0,3676	0,0555	0,0294	0,0170	0,0252	0,4513
8-b	0,4180	0,0559	0,0319	0,0142	0,0210	0,4436
<b>MÉDIA</b>	0,3928	0,0557	0,0307	0,0156	0,0231	0,4475
<b>PADRÃO</b>	0,4153	0,0523	0,0410	0,0380	0,0314	0,4587

	CEPA 8	padrão 8	FATOR	FATOR *peso
PEE	0,3928	0,4153	-5,42	-54,25
PEC	0,0557	0,0523	-6,61	-13,21
PEG	0,0307	0,0410	25,21	25,21
PER	0,0156	0,0380	2,24	11,21
PEAc	0,0231	0,0314	26,22	6,56
			PF =	-24,5

**Tabela C-9:** Resultados dos testes da Fermentação Alcoólica e determinação das Produções Específicas e do Potencial Fermentativo para a cepa 9.

CEPA	F.V. (g)	F.E. (g)	F.I. (g)	F.F. (g)	P <sub>mosto</sub> (g)	P <sub>vinho</sub> (g)	P <sub>inóculo</sub> (g)
9-a	381,55	661,90	691,90	675,80	280,35	294,25	30,00
9-b	311,02	608,30	638,30	621,70	297,28	310,68	30,00
<b>MÉDIA</b>				648,75	288,82	302,47	30,00
<b>PADRÃO</b>	341,18	625,90	655,80	640,00	284,72	298,82	29,90

CEPA	ART <sub>meioestéril</sub> (g/l)	ART <sub>vinho</sub> (g/l)	GLICER. (mg/100g)	MS <sub>mosto</sub> (g/g)	MS <sub>vinho</sub> (g/g)	ETANOL (v/v)	AC <sub>vinho</sub> (g/l)	AC <sub>mosto</sub> (g/l)	DENS <sub>mosto</sub> (g/ml)
9-a	133,11	2,44	472,9	0,00	0,0067	6,01	3,49	2,82	1,06
9-b	133,11	2,11	485,8	0,00	0,0066	6,17	3,25	2,82	1,06
<b>MÉDIA</b>	133,11	2,27	479,4	0,00	0,0067	6,09	3,37	2,82	1,06
<b>PADRÃO</b>	133,11	4,38	472,4	0,00	0,0060	6,06	3,61	2,82	1,06

CEPA	ART <sub>CON</sub> (g)	ET <sub>PROD</sub> (g)	GLIC <sub>PROD</sub> (g)	AC <sub>PROD</sub> (g)	ART <sub>res</sub> (g)	CEL <sub>PROD</sub> (g)	CO <sub>2</sub> <sub>PROD.</sub> (g)
9-a	34,49	13,97	1,39	1,03	0,72	1,96	16,10
9-b	36,68	15,15	1,51	1,01	0,65	2,06	16,60
<b>MÉDIA</b>	35,58	14,56	1,45	1,02	0,69	2,01	16,35
<b>PADRÃO</b>	34,44	14,31	1,41	1,08	1,31	1,80	15,80

CEPA	PEE	PEC	PEG	PER	PEAc	PECO <sub>2</sub>
9-a	0,4050	0,0568	0,0403	0,0208	0,0298	0,4668
9-b	0,4131	0,0563	0,0412	0,0179	0,0275	0,4526
<b>MÉDIA</b>	0,4091	0,0565	0,0408	0,0193	0,0286	0,4597
<b>PADRÃO</b>	0,4153	0,0523	0,0410	0,0380	0,0314	0,4587

	CEPA 9	padrão 9	FATOR	FATOR *peso
PEE	0,4091	0,4153	-1,51	-15,09
PEC	0,0565	0,0523	-8,20	-16,39
PEG	0,0408	0,0410	0,56	0,56
PER	0,0193	0,0380	1,87	9,35
PEAC	0,0286	0,0314	8,65	2,16
			PF =	-19,4

**Tabela C-10:** Resultados dos testes da Fermentação Alcoólica e determinação das Produções Específicas e do Potencial Fermentativo para a cepa 10.

CEPA	F.V. (g)	F.E. (g)	F.I. (g)	F.F. (g)	P <sub>mosto</sub> (g)	P <sub>vinho</sub> (g)	P <sub>inóculo</sub> (g)
10-a	306,36	595,10	624,90	608,60	288,74	302,24	29,80
10-b	364,01	655,80	685,80	669,70	291,79	305,69	30,00
MÉDIA				639,15	290,27	303,97	29,90
PADRÃO	341,18	625,90	655,80	640,00	284,72	298,82	29,90

CEPA	ART <sub>meioestéril</sub> (g/l)	ART <sub>vinho</sub> (g/l)	GLICER. (mg/100g)	MS <sub>mosto</sub> (g/g)	MS <sub>vinho</sub> (g/g)	ETANOL (v/v)	AC <sub>vinho</sub> (g/l)	AC <sub>mosto</sub> (g/l)	DENS <sub>mosto</sub> (g/ml)
10-a	133,11	2,18	433,7	0,00	0,0065	5,45	3,77	2,82	1,06
10-b	133,11	2,24	444,6	0,00	0,0064	6,99	3,61	2,82	1,06
MÉDIA	133,11	2,21	439,1	0,00	0,0064	6,22	3,69	2,82	1,06
PADRÃO	133,11	4,38	472,4	0,00	0,0060	6,05	3,61	2,82	1,06

CEPA	ART <sub>CON</sub> (g)	ET <sub>PROD</sub> (g)	GLIC <sub>PROD</sub> (g)	AC <sub>PROD</sub> (g)	ART <sub>res</sub> (g)	CEL <sub>PROD</sub> (g)	CO <sub>2</sub> <sub>PROD</sub> (g)
10-a	35,60	13,01	1,31	1,14	0,66	1,95	16,30
10-b	35,96	16,87	1,36	1,10	0,68	1,97	16,10
MÉDIA	35,78	14,94	1,33	1,12	0,67	1,96	16,20
PADRÃO	34,44	14,31	1,41	1,08	1,31	1,80	15,80

CEPA	PEE	PEC	PEG	PER	PEAc	PECO <sub>2</sub>
10-a	0,3654	0,0548	0,0368	0,0185	0,0320	0,4579
10-b	0,4691	0,0547	0,0378	0,0190	0,0307	0,4477
MÉDIA	0,4173	0,0548	0,0373	0,0188	0,0314	0,4528
PADRÃO	0,4153	0,0523	0,0410	0,0380	0,0314	0,4587

	CEPA 10	padrão 10	FATOR	FATOR *peso
PEE	0,4173	0,4153	0,47	4,66
PEC	0,0548	0,0523	-4,80	-9,61
PEG	0,0373	0,0410	8,96	8,96
PER	0,0188	0,0380	1,93	9,63
PEAc	0,0314	0,0314	0,00	0,00
			PF =	13,6

**Tabela C-11: Resultados dos testes da Fermentação Alcoólica e determinação das Produções Específicas e do Potencial Fermentativo para a cepa 11.**

CEPA	F.V. (g)	F.E. (g)	F.I. (g)	F.F. (g)	P <sub>mosto</sub> (g)	P <sub>vinho</sub> (g)	P <sub>inóculo</sub> (g)
11-a	285,80	585,10	615,30	603,30	299,30	317,50	30,20
11-b	382,95	681,20	711,40	699,40	298,25	316,45	30,20
<b>MÉDIA</b>				651,35	298,78	316,98	30,20
<b>PADRÃO</b>	324,89	623,10	653,00	640,80	298,21	315,91	29,90

CEPA	ART <sub>meioestéril</sub> (g/l)	ART <sub>vinho</sub> (g/l)	GLICER. (mg/100g)	MS <sub>mosto</sub> (g/g)	MS <sub>vinho</sub> (g/g)	ETANOL (v/v)	AC <sub>vinho</sub> (g/l)	AC <sub>mosto</sub> (g/l)	DENS <sub>mosto</sub> (g/ml)
11-a	122,47	30,73	502,9	0,00	0,0047	4,66	3,09	2,82	1,06
11-b	122,47	28,17	502,5	0,00	0,0049	4,81	3,00	2,82	1,06
<b>MÉDIA</b>	122,47	29,45	502,7	0,00	0,0048	4,73	3,05	2,82	1,06
<b>PADRÃO</b>	122,47	27,74	518,7	0,00	0,0049	4,91	3,03	2,82	1,06

CEPA	ART <sub>CON</sub> (g)	ET <sub>PROD</sub> (g)	GLIC <sub>PROD</sub> (g)	AC <sub>PROD</sub> (g)	ART <sub>res</sub> (g)	CEL <sub>PROD</sub> (g)	CO <sub>2</sub> <sub>PROD</sub> (g)
11-a	24,82	11,68	1,60	0,98	9,76	1,50	12,00
11-b	25,54	12,03	1,59	0,95	8,92	1,56	12,00
<b>MÉDIA</b>	25,18	11,85	1,59	0,97	9,34	1,53	12,00
<b>PADRÃO</b>	25,69	12,26	1,64	0,96	8,76	1,53	12,20

CEPA	PEE	PEC	PEG	PER	PEAc	PECO <sub>2</sub>
11-a	0,4705	0,0605	0,0643	0,3930	0,0396	0,4834
11-b	0,4709	0,0610	0,0622	0,3490	0,0372	0,4698
<b>MÉDIA</b>	0,4707	0,0607	0,0633	0,3710	0,0384	0,4766
<b>PADRÃO</b>	0,4771	0,0597	0,0638	0,3411	0,0373	0,4749

	CEPA 11	padrão 11	FATOR	FATOR *peso
PEE	0,4707	0,4771	-1,35	-13,51
PEC	0,0607	0,0597	-1,80	-3,61
PEG	0,0633	0,0638	0,77	0,77
PER	0,3710	0,3411	-3,00	-14,98
PEAc	0,0384	0,0373	-2,92	-0,73
			<b>PF =</b>	<b>-32,1</b>

**Tabela C-12: Resultados dos testes da Fermentação Alcoólica e determinação das Produções Específicas e do Potencial Fermentativo para a cepa 12.**

CEPA	F.V. (g)	F.E. (g)	F.I. (g)	F.F. (g)	P <sub>mosto</sub> (g)	P <sub>vinho</sub> (g)	P <sub>inóculo</sub> (g)
12-a	360,07	641,50	671,30	655,20	281,43	295,13	29,80
12-b	305,73	603,80	634,00	617,20	298,07	311,47	30,20
MÉDIA				636,20	289,75	303,30	30,00
PADRÃO	341,18	625,90	655,80	640,00	284,72	298,82	29,90

CEPA	ART <sub>meioestéril</sub> (g/l)	ART <sub>vinho</sub> (g/l)	GLICER. (mg/100g)	MS <sub>mosto</sub> (g/g)	MS <sub>vinho</sub> (g/g)	ETANOL (v/v)	AC <sub>vinho</sub> (g/l)	AC <sub>mosto</sub> (g/l)	DENS <sub>mosto</sub> (g/ml)
12-a	133,11	2,01	466,9	0,00	0,0060	6,30	3,25	2,82	1,06
12-b	133,11	2,16	481,7	0,00	0,0063	6,16	3,58	2,82	1,06
MÉDIA	133,11	2,08	474,3	0,00	0,0061	6,23	3,41	2,82	1,06
PADRÃO	133,11	4,38	472,4	0,00	0,0060	6,06	3,61	2,82	1,06

CEPA	ART <sub>CON</sub> (g)	ET <sub>PROD</sub> (g)	GLIC <sub>PROD</sub> (g)	AC <sub>PROD</sub> (g)	ART <sub>res</sub> (g)	CEL <sub>PROD</sub> (g)	CO <sub>2</sub> <sub>PROD</sub> (g)
12-a	34,75	14,69	1,38	0,96	0,59	1,76	16,10
12-b	36,76	15,16	1,50	1,12	0,67	1,95	16,80
MÉDIA	35,75	14,93	1,44	1,04	0,63	1,86	16,45
PADRÃO	34,44	14,31	1,41	1,08	1,31	1,80	15,80

CEPA	PEE	PEC	PEG	PER	PEAc	PECO <sub>2</sub>
12-a	0,4228	0,0508	0,0397	0,0170	0,0276	0,4633
12-b	0,4124	0,0531	0,0408	0,0183	0,0304	0,4570
MÉDIA	0,4176	0,0519	0,0402	0,0177	0,0290	0,4602
PADRÃO	0,4153	0,0523	0,0410	0,0380	0,0314	0,4587

	CEPA 12	padrão 12	FATOR	FATOR *peso
PEE	0,4176	0,4153	0,56	5,58
PEC	0,0519	0,0523	0,59	1,17
PEG	0,0402	0,0410	1,82	1,82
PER	0,0177	0,0380	2,04	10,19
PEAc	0,0290	0,0314	7,62	1,90
			PF =	20,7

**Tabela C-13: Resultados dos testes da Fermentação Alcoólica e determinação das Produções Específicas e do Potencial Fermentativo para a cepa 13.**

CEPA	F.V. (g)	F.E. (g)	F.I. (g)	F.F. (g)	P <sub>mosto</sub> (g)	P <sub>vinho</sub> (g)	P <sub>inóculo</sub> (g)
13-a	356,64	652,40	682,00	668,10	295,76	311,46	29,60
13-b	360,35	655,40	685,20	671,60	295,05	311,25	29,80
<b>MÉDIA</b>				669,85	295,41	311,36	29,70
<b>PADRÃO</b>	334,08	625,30	655,20	642,10	291,22	308,02	29,90

CEPA	ART <sub>meioestéril</sub> (g/l)	ART <sub>vinho</sub> (g/l)	GLICER. (mg/100g)	MS <sub>mosto</sub> (g/g)	MS <sub>vinho</sub> (g/g)	ETANOL (v/v)	AC <sub>vinho</sub> (g/l)	AC <sub>mosto</sub> (g/l)	DENS <sub>mosto</sub> (g/ml)
13-a	133,28	17,33	504,3	0,00	0,0052	4,35	2,54	2,82	1,06
13-b	133,28	18,66	501,5	0,00	0,0051	4,05	3,00	2,82	1,06
<b>MÉDIA</b>	133,28	17,99	502,9	0,00	0,0051	4,20	2,77	2,82	1,06
<b>PADRÃO</b>	133,28	20,51	503,8	0,00	0,0052	4,29	3,09	2,82	1,06

CEPA	ART <sub>CON</sub> (g)	ET <sub>PROD</sub> (g)	GLIC <sub>PROD</sub> (g)	AC <sub>PROD</sub> (g)	ART <sub>res</sub> (g)	CEL <sub>PROD</sub> (g)	CO <sub>2</sub> <sub>PROD</sub> (g)
13-a	31,79	10,71	1,57	0,79	5,40	1,62	13,90
13-b	31,29	9,97	1,56	0,93	5,81	1,59	13,60
<b>MÉDIA</b>	31,54	10,34	1,57	0,86	5,60	1,60	13,75
<b>PADRÃO</b>	30,30	10,44	1,55	0,95	6,32	1,60	13,10

CEPA	PEE	PEC	PEG	PER	PEAc	PECO <sub>2</sub>
13-a	0,3368	0,0509	0,0494	0,1698	0,0249	0,4372
13-b	0,3185	0,0507	0,0499	0,1856	0,0299	0,4346
<b>MÉDIA</b>	0,3276	0,0508	0,0496	0,1777	0,0274	0,4359
<b>PADRÃO</b>	0,3446	0,0529	0,0512	0,2085	0,0314	0,4323

	CEPA 13	padrão 13	FATOR	FATOR * peso
PEE	0,3276	0,3446	-4,93	-49,27
PEC	0,0508	0,0529	3,89	7,78
PEG	0,0496	0,0512	3,06	3,06
PER	0,1777	0,2085	3,08	15,39
PEAc	0,0274	0,0314	12,93	3,23
			PF =	-19,8

## APÊNDICE D

Tabelas dos Resultados dos Testes de Taxonomia Numérica  
das cepas analisadas e padrão



Tabela D-1: Resultados dos Testes da Taxonomia Numérica para a Cepa 2

		24 hs	48 hs	72 hs	Pontuação
MALTOSE ASSIMILAÇÃO	4	-	+	+	4
GALACTOSE ASSIMILAÇÃO	2	+	+	+	2
LACTOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				6
NITRATO ASSIMILAÇÃO	4		-		0
ERITRITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
AMIDO HIDRÓLISE	1		-		0
TOTAL	7				0
RIBITOL ASSIMILAÇÃO	4	-	-	-	0
37° C ASSIMILAÇÃO	2	+	+	+	2
50% GL + 10%NaCL ASSIMIL.	1	+/-	+/-	+/+	1
TOTAL	7				3
SACAROSE FERMENTAÇÃO	4	+	+	+	4
GALACTOSE FERMENTAÇÃO	2	+	+	+	2
GLICOSE FERMENTAÇÃO	1	+	+	+	1
TOTAL	7				7
SACAROSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
INOSITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
CELOBIOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				4
RAFINOSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
MANITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
MELOBIOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				4
LACTOSE FERMENTAÇÃO	4	-	-	-	0
XILOSE ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
CÉLULAS ALONGADAS	1	+			1
TOTAL	7				1

Tabela D-2: Resultados dos Testes da Taxonomia Numérica para a Cepa 3

		24 hs	48 hs	72 hs	Pontuação
MALTOSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
GALACTOSE ASSIMILAÇÃO	2	+	+	+	2
LACTOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				6
NITRATO ASSIMILAÇÃO	4		-		0
ERITRITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
AMIDO HIDRÓLISE	1		-		0
TOTAL	7				0
RIBITOL ASSIMILAÇÃO	4	-	-	-	0
37° C ASSIMILAÇÃO	2	+	+	+	2
50% GL + 10%NaCL ASSIMIL.	1	+/+	+/+	+/+	1
TOTAL	7				3
SACAROSE FERMENTAÇÃO	4	+	+	+	4
GALACTOSE FERMENTAÇÃO	2	+	+	+	2
GLICOSE FERMENTAÇÃO	1	+	+	+	1
TOTAL	7				7
SACAROSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
INOSITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
CELOBIOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				4
RAFINOSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
MANITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
MELOBIOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				4
LACTOSE FERMENTAÇÃO	4	-	-	-	0
XILOSE ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
CÉLULAS ALONGADAS	1	+			1
TOTAL	7				1

**Tabela D-3:** Resultados dos Testes da Taxonomia Numérica para a Cepa 4

		24 hs	48 hs	72 hs	Pontuação
MALTOSE ASSIMILAÇÃO	4	-	-	+	4
GALACTOSE ASSIMILAÇÃO	2	+	+	+	2
LACTOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				6
NITRATO ASSIMILAÇÃO	4		-		0
ERITRITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
AMIDO HIDRÓLISE	1		-		0
TOTAL	7				0
RIBITOL ASSIMILAÇÃO	4	-	-	-	0
37° C ASSIMILAÇÃO	2	+	+	+	2
50% GL + 10%NaCL ASSIMIL.	1	+/-	+/-	+/+	1
TOTAL	7				3
SACAROSE FERMENTAÇÃO	4	+	+	+	4
GALACTOSE FERMENTAÇÃO	2	+	+	+	2
GLICOSE FERMENTAÇÃO	1	+	+	+	1
TOTAL	7				7
SACAROSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
INOSITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
CELOBIOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				4
RAFINOSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
MANITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
MELOBIOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				4
LACTOSE FERMENTAÇÃO	4	-	-	-	0
XILOSE ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
CELULAS ALONGADAS	1	+			1
TOTAL	7				1

Tabela D-4: Resultados dos Testes da Taxonomia Numérica para a Cepa 5

		24 hs	48 hs	72 hs	Pontuação
MALTOSE ASSIMILAÇÃO	4	-	+	+	4
GALACTOSE ASSIMILAÇÃO	2	+	+	+	2
LACTOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				6
NITRATO ASSIMILAÇÃO	4		-		0
ERITRITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
AMIDO HIDRÓLISE	1		-		0
TOTAL	7				0
RIBITOL ASSIMILAÇÃO	4	-	-	-	0
37° C ASSIMILAÇÃO	2	+	+	+	2
50% GL + 10%NaCL ASSIMIL.	1	+/-	+/+	+/+	1
TOTAL	7				3
SACAROSE FERMENTAÇÃO	4	+	+	+	4
GALACTOSE FERMENTAÇÃO	2	+	+	+	2
GLICOSE FERMENTAÇÃO	1	+	+	+	1
TOTAL	7				7
SACAROSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
INOSITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
CELOBIOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				4
RAFINOSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
MANITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
MELOBIOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				4
LACTOSE FERMENTAÇÃO	4	-	-	-	0
XILOSE ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
CÉLULAS LONGADAS	1	+			1
TOTAL	7				1

**Tabela D-5:** Resultados dos Testes da Taxonomia Numérica para a **Cepa 6**

		24 hs	48 hs	72 hs	Pontuação
MALTOSE ASSIMILAÇÃO	4	-	+	+	4
GALACTOSE ASSIMILAÇÃO	2	+	+	+	2
LACTOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				6
NITRATO ASSIMILAÇÃO	4		-		0
ERITRITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
AMIDO HIDRÓLISE	1		-		0
TOTAL	7				0
RIBITOL ASSIMILAÇÃO	4	-	-	-	0
37° C ASSIMILAÇÃO	2	+	+	+	2
50% GL + 10%NaCL ASSIMIL.	1	+/-	+/+	+/+	1
TOTAL	7				3
SACAROSE FERMENTAÇÃO	4	+	+	+	4
GALACTOSE FERMENTAÇÃO	2	+	+	+	2
GLICOSE FERMENTAÇÃO	1	+	+	+	1
TOTAL	7				7
SACAROSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
INOSITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
CELOBIOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				4
RAFINOSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
MANITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
MELOBIOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				4
LACTOSE FERMENTAÇÃO	4	-	-	-	0
XILOSE ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
CÉLULAS LONGADAS	1	+			1
TOTAL	7				1

**Tabela D-6:** Resultados dos Testes da Taxonomia Numérica para a Cepa 7

		24 hs	48 hs	72 hs	Pontuação
MALTOSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
GALACTOSE ASSIMILAÇÃO	2	+	+	+	2
LACTOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				6
NITRATO ASSIMILAÇÃO	4		-		0
ERITRITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
AMIDO HIDRÓLISE	1		-		0
TOTAL	7				0
RIBITOL ASSIMILAÇÃO	4	-	-	-	0
37° C ASSIMILAÇÃO	2	+	+	+	2
50% GL + 10%NaCL ASSIMIL.	1	+/+	+/+	+/+	1
TOTAL	7				3
SACAROSE FERMENTAÇÃO	4	+	+	+	4
GALACTOSE FERMENTAÇÃO	2	+	+	+	2
GLICOSE FERMENTAÇÃO	1	+	+	+	1
TOTAL	7				7
SACAROSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
INOSITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
CELOBIOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				4
RAFINOSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
MANITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
MELOBIOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				4
LACTOSE FERMENTAÇÃO	4	-	-	-	0
XILOSE ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
CÉLULAS ALONGADAS	1	+			1
TOTAL	7				1

**Tabela D-7:** Resultados dos Testes da Taxonomia Numérica para a **Cepa 8**

		24 hs	48 hs	72 hs	Pontuação
MALTOSE ASSIMILAÇÃO	4	-	+	+	4
GALACTOSE ASSIMILAÇÃO	2	+	+	+	2
LACTOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				6
NITRATO ASSIMILAÇÃO	4		-		0
ERITRITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
AMIDO HIDRÓLISE	1		-		0
TOTAL	7				0
RIBITOL ASSIMILAÇÃO	4	-	-	-	0
37° C ASSIMILAÇÃO	2	+	+	+	2
50% GL + 10%NaCL ASSIMIL.	1	+/+	+/+	+/+	1
TOTAL	7				3
SACAROSE FERMENTAÇÃO	4	+	+	+	4
GALACTOSE FERMENTAÇÃO	2	+	+	+	2
GLICOSE FERMENTAÇÃO	1	+	+	+	1
TOTAL	7				7
SACAROSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
INOSITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
CELOBIOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				4
RAFINOSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
MANITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
MELOBIOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				4
LACTOSE FERMENTAÇÃO	4	-	-	-	0
XILOSE ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
CÉLULAS LONGADAS	1	+			1
TOTAL	7				1

**Tabela D-8:** Resultados dos Testes da Taxonomia Numérica para a **Cepa 9**

		24 hs	48 hs	72 hs	Pontuação
MALTOSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
GALACTOSE ASSIMILAÇÃO	2	+	+	+	2
LACTOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				6
NITRATO ASSIMILAÇÃO	4		-		0
ERITRITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
AMIDO HIDRÓLISE	1		-		0
TOTAL	7				0
RIBITOL ASSIMILAÇÃO	4	-	-	-	0
37° C ASSIMILAÇÃO	2	+	+	+	2
50% GL + 10%NaCL ASSIMIL.	1	+/+	+/+	+/+	1
TOTAL	7				3
SACAROSE FERMENTAÇÃO	4	+	+	+	4
GALACTOSE FERMENTAÇÃO	2	+	+	+	2
GLICOSE FERMENTAÇÃO	1	+	+	+	1
TOTAL	7				7
SACAROSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
INOSITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
CELOBIOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				4
RAFINOSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
MANITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
MELOBIOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				4
LACTOSE FERMENTAÇÃO	4	-	-	-	0
XILOSE ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
CÉLULAS ALONGADAS	1	+			1
TOTAL	7				1



**Tabela D-9:** Resultados dos Testes da Taxonomia Numérica para a **Cepa 10**

		24 hs	48 hs	72 hs	Pontuação
MALTOSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
GALACTOSE ASSIMILAÇÃO	2	+	+	+	2
LACTOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				6
NITRATO ASSIMILAÇÃO	4		-		0
ERITRITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
AMIDO HIDRÓLISE	1		-		0
TOTAL	7				0
RIBITOL ASSIMILAÇÃO	4	-	-	-	0
37° C ASSIMILAÇÃO	2	+	+	+	2
50% GL + 10%NaCL ASSIMIL.	1	+/-	+/-	+/+	1
TOTAL	7				3
SACAROSE FERMENTAÇÃO	4	+	+	+	4
GALACTOSE FERMENTAÇÃO	2	+	+	+	2
GLICOSE FERMENTAÇÃO	1	+	+	+	1
TOTAL	7				7
SACAROSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
INOSITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
CELOBIOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				4
RAFINOSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
MANITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
MELOBIOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				4
LACTOSE FERMENTAÇÃO	4	-	-	-	0
XILOSE ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
CELULAS ALONGADAS	1	+			1
TOTAL	7				1

Tabela D-10: Resultados dos Testes da Taxonomia Numérica para a Cepa 11

		24 hs	48 hs	72 hs	Pontuação
MALTOSE ASSIMILAÇÃO	4	-	+	+	4
GALACTOSE ASSIMILAÇÃO	2	+	+	+	2
LACTOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				6
NITRATO ASSIMILAÇÃO	4		-		0
ERITRITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
AMIDO HIDRÓLISE	1		-		0
TOTAL	7				0
RIBITOL ASSIMILAÇÃO	4	-	-	-	0
37° C ASSIMILAÇÃO	2	+	+	+	2
50% GL + 10%NaCL ASSIMIL.	1	+/-	+/+	+/+	1
TOTAL	7				3
SACAROSE FERMENTAÇÃO	4	+	+	+	4
GALACTOSE FERMENTAÇÃO	2	+	+	+	2
GLICOSE FERMENTAÇÃO	1	+	+	+	1
TOTAL	7				7
SACAROSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
INOSITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
CELOBIOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				4
RAFINOSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
MANITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
MELOBIOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				4
LACTOSE FERMENTAÇÃO	4	-	-	-	0
XILOSE ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
CÉLULAS ALONGADAS	1	+			1
TOTAL	7				1

Tabela D-11: Resultados dos Testes da Taxonomia Numérica para a Cepa 12

		24 hs	48 hs	72 hs	Pontuação
MALTOSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
GALACTOSE ASSIMILAÇÃO	2	+	+	+	2
LACTOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				6
NITRATO ASSIMILAÇÃO	4		-		0
ERITRITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
AMIDO HIDRÓLISE	1		-		0
TOTAL	7				0
RIBITOL ASSIMILAÇÃO	4	-	-	-	0
37° C ASSIMILAÇÃO	2	+	+	+	2
50% GL + 10%NaCL ASSIMIL.	1	+/+	+/+	+/+	1
TOTAL	7				3
SACAROSE FERMENTAÇÃO	4	+	+	+	4
GALACTOSE FERMENTAÇÃO	2	+	+	+	2
GLICOSE FERMENTAÇÃO	1	+	+	+	1
TOTAL	7				7
SACAROSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
INOSITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
CELOBIOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				4
RAFINOSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
MANITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
MELOBIOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				4
LACTOSE FERMENTAÇÃO	4	-	-	-	0
XILOSE ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
CÉLULAS ALONGADAS	1	+			1
TOTAL	7				1

**Tabela D-12:** Resultados dos Testes da Taxonomia Numérica para a Cepa 13

		24 hs	48 hs	72 hs	Pontuação
MALTOSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
GALACTOSE ASSIMILAÇÃO	2	+	+	+	2
LACTOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				6
NITRATO ASSIMILAÇÃO	4		-		0
ERITRITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
AMIDO HIDROLISE	1		-		0
TOTAL	7				0
RIBITOL ASSIMILAÇÃO	4	-	-	-	0
37° C ASSIMILAÇÃO	2	+	+	+	2
50% GL + 10%NaCL ASSIMIL.	1	+/+	+/+	+/+	1
TOTAL	7				3
SACAROSE FERMENTAÇÃO	4	+	+	+	4
GALACTOSE FERMENTAÇÃO	2	+	+	+	2
GLICOSE FERMENTAÇÃO	1	+	+	+	1
TOTAL	7				7
SACAROSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
INOSITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
CELOBIOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				4
RAFINOSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
MANITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
MELOBIOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				4
LACTOSE FERMENTAÇÃO	4	-	-	-	0
XILOSE ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
CÉLULAS ALONGADAS	1	+			1
TOTAL	7				1

**Tabela D-13:** Resultados dos Testes da Taxonomia Numérica para a Cepa Padrão

		24 hs	48 hs	72 hs	Pontuação
MALTOSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
GALACTOSE ASSIMILAÇÃO	2	+	+	+	2
LACTOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				6
NITRATO ASSIMILAÇÃO	4		-		0
ERITRITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
AMIDO HIDRÓLISE	1		-		0
TOTAL	7				0
RIBITOL ASSIMILAÇÃO	4	-	-	-	0
37° C ASSIMILAÇÃO	2	+	+	+	2
50% GL + 10%NaCL ASSIMIL.	1	+/+	+/+	+/+	1
TOTAL	7				3
SACAROSE FERMENTAÇÃO	4	+	+	+	4
GALACTOSE FERMENTAÇÃO	2	+	+	+	2
GLICOSE FERMENTAÇÃO	1	+	+	+	1
TOTAL	7				7
SACAROSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
INOSITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
CELOBIOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				4
RAFINOSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
MANITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
MELOBIOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				4
LACTOSE FERMENTAÇÃO	4	-	-	-	0
XILOSE ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
CÉLULAS ALONGADAS	1	+			1
TOTAL	7				1

## APÊNDICE E

Tabelas dos Resultados dos Testes da Fermentação e Determinação das Produções Específicas e do Potencial Fermentativo da cepa padrão crescida em meios com Extrato de Levedura Difco, Biobrás e Oxoid

**Tabela E-1:** Resultados dos testes da Fermentação Alcoólica e determinação das Produções Específicas e do Potencial Fermentativo para a **cepa Padrão com extrato de levedura Difco**

CEPA	F.V. (g)	F.E. (g)	F.I. (g)	F.F. (g)	P <sub>mosto</sub> (g)	P <sub>vinho</sub> (g)	P <sub>inóculo</sub> (g)
Padrão a	311,87	607,50	637,70	621,50	295,63	309,63	30,20
Padrão b	339,32	636,00	665,90	649,60	296,68	310,28	29,90
<b>MÉDIA</b>				635,55	296,16	309,96	30,05
<b>Padrão Biobrás</b>	282,87	576,50	606,00	590,00	293,63	307,13	29,50

CEPA	ART <sub>meioestéril</sub> (g/l)	ART <sub>vinho</sub> (g/l)	GLICER. (mg/100g)	MS <sub>mosto</sub> (g/g)	MS <sub>vinho</sub> (g/g)	ETANOL (v/v)	AC <sub>vinho</sub> (g/l)	AC <sub>mosto</sub> (g/l)	DENS <sub>mosto</sub> (g/ml)
Padrão a	131,91	1,81	460,1	0,00	0,0070	5,77	2,94	2,82	1,02
Padrão b	131,91	1,73	468,3	0,00	0,0071	5,71	3,06	2,82	1,02
<b>MÉDIA</b>	131,91	1,77	464,2	0,00	0,0070	5,74	3,00	2,82	1,02
<b>Padrão Biobrás</b>	133,24	2,71	470,6	0,00	0,0064	5,85	3,25	2,82	1,02

CEPA	ART <sub>CON</sub> (g)	ET <sub>PROD</sub> (g)	GLIC <sub>PROD</sub> (g)	AC <sub>PROD</sub> (g)	ART <sub>res</sub> (g)	CEL <sub>PROD</sub> (g)	CO <sub>2</sub> <sub>PROD</sub> (g)
Padrão a	37,71	14,10	1,42	0,91	0,56	2,15	16,20
Padrão b	37,87	14,00	1,45	0,95	0,54	2,20	16,30
<b>MÉDIA</b>	37,79	14,05	1,44	0,93	0,55	2,18	16,25
<b>Padrão Biobrás</b>	37,56	14,19	1,45	1,00	0,83	1,98	16,00

CEPA	PEE	PEC	PEG	PER	PEAc	PECO <sub>2</sub>
Padrão a	0,3740	0,0571	0,0378	0,0149	0,0241	0,4296
Padrão b	0,3697	0,0582	0,0384	0,0141	0,0251	0,4304
<b>MÉDIA</b>	0,3718	0,0577	0,0381	0,0145	0,0246	0,4300
<b>Padrão Biobrás</b>	0,3778	0,0527	0,0385	0,0222	0,0265	0,4260

	Cepa padrão Difco	Cepa padrão Biobrás	FATOR	FATOR *peso
PEE	0,3718	0,3778	-1,58	-15,84
PEC	0,0577	0,0527	-9,41	-18,81
PEG	0,0381	0,0385	1,05	1,05
PER	0,0145	0,0222	0,77	3,83
PEAC	0,0246	0,0265	7,25	1,81
			<b>PF =</b>	<b>-28,0</b>

**Tabela E-2: Resultados dos testes da Fermentação Alcoólica e determinação das Produções Específicas e do Potencial Fermentativo para a cepa Padrão com extrato de levedura Oxoid**

CEPA	F.V. (g)	F.E. (g)	F.I. (g)	F.F. (g)	P <sub>mosto</sub> (g)	P <sub>vinho</sub> (g)	P <sub>inóculo</sub> (g)
Padrão a	304,97	603,90	633,90	620,70	298,93	315,73	30,00
Padrão b	311,83	591,00	620,90	610,10	279,17	298,27	29,90
<b>MÉDIA</b>				615,40	289,05	307,00	29,95
<b>Padrão Biobrás</b>	282,87	576,50	606,00	590,00	293,63	307,13	29,50

CEPA	ART <sub>meioestéril</sub> (g/l)	ART <sub>vinho</sub> (g/l)	GLICER. (mg/100g)	MS <sub>mosto</sub> (g/g)	MS <sub>vinho*</sub> (g/g)	ETANOL (v/v)	AC <sub>vinho</sub> (g/l)	AC <sub>mosto</sub> (g/l)	DENS <sub>mosto</sub> (g/ml)
Padrão a	134,35	13,77	477,5	0,00	0,0051	4,42	3,28	2,82	1,02
Padrão b	134,35	14,28	446,4	0,00	0,0050	4,53	3,03	2,82	1,02
<b>MÉDIA</b>	134,35	14,02	462,0	0,00	0,0050	4,47	3,15	2,82	1,02
<b>Padrão Biobrás</b>	133,24	2,71	470,6	0,00	0,0064	5,85	3,25	2,82	1,02

CEPA	ART <sub>CON</sub> (g)	ET <sub>PROD</sub> (g)	GLIC <sub>PROD</sub> (g)	AC <sub>PROD</sub> (g)	ART <sub>res</sub> (g)	CEL <sub>PROD</sub> (g)	CO <sub>2</sub> <sub>PROD</sub> (g)
Padrão a	35,06	11,02	1,51	1,03	4,35	1,60	13,20
Padrão b	32,55	10,67	1,33	0,90	4,26	1,49	10,80
<b>MÉDIA</b>	33,81	10,84	1,42	0,97	4,30	1,55	12,00
<b>Padrão Biobrás</b>	37,56	14,19	1,45	1,00	0,83	1,98	16,00

CEPA	PEE	PEC	PEG	PER	PEAc	PECO <sub>2</sub>
Padrão a	0,3142	0,0456	0,0430	0,1240	0,0295	0,3764
Padrão b	0,3277	0,0459	0,0409	0,1308	0,0278	0,3318
<b>MÉDIA</b>	0,3210	0,0457	0,0420	0,1274	0,0286	0,3541
<b>Padrão Biobrás</b>	0,3778	0,0527	0,0385	0,0222	0,0265	0,4260

	Cepa padrão Oxoid	Cepa padrão Biobrás	FATOR	FATOR *peso
PEE	0,3210	0,3778	-15,05	-150,50
PEC	0,0457	0,0527	13,26	26,52
PEG	0,0420	0,0385	-9,03	-9,03
PER	0,1274	0,0222	-10,53	-52,63
PEAC	0,0286	0,0265	-7,93	-1,98
			<b>PF =</b>	<b>-187,6</b>



## **APÊNDICE F**

**Tabelas dos Resultados dos Testes da Fermentação e Determinação das  
Produções Específicas e do Potencial Fermentativo e Taxonomia  
Numérica de duas cepas atípicas ao processo**

**Tabela F-1.** Resultados dos testes da Fermentação Alcoólica e determinação das Produções Específicas e do Potencial Fermentativo para a cepa *Candida tropicalis*

CEPA	F.V. (g)	F.E. (g)	F.I. (g)	F.F. (g)	P <sub>mosto</sub> (g)	P <sub>vinho</sub> (g)	P <sub>inóculo</sub> (g)
a	362,25	666,30	695,60	676,60	304,05	314,35	29,30
b	361,54	664,40	694,40	676,40	302,86	314,86	30,00
<b>MÉDIA</b>				676,50	303,46	314,61	29,65
<b>PADRÃO</b>	283,78	587,90	618,00	601,10	304,12	317,32	30,10

CEPA	ART <sub>meioestéril</sub> (g/l)	ART <sub>vinho</sub> (g/l)	GLICER. (mg/100g)	MS <sub>mosto</sub> (g/g)	MS <sub>vinho</sub> (g/g)	ETANOL (v/v)	AC <sub>vinho</sub> (g/l)	AC <sub>mosto</sub> (g/l)	DENS <sub>mosto</sub> (g/ml)
a	113,22	1,32	398,6	0,00	0,0064	4,47	3,28	2,82	1,06
b	113,22	1,35	358,1	0,00	0,0060	5,19	3,00	2,82	1,06
<b>MÉDIA</b>	113,22	1,34	378,3	0,00	0,0062	4,83	3,14	2,82	1,06
<b>PADRÃO</b>	113,22	3,42	382,4	0,00	0,0062	4,78	3,15	2,82	1,06

CEPA	ART <sub>CON</sub> (g)	ET <sub>PROD</sub> (g)	GLIC <sub>PROD</sub> (g)	AC <sub>PROD</sub> (g)	ART <sub>res</sub> (g)	CEL <sub>PROD</sub> (g)	CO <sub>2</sub> <sub>PROD</sub> (g)
a	32,06	11,11	1,25	1,03	0,42	2,02	19,00
b	31,92	12,90	1,13	0,94	0,42	1,89	18,00
<b>MÉDIA</b>	31,99	12,01	1,19	0,99	0,42	1,95	18,50
<b>PADRÃO</b>	31,40	11,97	1,21	1,00	1,09	1,96	16,90

CEPA	PEE	PEC	PEG	PER	PEAc	PECO <sub>2</sub>
a	0,3464	0,0629	0,0391	0,0130	0,0321	0,5926
b	0,4042	0,0592	0,0353	0,0133	0,0296	0,5638
<b>MÉDIA</b>	0,3753	0,0611	0,0372	0,0131	0,0309	0,5782
<b>PADRÃO</b>	0,3812	0,0623	0,0386	0,0346	0,0319	0,5382

	CEPA	padrão	FATOR	FATOR *peso
PEE	0,3753	0,3812	-1,55	-15,54
PEC	0,0611	0,0623	2,02	4,04
PEG	0,0372	0,0386	3,76	3,76
PER	0,0131	0,0346	2,14	10,72
PEAC	0,0309	0,0319	3,17	0,79
			<b>PF =</b>	<b>3,8</b>

**Tabela F-2:** Resultados dos testes da Fermentação Alcoólica e determinação das Produções Específicas e do Potencial Fermentativo para a cepa *S. bayanus*

CEPA	F.V. (g)	F.E. (g)	F.I. (g)	F.F. (g)	P <sub>mosto</sub> (g)	P <sub>vinho</sub> (g)	P <sub>inóculo</sub> (g)
a	311,86	609,40	639,50	630,10	297,54	318,24	30,10
b	363,85	660,10	690,00	680,80	296,25	316,95	29,90
MÉDIA				655,45	296,90	317,60	30,00
PADRÃO	282,33	576,70	606,50	590,50	294,37	308,17	29,80

CEPA	ART <sub>meioestéril</sub> (g/l)	ART <sub>vinho</sub> (g/l)	GLICER. (mg/100g)	MS <sub>mosto</sub> (g/g)	MS <sub>vinho</sub> (g/g)	ETANOL (v/v)	AC <sub>vinho</sub> (g/l)	AC <sub>mosto</sub> (g/l)	DENS <sub>mosto</sub> (g/ml)
a	113,22	37,28	704,3	0,00	0,0054	3,90	2,94	2,82	1,019
b	113,22	36,23	663,3	0,00	0,0060	3,60	3,19	2,82	1,019
MÉDIA	113,22	36,75	683,8	0,00	0,0057	3,75	3,06	2,82	1,019
PADRÃO	113,22	1,47	468,7	0,00	0,0069	5,70	3,49	2,82	1,019

CEPA	ART <sub>CON</sub> (g)	ET <sub>PROD</sub> (g)	GLIC <sub>PROD</sub> (g)	AC <sub>PROD</sub> (g)	ART <sub>Tres</sub> (g)	CEL <sub>PROD</sub> (g)	CO <sub>2</sub> <sub>PROD</sub> (g)
a	21,20	9,79	2,24	0,94	11,86	1,71	9,40
b	21,43	9,02	2,10	1,01	11,48	1,92	9,20
MÉDIA	21,32	9,41	2,17	0,97	11,67	1,81	9,30
PADRÃO	32,25	13,87	1,44	1,08	0,45	2,13	16,00

CEPA	PEE	PEC	PEG	PER	PEAc	PECO <sub>2</sub>
a	0,4621	0,0807	0,1057	0,5597	0,0441	0,4435
b	0,4210	0,0894	0,0981	0,5357	0,0471	0,4292
MÉDIA	0,4415	0,0850	0,1019	0,5477	0,0456	0,4363
PADRÃO	0,4300	0,0661	0,0448	0,0140	0,0334	0,4961

	CEPA	padrão	FATOR	FATOR *peso
PEE	0,4415	0,4300	2,68	26,80
PEC	0,0850	0,0661	-28,72	-57,45
PEG	0,1019	0,0448	-127,58	-127,58
PER	0,5477	0,0140	-53,37	-266,83
PEAc	0,0456	0,0334	-36,77	-9,19
			PF =	-434,2

Tabela F-3: Resultados dos Testes da Taxonomia Numérica para a Cepa *C. tropicalis*

		24 hs	48 hs	72 hs	Pontuação
MALTOSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
GALACTOSE ASSIMILAÇÃO	2	+	+	+	2
LACTOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				6
NITRATO ASSIMILAÇÃO	4		-		0
ERITRITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
AMIDO HIDRÓLISE	1		+		1
TOTAL	7				1
RIBITOL ASSIMILAÇÃO	4	-	-	+	4
37° C ASSIMILAÇÃO	2	+	+	+	2
50% GL + 10%NaCL ASSIMIL.	1	-/-	+/+	+/+	1
TOTAL	7				7
SACAROSE FERMENTAÇÃO	4	+	+	+	4
GALACTOSE FERMENTAÇÃO	2	-	+	+	2
GLICOSE FERMENTAÇÃO	1	+	+	+	1
TOTAL	7				7
SACAROSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
INOSITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
CELOBIOSE ASSIMILAÇÃO	1	+	+	+	1
TOTAL	7				5
RAFINOSE ASSIMILAÇÃO	4	-	+	+	4
MANITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	+	2
MELOBIOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				6
LACTOSE FERMENTAÇÃO	4	-	-	-	0
XILOSE ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
CÉLULAS ALONGADAS	1	+			1
TOTAL	7				1

Tabela F-4: Resultados dos Testes da Taxonomia Numérica para a Cepas *S. bayanus*

		24 hs	48 hs	72 hs	Pontuação
MALTOSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
GALACTOSE ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	2
LACTOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				4
NITROATO ASSIMILAÇÃO	4		-		0
ERITRITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
AMIDO HIDROLISE	1		-		0
TOTAL	7				0
RIBITOL ASSIMILAÇÃO	4	-	-	-	0
37° C ASSIMILAÇÃO	2	+	+	+	2
50% GL + 10%NaCL ASSIMIL.	1	-/-	+/+	+/+	1
TOTAL	7				3
SACAROSE FERMENTAÇÃO	4	+	+	+	4
GALACTOSE FERMENTAÇÃO	2	-	-	-	0
GLICOSE FERMENTAÇÃO	1	+	+	+	1
TOTAL	7				5
SACAROSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
INOSITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
CELOBIOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				4
RAFINOSE ASSIMILAÇÃO	4	+	+	+	4
MANITOL ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
MELOBIOSE ASSIMILAÇÃO	1	-	-	-	0
TOTAL	7				4
LACTOSE FERMENTAÇÃO	4	-	-	-	0
XILOSE ASSIMILAÇÃO	2	-	-	-	0
CÉLULAS ALONGADAS	1	+			1
TOTAL	7				1