

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Parcer
Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Pedro de Oliva Neto e aprovada pelo Conselho Julgador em 12.12.90.
Campinas, 12 de dezembro de 1990.

[Assinatura]
Presidente da Banca

INFLUÊNCIA DA CONTAMINAÇÃO POR BACTÉRIAS

LÁCTICAS NA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA PELO

PROCESSO DE BATELADA ALIMENTADA

Exemplar 3450
Pedro de Oliva Neto

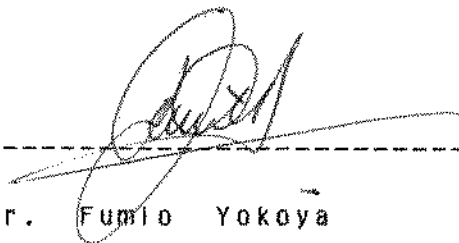
16/90
Prof. Dr. Fumio Yokoya

Orientador

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

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

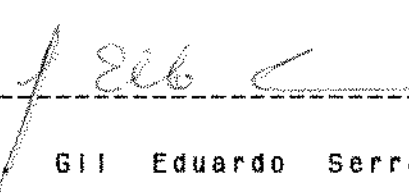
BANCA EXAMINADORA



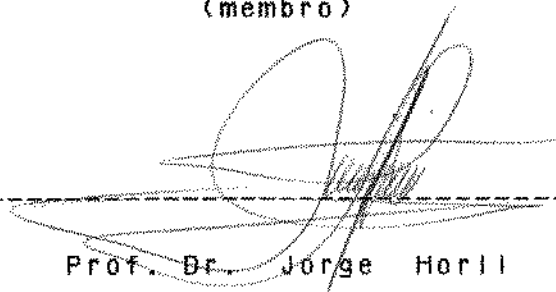
Prof. Dr. Fumio Yokoya
(Orientador)

Suplente

Profª. Dra. Pilar Rodrigues de Massaguer
(membro)



Prof. Dr. Gil Eduardo Serra
(membro)



Prof. Dr. Jorge Horii
(membro)

Campinas, 12 de dezembro de 1990

AGRADECIMENTOS

À Deus que nos momentos mais difíceis não deixou faltar otimismo e perseverança para dar continuidade ao trabalho.

Ao Prof. Dr. Fumio Yokoya pelo incentivo, amizade e orientação contantes durante a realização deste trabalho.

À Prof. Dra. Pilar Rodrigues de Massaguer pela amizade, solidariedade nos momentos difíceis e pela atenciosa revisão da tese.

Ao Prof. Dr. Gil Eduardo Serra e ao Prof. Dr. Jorge Horii pela atenciosa revisão da tese.

Às técnicas Rosa e Jaqueline, do laboratório de microbiologia de alimentos da FEA-UNICAMP, que sempre colaboraram com muita boa vontade no decorrer deste trabalho.

À todos os colegas e funcionários do laboratório de microbiologia da FEA-UNICAMP.

À ABIA, pelas cópias xerox.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À minha esposa Patrícia

ÍNDICE

página

RESUMO

SUMMARY

INTRODUÇÃO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 4

1. O Processo de Batelada Alimentada 4

2. Influência de produtos na fermentação alcoólica 9

2.1 Influência do Etanol..... 9

2.2 Influência de Ácidos Orgânicos..... 13

3. Microflora Bacteriana da Cana-de-açúcar..... 18

4. Microflora do caldo de cana..... 20

5. Microflora do melaço..... 24

6. Microrganismos produtores de goma..... 25

7. Contaminação Microbiana na Fermentação Alcoólica..... 27

MATERIAIS E MÉTODOS..... 32

1. Isolamento, taxonomia e seleção do contaminante..... 32

1.1 Amostragem e enumeração..... 32

1.2 Isolamento das culturas..... 33

1.3 Purificação e manutenção das culturas..... 33

1.4	Caracterização preliminar	35
1.5	Identificação das culturas.....	35
1.6	Testes utilizados para a identificação	39
1.6.1	Catalase.....	39
1.6.2	Pseudocatalase.....	40
1.6.3	Citocromo oxidase.....	40
1.6.4	Formação de esporos.....	40
1.6.5	Produção de gás carbônico.....	41
1.6.6	Fermentação de carboidratos.....	41
1.6.7	Litmus Milk.....	42
1.6.8	Crescimento nas temperaturas 15 e 45 ⁰ C.....	43
1.7	Testes usados na seleção do contaminante.....	43
1.7.1	Resistência ao álcool etílico.....	43
1.7.2	Floculação do fermento.....	44
1.8	Seleção do agente contaminante	44
2.	Fermentação alcoólica em condição mista	45
2.1	Mosto para fermentação.....	45
2.2	Inóculo.....	45
2.3	Descrição do equipamento.....	47
2.4	Descrição de um ciclo fermentativo.....	49
2.4.1	Condições experimentais.....	50
2.4.2	Tratamento das amostras do mosto fermentado....	50
2.5	Técnicas analíticas.....	52
2.5.1	Análise do microrganismos.....	52
2.5.1.1	Relação levedura/bactéria.....	52
2.5.1.2	Número de células.....	52
2.5.1.3	Concentração celular.....	55

2.5.1.4 Viabilidade e brotamento das leveduras....	55
2.5.2 Determinação de açúcares totais - ART	56
2.5.3 Determinação da concentração de etanol.....	56
2.5.4 Determinação do pH.....	57
2.5.5 Determinação da acidez total.....	57
2.6 Cálculos	58
2.6.1 Rendimento	58
2.6.2 Produtividade de etanol.....	58
2.6.3 Produtividade de células.....	59
2.6.4 Taxa de consumo de açúcar	60
2.6.5 Fator de conversão - Y_p/s	61
2.6.6 Fator de conversão - Y_p/s_0	61
2.6.7 Porcentagem de açúcar consumido.....	62

RESULTADOS E DISCUSSÃO SOBRE AS CULTURAS

ISOLADAS.....	63
1. ANÁLISE QUANTITATIVA.....	63
2. CARACTERÍSTICAS DAS BACTÉRIAS ISOLADAS DO "LEITE".....	64
2.1 Características da bactéria em forma de coco.....	64
2.2 Características das bactérias em forma de bastonetes.	66
2.3 Resistência a álcool e floculação.....	73

RESULTADOS DOS ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO.....	78
1. RESULTADOS DO 1o AO 6o CICLO	78
1.1 1o Ciclo - Dia 25/11/89.....	78
1.2 2o Ciclo - Dia 26/11/89.....	82
1.3 3o Ciclo - Dia 27/11/89.....	86
1.4 4o Ciclo - Dia 28/11/89.....	90
1.5 5o Ciclo - Dia 29/11/89.....	94
1.6 6o Ciclo - Dia 30/11/89.....	98
1.7 Análise do 1o ao 6o Ciclo.....	102
2. RESULTADOS DO 7o AO 9o CICLO.....	104
2.1 7o Ciclo - Dia 01/12/89.....	104
2.2 8o Ciclo - Dia 02/12/89.....	108
2.3 9o Ciclo - Dia 03/12/89.....	112
2.4 Análise do 7o ao 9o Ciclo	116
3. RESULTADOS DO 10o AO 16o CICLO.....	117
3.1 10o Ciclo - Dia 04/12/89.....	117
3.2 11o Ciclo - Dia 05/12/89.....	118
3.3 12o Ciclo - Dia 06/12/89.....	119
3.4 13o Ciclo - Dia 07/12/89.....	123
3.5 14o Ciclo - Dia 08/12/89.....	127
3.5 15o Ciclo - Dia 09/12/89.....	131
3.6 16o Ciclo - Dia 10/12/89.....	135

3.7 17o Ciclo - Dia 11/12/89.....	139
3.8 18o Ciclo - Dia 12/12/89.....	143
3.9 Análise do 10o ao 18o Ciclo.....	147
4. RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS NOS 18 CICLOS.....	149
DISCUSSÃO DOS ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO.....	156
1. O PROCESSO DE FERMENTAÇÃO UTILIZADO.....	156
2. CONDIÇÕES VITAIS DAS LEVEDURAS (FERMENTO).....	160
3. PRODUÇÃO DE ETANOL.....	174
CONCLUSÕES.....	182
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	184
APÊNDICE.....	200
NOMECLATURA.....	201

RESUMO

Este trabalho foi realizado em duas etapas: uma envolvendo isolamento, taxonomia e testes de resistência ao etanol e floculação do fermento comercial, no intuito de selecionar bactérias lácticas, naturalmente contaminantes de dornas de fermentação. Na segunda etapa, foi montado um sistema piloto de bancada para realização dos ensaios de fermentação, inoculando com uma bactéria selecionada na primeira etapa - o *Lactobacillus fermentum* n° 28, simulando-se a infecção bacteriana das dornas de fermentação nas usinas, através do processo cíclico de batelada alimentada.

Para a primeira etapa, a amostragem foi feita do "leite de leveduras", sem tratamento ácido, obtido de duas destilarias anexas no mes de agosto de 1988. A primeira - Usina Santa Adélia (Jaboticabal-SP) - apresentava problemas microbiológicos e a segunda - Usina Modelo - operava normalmente.

Os resultados da taxonomia demonstraram que a bactéria predominantemente encontrada foi *Lactobacillus fermentum* (62%), seguida de *Lactobacillus murinus* (9%), *Lactobacillus vaccinostercus* (9%), *Lactobacillus plantarum* (2%) e *Leuconostoc* (2%). Dentre os lactobacilos houve um predomínio do tipo heterofermentativo obrigatório (85%).

As cepas testadas apresentaram-se resistentes a 7% (v/v) de etanol e 64% resistiram a 10%, demonstrando adaptação ao ambiente alcoólico. A característica de floculação do fermento foi manifestada em 67% das cepas testadas.

Quanto às usinas, confirmou-se que a Usina Santa Adélia apresentava maior índice de contaminação, de cepas resistentes ao etanol e de floculação do fermento comercial.

Os resultados dos ensaios de fermentação demonstraram que: acima de 4,8 g/l de acidez, expressa em ácido láctico, e a relação levedura/bactéria inferior a 0,9, as características vitais e o crescimento da levedura foram seriamente comprometidos.

A produtividade de etanol (P_e) e a taxa de consumo de açúcar (P_s) sofreram queda semelhante (em torno de 54%), entre a média dos primeiros 9 ciclos e o 16º ciclo, onde a acidez e a contaminação foram máximas. Isso causou a diminuição na velocidade de consumo de açúcar pela levedura, e a consequente queda na produção de etanol, devido ao excesso de acidez proveniente da contaminação bacteriana.

Os parâmetros de rendimento de álcool, Y_p/s_o e porcentagem de ART consumido, também apresentaram uma queda acentuada nos ciclos finais, servindo também como índices para avaliação da infecção na produção de etanol.

O fator de conversão de açúcar consumido em etanol produzido - Y_p/s não demonstrou o efeito da acidez sobre a produção de etanol. Isso, foi atribuído ao cálculo baseando-se no açúcar consumido pela levedura e não no disponível no sistema.

SUMMARY

This research was carried out in 2 stages. The first stage involved isolation, taxonomy, tests of resistance to ethanol and commercial yeast flocculation tests, all aimed at selecting lactic bacteria which were natural contaminants of fermentation vats. In the second stage, a pilot system was set up to carry out fermentation assays simulating distillery conditions and using one of the bacterias selected in the first stage. Under these conditions *Lactobacillus fermentum* isolated n 28 was tested, reproducing the bacterial infection of the distillery fermentation vats by way of a fed-batch process.

For the first stage of experiment, concentrated yeast samples from two distilleries were obtained, without acid treatment, during August, 1988. The first distillery (Santa Adella - Jaboticabal, S.P.) was presenting microbiological problems, while the second (Modelo - Piracicaba, SP) was operating normally.

The results of the taxonomic study showed that the predominant bacterium present was *Lactobacillus fermentum* (62%), followed by *Lactobacillus murinus* (9%), *Lactobacillus vaccinofermentum* (9%), *Lactobacillus plantarum* (2%) and *Leuconostoc* (2%). Among the *Lactobacillus*, the obligate heterofermentative types were predominant (85%).

The strains tested were all resistant to 7% (v/v) ethanol, and 64% were resistant to 10%, demonstrating adaptation to the alcoholic environment. Flocculation of the yeast was a characteristic of 67% of the strains tested.

Regarding the distilleries, the expected results were confirmed. The Santa Adélia showed a higher level of contamination, with strains more resistant to alcohol and flocculation of the commercial yeast.

The results of the fermentation assays, showed that both the vital characteristics and growth of the yeast were seriously undermined when the acid concentration exceeded 4,8 g/l (expressed as lactic acid) and yeast/bacteria ratio of about 0,9.

The alcohol productivity (P_{em}) and sugar consumption ratios (P_s) suffered similar decrease (about 54%) between the average of the first 9 cycles and that of the sixteenth cycle, when the acidity and contamination were maximum. This indicated a loss in the velocity of sugar consumption by yeast, and a consequent fall in the production of ethanol, due to the excess of acidity caused by the bacterial contamination.

The parameters alcohol yield, $Y_{p/s}$ and the percentage of total sugars consumed also showed accentuated falls during the final cycles, and therefore could also serve as index for the evaluate some of infection in the ethanol production.

The conversion factor $Y_{p/s}$ was not affected by the acidity. This was related to the fact that the calculations were based on the sugar consumed by the yeast, and not that available within the system.

INTRODUÇÃO

Atualmente a produção de etanol combustível no Brasil é feita basicamente através de dois processos fermentativos: fermentação por batelada alimentada (o mais comumente usado) e a fermentação contínua, ambos com reciclo de células.

No processo de batelada alimentada com reciclo de células praticado nas usinas, o fermento (leveduras) é inicialmente introduzido na dorna, seguido da alimentação contínua e controlada do mosto, dando início à fermentação com conversão dos açúcares, produzindo principalmente etanol e CO_2 . Ao final da fermentação o mosto fermentado é bombeado para a centrífuga onde é feita a separação entre o "vinho" (fração rica em etanol) enviada para a destilação, e o "leite de leveduras" conduzido para tanques onde antes de ser reciclado é tratado. O tratamento é feito diluindo este último com água e adicionando ácido sulfúrico, até abaixamento do pH para valores entre 2 e 3 por 2 a 3 horas. Esse material ("pé-de-cuba" pronto), é utilizado como inóculo no ciclo seguinte.

Com o reciclo das células de levedura também ocorre o reciclo dos contaminantes causando diversos distúrbios tais como: consumo de açúcar e etanol pelos contaminantes, queda da viabilidade e morte das células de levedura devido a toxinas lançadas no meio pelo contaminante (ALTERTHUM et al. 1984); perdas de células de levedura no fundo das dornas ou na centrífuga causadas pela floculação do fermento, devido à produção de goma por bactérias (SERRA et al., 1979; ALMEIDA, 1940; GALLI, 1961), ou floculação devido ao contato entre bactérias floculantes e leveduras (YOKOYA

e OLIVA-NETO, 1990); e queda significativa de rendimento alcoólico devido à elevação da acidez causada por bactérias produtoras de ácido (AMORIM e OLIVEIRA, 1982).

Dentre os contaminantes mais frequentes nas dornas, sem dúvida se destacam as bactérias lácticas, especialmente o gênero *Lactobacillus* que é bastante resistente ao etanol. (GALLO, 1989.; KAJI, 1990; ALTERTHUM et al., 1984).

As medidas de controle da contaminação nas usinas são feitas de forma empírica, pela falta de conhecimento científico sobre a forma de interação do contaminante com o agente principal da fermentação - a levedura - e as consequências ao longo dos ciclos fermentativos. Isso também se reflete na falta de consistência dos resultados nos trabalhos que se referem ao controle dos contaminantes durante a fermentação. Segundo AMORIM E OLIVEIRA (1982) a penicilina V-ácida pode controlar a contaminação dos cocos Gram positivos, mas não é tão eficaz contra os bastonetes Gram positivos, o que foi comprovado por ALTERTHUM, et al. (1985). Estes autores também comprovaram a ineficiência do Bloquin BD-70 no controle das bactérias Gram positivas com forma de cocos e bastonetes.

Este trabalho visa dar uma contribuição ao estudo da contaminação láctica no processo fermentativo de batelada alimentada para a produção de etanol. Inicialmente foi feita uma análise da população bacteriana presente em associação com leveduras nas dornas de fermentação "sadias" e com problemas bacteriológicos evidentes. Após esta etapa, foi selecionada uma cepa bacteriana e inoculada experimentalmente no processo de fermentação por batelada alimentada. O perfil da população bacteriana, da po-

pulação de leveduras e das transformações químicas e bioquímicas que ocorrem ao longo dos sucessivos ciclos fermentativos são analisados neste trabalho, a fim de possibilitar a compreensão da dinâmica da contaminação láctica sobre a levedura e a produção de etanol.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Essa revisão foi feita de uma forma bastante abrangente, considerando o aspecto tecnológico das fermentações, das matérias-primas usadas e dos problemas microbiológicos na condução de fermentações. Assim, foram abordadas as implicações com respeito ao processo de batelada alimentada, seguido do efeito do etanol e ácidos orgânicos na fisiologia e bioquímica das leveduras. Os aspectos microbiológicos foram analisados quanto à microflora de cana-de-açúcar, do caldo e do melaço, que são matérias-primas geralmente usadas na fermentação alcoólica. Os problemas ocasionados pelos contaminantes da fermentação alcoólica na dorna foram tratados com maior ênfase, sendo abordado também os problemas ocasionados por "gomas".

1. O PROCESSO DE BATELADA ALIMENTADA

O processo "FED-BATCH" ou de batelada alimentada inicialmente começou a ser empregado em fabricação industrial de fermento para panificação. Portanto, não são muitos os trabalhos cinéticos publicados que dizem respeito a formação do produto (metabólito).

O processo de batelada alimentada utilizado no Brasil consiste num tipo de condução em que há alimentação de mosto, de forma contínua na dorna de fermentação e a remoção do mosto fermentado é totalmente feita no final do processo (ALMEIDA, 1980). É usado mais comumente quando o substrato (ou determinado nutriente a ser adicionado no meio), não deve ser introduzido de

uma só vez no início do processo, sendo alimentado ao longo da fermentação de modo a manter uma concentração adequada ao processo (MORITZ e MEIRELLES, 1978).

Segundo PERINGER e BLACHERE (1979), através de um controle apropriado da taxa de alimentação do substrato pode-se evitar ou minimizar o efeito de repressão catabólica devido ao substrato ou certos produtos excretados, possibilitando um sistema com alta velocidade de crescimento celular e conversão do substrato em células.

O uso do processo de batelada alimentada para produção de levedura de panificação (AIBA et al., 1976) e para produção de penicilina (HOSLER e JOHNSON, 1953; PIRT, 1974) é devido ao fato de que a concentração de substrato deve ser mantida permanentemente baixa no meio de cultivo, pois se este for adicionado de uma só vez haverá uma redução no rendimento do processo.

A otimização da operação do sistema de batelada alimentada para o cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* foi proposto por AIBA et al. (1976), impondo ao sistema uma velocidade de alimentação que variou de maneira tal que, conseguiu manter o coeficiente respiratório da levedura na faixa de 1,0 a 1,2 ao longo do cultivo aeróbio. Com isso foi atingido um regime semi-estacionário onde a concentração de glicose no meio variou pouco, em torno de 10 mg/l, mantendo o sistema aquém do valor crítico de 70 mg/l que induz ao que se chamam "efeito da glicose" ou "efeito Crabtree", evitando-se assim o desvio do metabolismo da glicose para etanol e CO₂.

Segundo KELLER e DUNN (1978), o processo de batelada alimentada ou semi-contínuo pode manter uma taxa de alimentação

constante ou pode ser variada de maneira a obter concentração constante de substrato. Sucessivas fermentações podem ser obtidas se, parte da cultura fermentada de um ciclo anterior for deixada no fermentador para um ciclo posterior. Repetindo-se o enchimento e esvaziamento de volumes específicos no fermentador, resulta em uma operação cíclica de volume variado. PIRT (1974) usou o termo cultivo "FED-BATCH" repetido e estabeleceu um estado "quasi" equilibrado teórico. Ele analisou a formação do produto nestas condições e encontrou uma taxa específica de formação de produto constante. Operações cíclicas se aproximaram de operações contínuas. DUNN e MOR (1975) mostraram que $u = F/V$ (u = taxa específica de crescimento; F = fluxo e V = volume do reator) em condições de estado "quasi" equilibrado, e podem ser mantidas para aumentos ou decréscimos do volume de fermentação. Simulações por computador mostraram que depois de um período transitório, é atingido este estado onde mudanças nas concentrações de microrganismos ($dx/dt = D$) e concentrações de substrato S , vão ambas lentamente aumentando ou diminuindo dependendo do tempo e do volume a ser diminuído ou aumentado.

A maioria dos trabalhos experimentais com cultivo em batelada alimentada tem sido feitos em condições acíclicas (com volume quase constante) com alimentação a taxa constante (YOSHIDA et al., 1973; BUENO NETO, 1982) e exponencial (LIM et al., 1977; EDWARDS et al., 1970).

Experimentos de operações cíclicas com volume variado tem sido feitos com fermentações de antibióticos (TRILLI et al., 1977) e produção de biomassa (KELLER e DUNN, 1978 e PERINGER e BLACHERE, 1979). Industrialmente, antibióticos e fermento de pa-

nificação tem sido produzidos por vários tipos de processo de batelada alimentada cíclico.

WELLES e BLANCH (1976) encontraram um aumento na taxa de formação de álcool com um tipo de alimentação em pulso. ENDO e INOUE (1977) trabalharam com meio sintético no qual a glicose era o substrato limitante (10 g/l), a concentração de células no inóculo foi de 0,1 g/l (*Saccharomyces cerevisiae*). Eles encontraram maiores velocidades de: consumo de glicose, oxigênio, crescimento celular e de produção de etanol quando a concentração de glicose no meio atingiu, aproximadamente, a metade da concentração de glicose no mosto de alimentação.

ALMEIDA (1980) comparou os processos de batelada e batelada alimentada na fermentação de etanol por *Saccharomyces uvarum* (IZ 1904). As concentrações de açúcares na faixa de 270 g/l inibiram a fermentação no processo de batelada convencional. A concentração do etanol de 25 g/l determinou o término da fase exponencial de crescimento e de 80 g/l apresentou uma inibição total. O autor concluiu que a condução pelo processo de batelada alimentada permite evitar o efeito inibidor do açúcar (na fase inicial) levando a uma maior concentração de etanol num mesmo período de tempo quando comparada com a condução em batelada convencional.

BUENO-NETO (1982) testou a influência da concentração inicial de células de fermento comercial e do tempo de enchimento da dorna no processo de batelada alimentada na fermentação alcoólica a partir de mosto de melaço de cana. Segundo o autor: a taxa de crescimento celular decresceu com o aumento da concentração de células usadas no inóculo, obedecendo uma variação hiperbólica. A

concentração de etanol de 56,8 g/l deu início ao processo inibitório do crescimento celular. A variação em massa da produção de etanol com o tempo obedeceu a uma relação linear durante o enchimento da dorna. A formação do produto estava associada ao crescimento celular. Quando usado inóculos inferiores a 50 g/l (massa seca), a duração da fase pós-enchimento da fermentação, a produtividade em etanol e a produtividade em células eram funções da massa de células usadas e do tempo de enchimento do tanque. Ao contrário, usando inóculo maior que 50 g/l, os parâmetros acima citados eram independentes da massa de células no inóculo e eram determinados unicamente pelo tempo de enchimento do tanque. A produtividade máxima em etanol era função linear decrescente com o tempo de enchimento da dorna e o rendimento alcoólico tendeu a decair com o aumento da produtividade em etanol.

2. INFLUÊNCIA DE PRODUTOS NA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA

2.1. INFLUÊNCIA DO ETANOL

O álcool na fermentação, apesar de ser produzido por leveduras, exerce também um forte efeito tóxico sobre elas, causando uma inibição do tipo não competitiva (ZINES, 1977; GHOSE e TYAGI, 1979; LEÃO e van UDEN, 1982). ZINES (1977) relatou a ação negativa do etanol sobre o crescimento de leveduras, sendo citado o decréscimo na taxa NAD^+ livre/ NADH livre como um dos efeitos mais significativos causados pela toxicidade do etanol. Efeitos físicos também foram encontrados por PANOWICZ, 1967 (cit. ZINES, 1977), alteração da permeabilidade da membrana e decréscimo na taxa de absorção de glicose também foram atribuídos ao etanol.

No início, os pesquisadores (NAGODAWHITANA e STEINKRAUS, 1975; NOVAK et al., 1981) afirmaram que o etanol produzido era acumulado intracelularmente em *Saccharomyces cerevisiae* e que possivelmente essa seria a razão para o efeito inibitório, já que o etanol produzido foi demonstrado ser mais tóxico que o adicionado ao meio de cultivo. Isso foi explicado pela velocidade de produção de etanol que em fermentações "rápidas" era bastante grande não podendo difundir-se para fora da célula tão rapidamente quanto se formava, acarretando o acúmulo e a morte da célula da levedura. NAGODAWHITANA e STEINKRAUS (1975) também relataram a perda na atividade da álcool desidrogenase e a queda da viabilidade em fermentações "rápidas" a 30°C , o que não ocorreu a 15°C .

Pesquisas posteriores demonstraram, no entanto, não haver acúmulo de etanol intracelularmente. Os resultados impróprios

dos primeiros autores foram atribuídos a inadequacidade da amostragem das células e artefatos na medição de etanol (GUIJARRO e LAGUNAS, 1984; DASARI et al., 1985; DOMBEK e INGRAM, 1987). As seguintes evidências confirmam esse fato: a) as taxas de etanol que saem da levedura seguem cinética de primeira ordem, sendo insensível a presença de estruturas análogas ao etanol ou drásticas mudanças de pH. Isso sugere que o etanol permeia na membrana celular de leveduras sem envolvimento de qualquer transportador. b) a taxa de saída de etanol parece maior do que a habilidade da célula em produzir etanol, indicando que é impossível haver acúmulo de etanol intracelular. c) a concentração de etanol intracelular medida é similar a concentração no meio de cultivo quando utilizada uma técnica apropriada (GUIJARRO e LAGUNAS, 1984).

GHOSE (1979) comprovou que altas concentrações de etanol (87 g/l) produzem a cessação do crescimento e acima de 114 g/l não há mais formação de etanol pela célula de *Saccharomyces cerevisiae*. O autor descreveu as seguintes equações para a inibição pelo etanol em processo de batelada:

$$u = u_m (1 - P/P_m)$$

$$V = V_m (1 - P/P_m)$$

Onde:

P = concentração de etanol (g/l)

u_m - taxa específica máxima de crescimento.

V_m - taxa específica máxima de formação do produto.

u - taxa específica de crescimento.

V - taxa específica de formação do produto.

P_m - concentração de etanol máxima acima da qual as células não crescem (g/l).

P_{me} - concentração de etanol máxima acima da qual as células não produzem etanol (g/l).

Ambos: $P/P_m = 0$ ($h=1$)

MILLAR et al. (1982) afirmaram que a inibição de enzimas glicolíticas por concentrações elevadas de etanol (12% v/v) pode ser reponsável pelo declínio da taxa de fermentação. Trabalhos posteriores comprovaram que mesmo cessando a fermentação a atividade da hexoquinase e álcool desidrogenase se mantiveram altas. Com isso, os autores sugeriram que a cessação da fermentação pela levedura não ocorreu devido a inativação das referidas enzimas (LAVRE et al., 1984; DOMBEK e INGRAM, 1987).

HAYASHIDA et al. (1974) trabalharam com *Saccharomyces sake* e formação de altas concentrações de etanol (20-21%) a 20°C dentro de 20 dias, com a adição gradual de sacarose. Ácidos graxos insaturados foram os fatores essenciais para produção de tão altas concentrações, sendo portanto, o metabolismo lipídico o fator essencial para produção de altas concentrações de etanol em sake. Segundo LEÃO e van UDEN (1982) o etanol inibe as células de *Saccharomyces cerevisiae* afetando a taxa específica de crescimento e produção de etanol. Há inibição do transporte da glicose por mudanças dos lipídeos da membrana citoplasmática, e o grau de inibição fica dependendo, da solubilidade lipídica do álcool e do tamanho molecular deste (propanol, etanol, butanol, etc).

Lipídeos (BEAVAN et al., 1982; CASEY et al., 1984; THOMAS et al., 1978), e oxigênio molecular para a biosíntese dos lipídeos (ANDREASON e STIER, 1954; BUTTE et al., 1980; BUTTE e PYLE, 1982), em muitos tipos de mostos fermentados oriundos de fer-

mentação alcoólica, tem sido essencial para a manutenção da atividade de altas taxas de fermentação. Sem eles, há um decréscimo progressivo de produção de etanol ao longo do tempo de fermentação quando este é acumulado no caldo (CASEY et al., 1986; INGRAM e BUTTRE, 1984; MOULIN et al., 1984).

DOMBEK e INGRAM (1986b) estudaram o efeito do íon Mg^{++} na inibição da fermentação pelo etanol em *Saccharomyces cerevisiae*. A suplementação de 0,5 mM de íon Mg^{++} prolongou a fase exponencial de crescimento, resultando num aumento de biomassa e redução do tempo para conversão de açúcares em etanol, sem perdas no rendimento teórico (98%).

VEGA et al. (1987) estudaram o efeito da quantidade do inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* sobre a inibição da fermentação pelo etanol e concluíram que o aumento do inóculo diminuiu a severidade da inibição. A concentração do substrato em nível elevado pode atuar sinergisticamente com o etanol causando uma forte inibição da fermentação, sendo este efeito diferente em função do açúcar em questão (MOULIN et al., 1980).

LETORNEAU e VILLA (1987), estudando o crescimento de leveduras de panificação em mosto de beterraba, afirmaram que a toxicidade do etanol pode ser diretamente ligada a concentração inicial do substrato. Os autores atribuíram ao efeito da pressão osmótica do substrato, como efeito tóxico para crescimento das células de leveduras e redução das taxas específicas para produção de álcool. A partir da concentração de 117 g/l em mosto de beterraba a taxa específica de crescimento sofreu queda significativa.

2.2. INFLUÊNCIA DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS

Vários são os ácidos orgânicos que exercem influências negativas na fermentação e crescimento das leveduras, tais como: ácido acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico (SAMSON, 1955); ácido fórmico, láctico (MAIORELLA et al., 1983); ácidos octanóico e decanóico (LAFON-LAFOURCADE et al., 1984; VIEGAS et al., 1989).

Segundo SAMSON (1955) esses ácidos contêm algumas propriedades e características importantes com relação aos efeitos inibitórios: a) não especificidade: podendo agir de diversas formas (atividade bactericida, hemolítica, inibição da taxa de crescimento de leveduras, etc.). b) ação mais intensificada com aumento do comprimento da cadeia, como exemplo: ácido octanóico é mais tóxico que o ácido butírico e este mais tóxico que ácido acético, para as células de leveduras. c) não há ação inibitória significativa com relação a forma das cadeias n- ou iso. d) necessidade de um grupo polar. e) redução da ação inibitória quando grupo hidroxílico ou carboxílico é introduzido na parte hidrocarboneto da molécula. f) reversibilidade com uma diminuição da inibição na fermentação por simples lavagem da célula. O autor destacou a importância do processo ativo de acumulação de fosfato pela célula de levedura, na forma de ortofosfato sendo convertida para metafosfato no meio intracelular suprindo fosfato para síntese de constituintes mais complexos. O autor demonstrou também a inibição do acúmulo de fosfato pela célula devido ao acetato, butirato e o octanato sendo este último o inibidor mais efetivo.

MAIORELLA et al. (1983) discutiram o mecanismo da inibição para os ácidos acético, fórmico e láctico; sendo encontrada para todos esses ácidos uma inibição por interferência química das funções de manutenção das células. No caso do acetato este é solúvel nos lipídeos da membrana celular e inibe por interferência química o transporte de fosfato através da membrana. A interferência do ácido acético resulta no aumento do ATP requerido para estas funções. Como característica típica desse tipo de inibição, ocorre um decréscimo da produção de células enquanto aumenta a produção de etanol, devido ao aumento de ATP disponível para as funções de manutenção. A relação u/V (taxa específica de crescimento celular/taxa específica de formação de produto) decresce com o aumento da concentração do inibidor. A morfologia da célula da levedura é alterada tornando-se irregular e alongada.

O ácido fórmico tem uma solubilidade lipídica similar ao ácido acético, sendo provável que o mecanismo de inibição seja idêntico. O ácido láctico contém um grupo hidroxílico extra, é muito menos solúvel em lipídeos que os ácidos fórmico ou acético e a inibição ocorre em concentrações muito maiores (10-40 g/l) (MAIORELLA et al., 1983).

SAMSON (1955) afirmou que o ácido láctico não inibe o transporte do fosfato. Então, o mecanismo exato da inibição deste ácido é provavelmente diferente do mecanismo do ácido acético. Segundo MAIORELLA et al. (1983) a densidade celular decresce, enquanto a taxa específica de produção de álcool aumenta (de 0,55 para 0,8 h^{-1}), indicando alguma forma de interferência química do ácido láctico com as funções de manutenção, requerendo aumento de ATP.

CASSIO et al. (1987), fazendo crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* em meio contendo ácido láctico, encontraram um sistema de transporte simultâneo ("Symport") próton-lactato com uma estequiometria de 1:1, ou seja, para cada lactato que entra na célula sai um próton. A taxa de acúmulo de lactato no interior da célula vai depender da variação do pH de um lado para outro da membrana, através da seguinte relação:

$$\frac{\text{Lactato d}}{\text{Lactato f}} = \frac{[\text{H}^+] \text{ f}}{[\text{H}^+] \text{ d}}$$

ou $\log$ da taxa de acúmulo de lactato = (pH dentro - pH fora)

Onde: f = fora e d = dentro

Sendo o pH dentro, uma constante, o $\log$ da taxa de acumulação de lactato contra o valor de pH extracelular deveria estabelecer uma reta de inclinação um. Entretanto, a relação não foi linear e o ângulo de curva logarítmica decresceu com o pH, o que foi explicado pelo decréscimo do pH intracelular quando o pH extracelular foi mais baixo. Este sistema de transporte simultâneo ("Symport") próton-lactato foi testado para D-lactato, L-lactato, piruvato, propionato e acetato, sendo todos esses aceitos pelo sistema. Crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* em meio com 0,2% de glicose promoveu repressão do sistema de transporte simultâneo ("Symport") sendo esse somente detectável quando a glicose foi totalmente consumida.

CASSIO et al. (1987) utilizaram células que tinham sido crescidas em meio com glicose e portanto, sem o sistema de transporte simultâneo próton-lactato, para estudar a cinética dos ácidos não dissociados a diversos pH. A forma não dissociada do áci-

do láctico entrou na célula da levedura por simples difusão, sendo que a permeabilidade para o referido ácido não dissociado aumentou de forma exponencial com o aumento de pH. A constante de difusão aumentou 40 vezes quando o pH foi aumentado de 3 para 6. Isso foi confirmado por PAMPULHA e LOUREIRO (1989), sendo encontrada uma permeabilidade passiva mais alta para o ácido acético na membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae* quando o pH foi aumentado, havendo também um maior efeito tóxico na fermentação.

INOUE et al. (1962) em estudos com "sake", mostraram que diferentes linhagens de leveduras sobreviveram à concentrações de 20-28 g/l de ácido láctico, enquanto que MAIORELLA et al. (1983) observaram um decréscimo de 80% na população final de *Saccharomyces cerevisiae* crescidos em meio sintético com 40 g/l de ácido láctico. DAESHEL et al. (1988), usando uma cultura mista de *Lactobacillus plantarum* com espécies de *Saccharomyces* (*Saccharomyces cerevisiae* ou *Saccharomyces rosei*) em fermentações com suco de repolho, encontraram concentrações inibitórias de ácido láctico, para o crescimento das leveduras, a partir de 2,5 g/l, sendo o crescimento totalmente inibido (para ambas as espécies de leveduras), a partir de 5,0 g/l.

NGANG et al. (1989), estudando o efeito do ácido láctico em leveduras na produção de álcool a partir de melaço de beterraba, verificaram que o efeito vai depender da pressão osmótica do meio e do tamanho do inóculo da levedura. Para uma concentração de 5 g/l de ácido láctico houve uma inibição de 30% no crescimento de levedura para o melaço com pressão osmótica de 1,3 e 20% para melaço com pressão osmótica de 0,6 com um inóculo de 3×10^6 célu-

las/ml. Para essa mesma concentração de ácido láctico e com um inóculo superior a 5×10^7 células/ml, a inibição foi de cerca de 5% aproximadamente. Para os mostos com menor pressão osmótica e com ácido láctico na faixa entre 0-10 g/l, a taxa específica de produção de etanol foi maior do que nos ensaios sem o ácido láctico. Acima de 10 g/l de ácido láctico houve uma queda permanente da taxa de produção de etanol em função do aumento do ácido láctico. Para os casos de maior pressão osmótica a taxa específica de produção de etanol foi inibida a partir de 2,5 g/l de ácido láctico. Quando foi usado um inóculo de 3×10^6 células/ml a taxa específica de produção de etanol foi menor ($0,6 \text{ h}^{-1}$) que com inóculo de $5 \cdot 10^7$ células/ml ($1,0 \text{ h}^{-1}$) para uma mesma concentração de 5,0 g/l de ácido láctico.

VEGA et al. (1987), em um processo de produção de etanol com células de leveduras imobilizadas, utilizaram ácido acético para inibir o crescimento celular e conseguiram um aumento na produtividade de etanol em mais de 50%. A concentração de ácido acético de 0.1M levou a uma maior produtividade de etanol e um decréscimo no rendimento celular. Concentrações inferiores ou muito superiores a 0.1M diminuíram a produtividade. Isso ocorreu devido ao aumento na energia de manutenção requerida pela cultura, levando a uma queda da taxa de crescimento e melhor eficiência na conversão de glicose em etanol.

Recentemente, alguns pesquisadores tem demonstrado um efeito sinérgico entre etanol e ácidos orgânicos, podendo explicar a inibição da fermentação pelo álcool produzido. PAMPULHA e LOUREIRO (1989) afirmam que o ácido acético potencia, juntamente com o etanol, o efeito tóxico sobre a fermentação. VIEGAS

et al. (1989) demonstram que os ácidos octanólico e decanólico em associação com o etanol reduziram a taxa específica máxima de crescimento de maneira exponencial, sendo a forma dissociada do ácido, a mais tóxica, e o ácido decanólico mais tóxico que o octanólico. TEREZA-RAMOS e MADEIRA-LOPES (1990) afirmaram que concentrações acima de 1% (v/v) de ácido acético diminuem a tolerância ao etanol adicionado e estreitam a faixa de temperatura para crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* de 3-42°C para 19-26°C. Os ácidos acético, octanólico e decanólico são formados juntos com o etanol durante a fermentação por *Saccharomyces cerevisiae*, sendo essa uma das prováveis causas do efeito mais tóxico do etanol produzido em relação ao adicionado na fermentação.

3. MICROFLORA BACTERIANA DA CANA-DE-AÇÚCAR

Em geral, os microrganismos contaminantes nas usinas que processam cana-de-açúcar, provêm do solo, acompanhando a cana até a indústria, sendo causadores de vários distúrbios em diferentes etapas da produção do álcool. Aí, ocorre uma sucessão seletiva da microflora bacteriana desde a cana colhida até o mosto fermentado. Devido a complexidade do assunto torna-se importante uma análise levando-se em conta as diferentes etapas do processo.

DULCAN e COLMER (1964), isolando 198 bactérias de cana de açúcar aderidas aos colmos, folhas e raízes, encontraram como mais frequentes os seguintes: *Leuconostoc* sp, *Bacillus subtilis*, *Aerobacter cloacae*, *Aerobacter aerogenes*, *Escherichia coli* e *Lactobacillus plantarum*. O número de células bacterianas totais

foi de $10^4 - 10^8$ por grama de cana. BEVAN e BOND (1971) identificaram *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas* na cana de açúcar. Após aproximadamente duas horas do corte mecanizado as bactérias mais frequentes foram *Leuconostoc*, *Xanthomonas* e *Aerobacter*.

O processo de queima da cana-de-açúcar parece não ser favorável quanto a redução da contaminação bacteriana, já que diminuiu as barreiras físicas dos tecidos vegetais, tornando estes mais susceptíveis ao ataque bacteriano (EGAN, 1965; STUPIELLO, 1982). FERRARI e BODELLA (1977) mostraram que os colmos de cana queimados e cortados inteiros, passadas duas semanas apresentaram a formação de dextranas. Não ocorrendo o mesmo com a cana não queimada. A forma como a cana é colhida também pode aumentar ou não a contaminação. Quanto maior a injúria dos tecidos causada pelos cortes, ou aumento de áreas expostas, maior também será o grau de contaminação. Neste aspecto a colheita manual parece melhor do que a mecanizada, já que a segunda promove o corte da cana em toletes curtos (BEVAN e BOND, 1971).

Segundo EGAN (1968) a deterioração após a colheita mecânica ocorre em média passadas 60 horas, enquanto que no corte manual a deterioração ocorre após 70 horas.

Os longos períodos de armazenamento da cana contribuem, seguramente, para perdas de açúcares devido a atividade dos microrganismos (STUPIELLO, 1982; AMORIM e OLIVEIRA, 1982).

O período máximo tolerável irá depender de alguns fatores como: condições ambientais, época do ano, etc; porém nenhuma evidência de dextrana tem sido encontrada em cana-de-açúcar cortada com 10 horas (ANÔNIMO, 1971).

DATEUX 1980 e 1981 - contagem de bactérias em cana de açúcar armazenada em períodos de dias quentes e úmidos detectou elevação na contagem podendo atingir até 10^9 bactérias/g de cana.

4. MICROFLORA DO CALDO DE CANA

Uma das características do caldo na etapa de moagem é o baixo pH, razão pela qual os microrganismos mais frequentemente isolados são espécies do gênero *Lactobacillus* e *Leuconostoc*, altamente tolerantes aos baixos pHs e as concentrações elevadas de açúcar. Algumas espécies desses gêneros podem possuir cápsulas de polissacarídeos, e excretam gomas extracelulares que protegem as células contra os efeitos da temperatura e ação de produtos químicos (TILBURY, 1975). Também são encontradas comumente bactérias da família dos Actinomicetos e dos gêneros *Enterobacter*, *Escherichia*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Serratia* e *Streptococcus* (PEDERSON, 1938; PEDERSON e HUCHER, 1946; MacMASTER e RAVNO, 1975).

LIMA et al. (1974) identificaram em caldo bruto, caldo misto e água de embebição, leveduras do gênero *Candida* (*C. didunii*, *C. fabiani*, *C. intermedia*), *Rhodotorula* (*R. pallida*, *R. rubra*), *Hansenula polymorpha*, *Torulopsis nosvegica* e *Trichosporon cutaneum*. As bactérias: *Leuconostoc citrovorum*, *Leuconostoc dextranicum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Aerobacter aerogenes*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus megatherium*, *Pseudomonas incognita* e *Paracolobactrum aerogenoides*.

TILBURY (1975) analisou a deterioração de caldo de cana durante 10 dias em condições naturais. O caldo continha além das bactérias lácticas, um número significativo de outras bactérias, porém estas eram mais sensíveis as condições acidófilas do caldo. São elas : *Bacillus*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Escherichia coli*. As lácticas mais frequentes foram: *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc dextranicum* e *Lactobacillus plantarum*.

Uma análise recente foi feita por SILVA (1988) onde foi estudado o caldo de cana previamente clarificado e pasteurizado, examinando o efeito da torre de resfriamento sobre o caldo de cana. Para isso a autora estudou a microflora na entrada e saída da torre, sendo constatado na entrada um predomínio das bactérias do gênero *Lactobacillus* (45%), seguido de espécies da família *Micrococcaceae* (17%) e leveduras (17%), *Leuconostoc* (6%) e *Bacillus* (3%). Na saída foram encontrados os seguintes grupos em ordem decrescente: *Lactobacillus* (30%), *Micrococcaceae* (28%), *Leuconostoc* (18%), leveduras (7%) e membros da família *Enterobacteriaceae* (2%). A autora concluiu que a população microbiana do caldo mostrou-se predominantemente bacteriana, Gram positiva e láctica. O contaminante mais frequente foi *Lactobacillus* (38%) seguido de bactérias pertencentes à família *Micrococcaceae* (23%) dos quais 22,5% pertenciam ao gênero *Staphylococcus*, em seguida *Leuconostoc* (12%), leveduras (12%), *Bacillus* (3%) e por último bactérias Gram negativas (família *Enterobacteriaceae*). As cepas de lactobacilos foram predominantemente heterofermentativas (98%) e termodúricas (79%). As espécies mais frequentes foram *Lactobacillus fermentum/reuteri* (47%), *Lactobacillus confusus* (18%), *Lactobacillus viridescens* (11%), *Lactobacillus brevis/buchneri* (4%) e *Lactoba-*

clivus plantarum (2%).

Com relação a estimativa da carga microbiana encontrada no caldo de cana, Mac MASTER e RAVNÖ (1977) após 3 anos de avaliação quantitativa das bactérias encontradas em caldo de cana registraram índices de $4,5 \times 10^7$ células/ml (desvio padrão = $1,78 \times 10^7$) e $2,83 \times 10^7$ células/ml (desvio padrão = $1,61 \times 10^7$), respectivamente em caldo bruto e caldo misto. TILBURY (1975) demonstrou ser estes índices bastante influenciados pelo estado e tempo de estocagem de cana pós-colheita. Índices de 10^7 a 10^8 células/ml foram encontrados até o quarto dia de estocagem, sendo que o caldo com 10 dias de incubação apresentou-se até menos contaminado (10^6 células/ml).

SILLIKER et al. (1980) estudaram bactérias no caldo misto, chegando a obter resultados bastante variados 10^5 a 10^7 células/ml, isso quando a cana era sadia, sendo que quando havia um período de estocagem muito longo, podia-se obter contagens em torno de 10^8 células/ml.

Um amplo estudo sobre a carga microbiana encontrada no caldo de cana foi feito pela equipe da COPERSUCAR, SP (CENTRO TECNOLÓGICO COPERSUCAR, 1983a): abrangendo 12 usinas cooperadas durante a safra 82/83, sendo encontrados valores menores que 10^7 células/ml no caldo misto. É importante salientar que nessas usinas o controle do pH foi fator importante para os índices encontrados.

Nos equipamentos de extração de caldo (moendas, caixa, peneira e tubulação) há sempre focos de contaminação por bactérias lácticas, pois amostras retiradas no trajeto (próximo da sulfitação e calagem ou do tratamento térmico) apresentaram contagens

superiores às do caldo misto, ocorrendo também ligeiro abaixamento do pH (CENTRO TECNOLÓGICO COPERSUCAR, 1983a).

A calagem ou, sulfitação e calagem, seguidas do tratamento térmico permitem uma redução substancial na contagem microbiana. Dessa forma, o mosto preparado com cana assim tratada e méis apresentam contagem sempre inferior a 5×10^6 microrganismos/célula, sendo predominante o grupo das bactérias lácticas (CENTRO TECNOLÓGICO COPERSUCAR, 1983b).

SILVA (1988) fazendo uma análise microbiológica do caldo na entrada e saída da torre de resfriamento registrou uma contagem total de aeróbios (PGA - DIFCO) de $8,6 \times 10^6$ ufc/ml na entrada da torre para $2,2 \times 10^8$ ufc/ml (unidade formadora de colônia/ml) na saída, um aumento de mais 30 vezes e a contagem de bactérias lácticas (MRS - DIFCO) de $6,7 \times 10^6$ ufc/ml (entrada) para $1,2 \times 10^8$ ufc/ml (saída), uma elevação de quase 20 vezes.

5. MICROFLORA DO MELAÇO

O melaço é um subproduto da fabricação do açúcar, sendo que muitas destilarias anexas preparam o mosto que vai para a fermentação, a partir do melaço diluído com caldo de cana ou água.

ALMEIDA (1966) afirma que o mel é fundamentalmente estável podendo ser estocado por longos períodos desde que o sistema de armazenamento seja correto. A decomposição do mesmo, segundo o autor, é causada por vários fatores que atuam nos depósitos durante seu armazenamento, entre eles a infiltração pela água das chuvas, com a diluição do material, tornando-o muito mais susceptível ao ataque dos microrganismos. Temperatura elevada, contato com oxigênio, altura dos reservatórios e pH final do mel são outras variáveis que podem influir no armazenamento sadio do melaço.

Segundo OLBRICH (1960), apesar de sua pobreza em ácido fosfórico, o melaço constitui um bom meio de cultura para inúmeros microrganismos. Desses merece atenção o *Leuconostoc* formador da goma dextrana, um aglomerado gelatinoso que dificulta o desprendimento de CO_2 e provoca entupimento do encanamento e filtros.

OLIVEIRA (1962) confirmou a estabilidade do melaço e a sua vulnerabilidade às chuvas, mencionadas por ALMEIDA (1966) e OLBRICH (1960), porém adverte que as chuvas afetam apenas a camada superficial, apesar dos prejuízos não serem desprezíveis. O autor encontrou fungos, leveduras e bactérias nessa camada superficial.

HONIG (1969) afirmou que a hidrólise comprovada da sacarose e as perdas de açúcares totais encontradas no melaço, mostram que a alteração gradual da composição do melaço, enquanto está armazenado, deve-se ao conjunto de reações químicas e, pelo menos em parte, microbiológicas, devido a atividade de microrganismos osmofílicos. Segundo o autor os microrganismos do melaço resistem em parte às operações de fabricação e são introduzidos com o caldo ou se incorporam ao melaço durante o armazenamento. No caso do *Bacillus subtilis* este procede da contaminação pelo ar.

SOUZA et al. (1977) trabalhando com melaço de açúcar demerara e cristal, encontraram os gêneros de *Bacillus* sp., *Enterobacter*, *Micrococcus* e *Sarcina*, sendo respectivamente nas seguintes proporções: 20:4:6:1 (Demerara) e 26:1:6:1 (Cristal), após 3 anos de estocagem. Os autores concluíram que esses microrganismos se encontravam em baixo número, juntamente com alguns fungos *Aspergillus* e *Penicillium*, atribuindo isso a alta concentração de açúcares presentes no melaço (84°Brix).

6. MICRORGANISMOS PRODUTORES DE GOMAS

NEVES (1938) atribuiu ao *Leuconostoc mesenteroides* a formação de dextrana, conhecido como "canjica", comum em fermentações de caldo de cana no Brasil. EGAN (1968) relatou que, em 1965, cana cortada e mantida estocada durante a noite aumentava em 50% o conteúdo de goma. As perdas de açúcar eram consideráveis se a cana fosse estocada mais de dois dias antes da moagem.

A goma pode obstruir trocadores, canalizações, centrífugas, ocasionando ainda floculação do fermento com perdas de células de leveduras presas a este material, precipitando no fundo das dornas (AMORIM e OLIVEIRA, 1982). A floculação do fermento devido a goma pode acarretar perdas no rendimento alcoólico. SERRA et al. (1979) observaram um decréscimo de 15% no rendimento da fermentação. As fermentações normais apresentaram um rendimento de cerca de 90% e com a ocorrência de contaminação, este ia decrescendo continuamente atingindo cerca de 75%.

TILBURY (1977) e AYALA et al. (1977) consideraram o *Leuconostoc mesenteroides* o principal agente causador de formação de goma, e relataram os problemas operacionais causados como aumento da viscosidade do caldo dificultando a clarificação, evaporação, cocção e cristalização, além da dextrana influenciar na polaridade dos cristais de sacarose, já que a dextrana tem uma polaridade superior, afetando assim as propriedades dos cristais da sacarose.

SILVA (1988), estudando caldo de cana, encontrou um predominância de *Leuconostoc* formadores de goma (73%) correspondendo às espécies *Leuconostoc mesenteroides*, subespécie *mesenteroides* (50%), subespécie *dextranicum* (23%) e o *Leuconostoc paramesenteroides* (27%). Os grupos *Lactobacillus* (*Lactobacillus confusus*) e *Bacillus* também apresentaram-se como formadores de goma.

GALLI (1961) encontrou os seguintes microrganismos formadores da goma levana em usinas: *Bacillus*, *Aerobacter* e *Streptococcus*. DUCAN e COLMER (1964) isolaram *Enterobacter*

aerogenes e *Enterobacter cloacae* sendo considerados pelos autores, microrganismos produtores de goma.

Segundo CLAUS e BERKELEY (1986), diversas espécies de *Bacillus* são capazes de produzir levana ou dextrana, a partir de sacarose como *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus polymyxa*.

7- CONTAMINAÇÃO MICROBIANA NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Contaminação é o fenômeno pelo qual, em uma fermentação alcoólica, o número de microrganismos infectantes atinge níveis que são prejudiciais à produção de etanol. A diminuição da produção de álcool pode ser causada por diversos motivos, tais como: consumo do açúcar pelos microrganismos infectantes; consumo de etanol (como no caso das bactérias acéticas); morte das células de levedura por toxinas lançadas no meio (ácidos por exemplo); perdas de células de levedura no fundo das dornas ou nas centrífugas causada pela floculação do fermento; e, formação de goma por bactérias (AMORIM e OLIVEIRA, 1982). Uma boa revisão sobre infecção na fermentação foi feita por SERRA et al. (1979)

No Brasil foi NEVES (1938) quem pela primeira vez relatou a infecção ou "acidente da fermentação", sendo encontradas as fermentações acéticas, lácticas, butíricas e da dextrana. O autor descreveu os principais sintomas característicos de cada fermentação devida aos contaminantes. A fermentação láctica apresentava acidez crescente no mosto e diminuição da liberação de gás carbônico. A fermentação butírica era bastante característica pelo

odor butírico, cor enegrecida do mosto e diminuição da liberação de gás carbônico. A fermentação da dextrana formava uma massa gelatinosa que flutuava no mosto durante a fase tumultuosa da fermentação e depositava-se no fundo da dorna ao final da fermentação.

ALMEIDA (1940) citou as fermentações acidentais descritas por NEVES (1938) e relacionou a fermentação acética com a presença da mosca *Drosophila*. GALLI (1961) relacionou a fermentação acética aos gêneros *Acetobacter* e família *Pseudomonadaceae*; fermentação láctica aos gêneros *Lactobacillus* e *Streptococcus*; a fermentação butírica ao gênero *Clostridium*, a formação da goma dextrana ao *Leuconostoc mesenteroides* e a goma levana aos gêneros *Bacillus*, *Aerobacter* e *Streptococcus*.

SERRA et al. (1979) estudaram a floculação do fermento, sendo isolados de pequenos flocos compostos por células de levedura e bactéria, a presença de espécies de *Bacillus*. Foi relatada, em especial, uma bactéria resistente ao ácido sulfúrico, apontada como agente causal, o *Sporolactobacillus inulinus*. Os autores discutiram o mecanismo da infecção atribuindo a uma relação com a qualidade da água utilizada na lavagem da cana. A recirculação contínua das águas residuais permitiu a elevação da contaminação apresentando índices de 2×10^6 microrganismos totais/ml.

AMORIM e OLIVEIRA (1982) destacaram os microrganismos responsáveis pelo fracasso de fermentação alcoólica como pertencentes aos gêneros: *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Aerobacter*, *Streptococcus* e *Leuconostoc*. Os autores estabeleceram uma correlação entre ácidos do vinho e queda no ren-

dimento alcóolico, sendo encontrados os rendimentos mais baixos (60%) para valores de acidez entre 5 a 6 g/l. O autor também menciona a importância dos bastonetes na infecção, quanto maior a porcentagem destes no total de bactérias, menor o rendimento da destilaria. Os cocos são mais facilmente controlados pelo uso de penicilina que os bastonetes, porém se eles estiverem em grande quantidade, ocorre abaixamento no rendimento por dois motivos: aumento da viscosidade do vinho, ocasionando uma maior perda de fermento no vinho turbinado, e maior consumo de açúcar desviando este da produção de álcool para outros compostos que podem inibir a fermentação.

ALTERTHUM et al. (1984, 1985) utilizaram a técnica de reciclagem de células na produção de etanol (analogamente às usinas) e relataram a perda de rendimento alcóolico nas fermentações contaminadas por bacilos e cocos sendo o primeiro mais grave, responsável também por uma maior morte das leveduras.

RODINI (1985), estudando a microflora do mosto fermentado em usinas de álcool, encontrou uma maior incidência de bastonetes esporulados 62,0%, *Lactobacillus* 3% e *Leuconostoc* 1,5%. Foram encontrados índices de 10^7 ufc/ml.

GALLO (1989) relacionou os grupos mais frequentemente encontrados que, na sua maioria são do tipo Gram positivos: *Leuconostoc* (*Leuconostoc mesenteroides* e *Leuconostoc dextranicum*); *Lactobacillus* (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus confusus*); *Bacillus* (*Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus coagulans*, *Micrococcus lylae*, *Streptococcus lactis* e

Enterobacter aerogenes.

O autor referiu-se aos grupos *Lactobacillus* e *Bacillus* como os microrganismos predominantes nas dornas de fermentação, seguidos de *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Leuconostoc*.

Em destilarias de "whisky" escocês, onde o processo de fermentação alcoólica também é feito por leveduras, a presença de bactérias contaminantes também ocorrem e, *Lactobacillus* é tão comum que a fermentação é considerada um misto entre levedura e lactobacilos (BRYAN e JONES, 1975). Segundo DOLAN, 1976 (cit. por BARBOUR e PRIEST, 1988), esses contaminantes geralmente crescem no final da fermentação as expensas dos produtos da autólise da levedura e essa fermentação láctica é considerada benéfica. Se o processo é fortemente contaminado (maior que 10^8 bact./ml) os lactobacilos desenvolvem-se mais cedo e levam a reduções inaceitáveis do rendimento alcoólico.

KAJI (1989) estudou a fermentação alcoólica com 2 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* em condições mistas com bactérias isoladas de usinas. Os dois microrganismos isolados foram identificados como: *Leuconostoc mesenteroides* subespécie *mesenteroides* e *Lactobacillus fermentum*, sendo cada um desses submetidos a fermentação mista, com cada uma das cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. A autora concluiu que ambos contaminantes prejudicaram a viabilidade da levedura. Após o término das fermentações, entre as bactérias testadas, apenas o *Lactobacillus* pode ser recuperado através de sementeira em placas. A morte do outro contaminante (*Leuconostoc*) foi atribuída ao efeito adverso do etanol, que a 3% foi capaz de reduzir em 50% a velocidade específica má-

xima de crescimento (um) e com concentrações superiores a 5,0% implicou na interrupção do crescimento.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. ISOLAMENTO, TAXONOMIA E SELEÇÃO DO CONTAMINANTE

1.1. AMOSTRAGEM E ENUMERAÇÃO

As amostras utilizadas para o desenvolvimento do trabalho foram coletadas no mês de agosto de 1988, nas usinas: Santa Adélia (Jaboticabal - SP) sendo, respectivamente, amostras 1 (fermentação contínua) e 2 (fermentação em batelada alimentada) e amostra 3 - Usina Modelo (Piracicaba - SP).

A amostragem consistiu na coleta, assepticamente, de "leite de levedura" utilizando frascos previamente esterilizados. Informações sobre o estado microbiológico das usinas foram obtidos no momento da coleta.

No laboratório foi determinado o pH das amostras e foram feitas diluições decimais até 10^{-6} , semeadas em profundidade nas placas de Petri (SPECK, 1978) tomando-se alíquotas de 1 ml. Foi utilizado o meio MRS (Man, Rogosa e Sharpe - DIFCO) (MAN et alii, 1960) acrescentando Actidiona (cicloheximida) 0,01% para inibição de bolores e leveduras.

As placas (em duplicatas) foram incubadas a 30°C, e a leitura feita após 72 horas.

1.2. ISOLAMENTO DAS CULTURAS

O isolamento foi feito transferindo-se assepticamente as colônias crescidas em meio MRS Agar para o meio caldo MRS. Um cuidado especial foi tomado nessa etapa, na transferência de colônias as mais variadas possíveis, a fim de seleccionar uma maior quantidade de tipos diferentes. As culturas foram então incubadas a 30°C por 24 a 48 horas.

1.3. PURIFICAÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS PURAS

O processo de purificação das cepas isoladas consistiu na reinoculação dessas culturas do meio líquido MRS para o meio sólido (MRS Agar). Isso foi feito pelo método de estrias por esgotamento, e a incubação foi realizada a 30°C num período de 24 a 48 horas.

As culturas isoladas e purificadas através de repicagem e incubação até crescimento visível, foram armazenadas à 15°C. Este método de manutenção foi usado para armazenagem por períodos curtos (15 a 20 dias). Como método efetivo e duradouro de manutenção das cepas, fez-se a liofilização. Este trabalho foi conduzido na Coleção de Cultura Tropical da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", onde encontram-se depositadas. As análises a que foram submetidas as amostras encontram-se esquematizadas na figura 1.

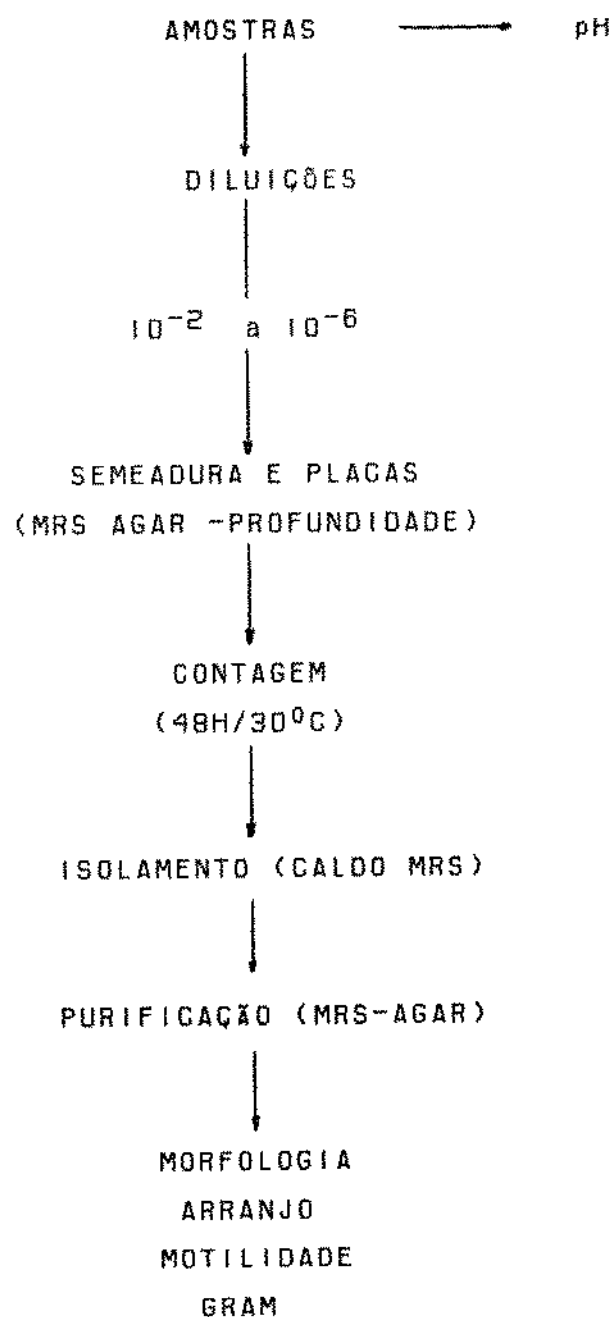


FIGURA 1- Esquema do tratamento das amostras e isolamento das cepas

1.4. CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR

As características preliminares analisadas para cepas crescidas em meios líquidos e sólidos foram: morfologia, arranjo, Gram e motilidade.

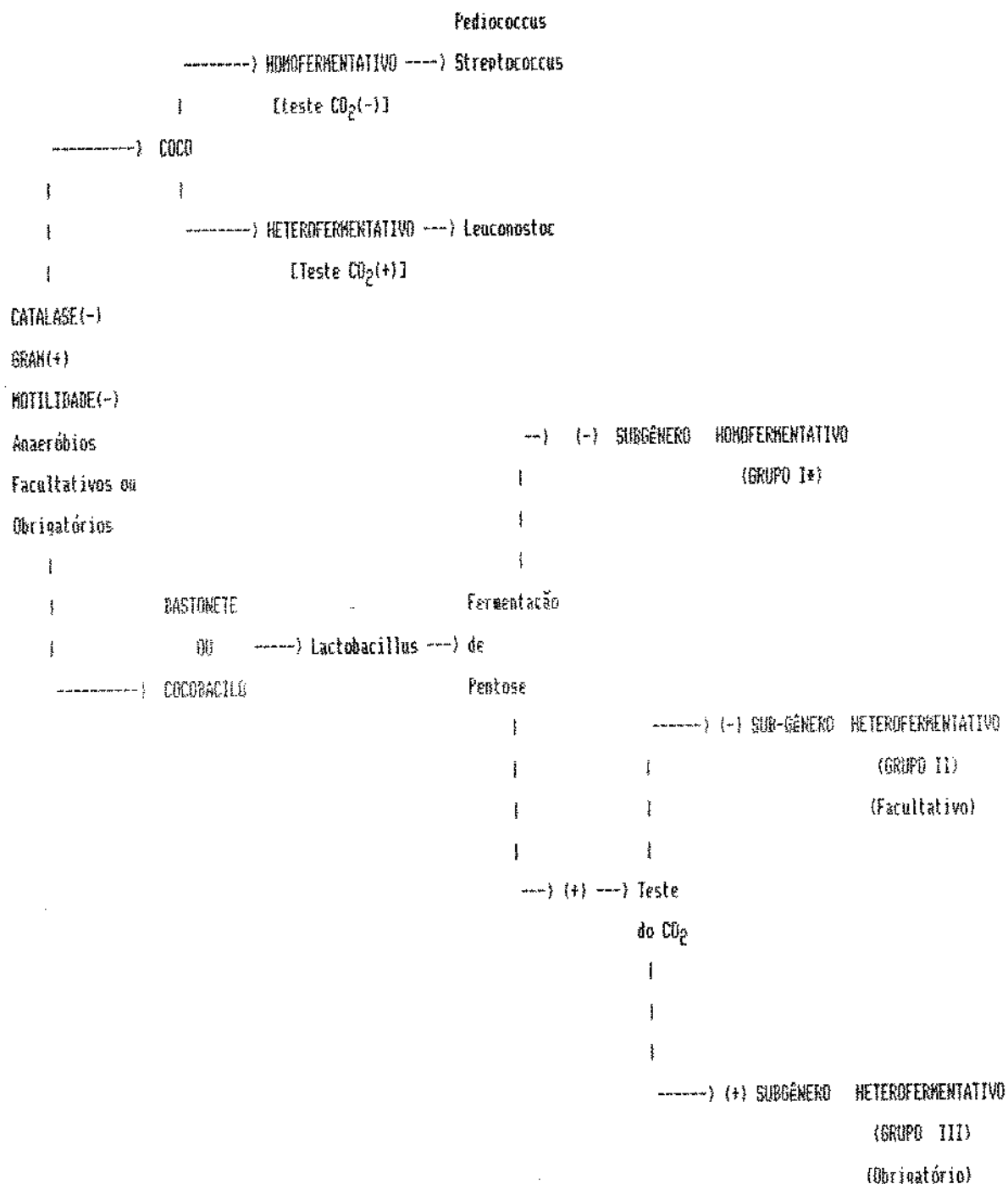
No crescimento em caldo MRS foram observados: o tipo de sedimento formado (liso, mucóide ou floculento) e presença de turvação ou não do meio (PELCZAR, 1957).

Em meio sólido (MRS AGAR) foi observado o crescimento das colônias quanto a forma: puntiforme, circular, filamentosa ou irregular; elevação: plana, elevada, convexa, pulvinada ou umbonada; margem: perfeita ou ondulada; diâmetro e pigmentação (PELCZAR, 1957). Na montagem úmida de lâminas com culturas frescas (24 horas de crescimento em caldo MRS) foram observadas a morfologia, arranjo e motilidade das células, sendo esta última confirmada posteriormente, juntamente com o teste de oxidação/fermentação da glicose, utilizando meio semi-sólido.

A morfologia e arranjo foram observados nos esfregaços corados para a reação de Gram, a partir de culturas com 24 horas de crescimento em caldo MRS.

1.5. IDENTIFICAÇÃO

As chaves de identificação das cepas isoladas estão nas figuras: 2 - gêneros e subgêneros; 3 - espécies de *Lactobacillus* heterofermentativos do Grupo II e 4 - espécies de *Lactobacillus* heterofermentativos do Grupo III (GARVIE, 1986; KANDLER e WEISS, 1986).



*As classificações dos Grupos I, II e III para *Lactobacillus* baseia-se na classificação de ORLA-JENSEN, 1919.

FIGURA 2- CHAVE PARA IDENTIFICAÇÃO ATÉ GÊNERO E SUB-GÊNERO PARA AS BACTÉRIAS ISOLADAS (GARVIE, 1986; KANDLER e WEISS, 1986).


```

--> Cel(-) --> Sac(-) --> Raf(-) --> Man(-) --> Lac(+) --> Melez(-) --> Melez(+) --> 15°C(+) 45°C(-) L. kefir
|
--> (d)
|
--> Cel (d) --> Sac(+) --> Raf(+) --> Man(+) --> Lac(+) --> Melez(-) --> Melib(+) --> 15°C(-) 45°C(+) L. fermentum
|
Rib(+)+Arab --> Sac(-) --> Raf(-) --> Man(-) --> Lac (d) --> Melez(-) --> Melib(+) --> 15°C(+) --> L. collinoides
|
|
| --> cel(-) --> Sac (d) --> Raf (d) --> Man(-) --> Lac (d) --> Melez----(+) --> Melib(+) --> 15°C(+) L. buchneri
| |
| |
| | --(-) --> Melib(+) --> 15°C(+) L. brevis
--> (+)
|
|
| --> Sac(+) --> Raf(+) --> Man(-) --> Lac(+) --> Melez(-) --> Melib(+) --> 15°C(+) 45°C(+) --> L. reuteri
|
|
| --> cel(+) --> Sac(-) --> Raf(-) --> Man(-) --> Melez(-) --> Melib(-) --> 15°C(-) 45°C(-) --> L. vaccinostercus

```

FIGURA 4- CHAVE PARA IDENTIFICAÇÃO DE *Lactobacillus* HETEROFERMENTATIVOS

OBRIGATÓRIOS - GRUPO III. (KANDLER e WEISS, 1986)

1.6. TESTES UTILIZADOS PARA A IDENTIFICAÇÃO

1.6.1. Catalase

Com uma pipeta "Pasteur", adicionou-se uma gota de água oxigenada a 3% sobre as colônias de 24 horas em meio MRS e, observou-se após alguns minutos, a produção de bolhas de oxigênio. Havendo formação de bolhas o teste terá resultado positivo, caso contrário o resultado será negativo (Mac FADDIN, 1980).

1.6.2. Pseudocatalase

O reagente de benzidina foi preparado com a mistura dos seguintes componentes: hidrocloreto de benzidina - 1g, ácido acético glacial - 20ml e água destilada - 30 ml. Aqueceu-se para dissolver os ingredientes, e após resfriamento foram adicionados 5 ml de álcool etílico 95%. O reagente foi armazenado em frasco escuro e sob refrigeração. Para o teste, adicionou-se algumas gotas do reagente às colônias e, em seguida, igual volume de água oxigenada a 5%. Após alguns minutos, as colônias de bactérias contendo heme-proteínas se colorem de azul esverdeado, sendo neste caso confirmada a presença de uma catalase clássica e não o tipo pseudocatalase, caso contrário, ausência de coloração - fica comprovada a pseudocatalase. (Mac FADDIN, 1980).

1.6.3. Citocromo Oxidase

As culturas inoculadas em placa de MRS-agar foram incubadas por 24 a 48 horas. Os volumes iguais de solução A e B (ver formulações abaixo) foram misturados e embebidos em um disco de papel de filtro e este foi introduzido na placa contendo a cultura. O desenvolvimento de coloração azul-púrpura dentro de trinta segundos foi considerado resultado positivo.

Solução A: N-dimetil-p-fenilenodiamina monohidrocloreto (DMFB) a 1% em água e solução B : 2-naftol em etanol a 1% (Mac FADDIN, 1980).

1.6.4. Formação de Esporos

Para detectar a presença de esporos utilizou-se a técnica de coloração por verde malaquita. Da cultura incubada por um certo tempo (30 dias) em meio apropriado (Sporulating agar - DIFCO), retirou-se uma alíquota com auxílio de alça de níquel-cromo, preparando-se um esfregaço em lâmina de microscópio. As células e os esporos foram fixados passando-se a lâmina três vezes sobre bico de Bunsen. Em seguida, o preparado foi exposto por quinze minutos no corante verde malaquita. Lavou-se com água e foi feita a contra-coloração, com safranina por vinte segundos. No microscópio óptico comum e óleo de imersão, a presença de esporos é detectada pela sua coloração verde e as células vegetativas pela coloração avermelhada (FIELDS, 1975).

1.6.5. Produção de Gás Carbônico

Foi utilizado o caldo MRS para verificação da produção de gás a partir de glicose. O meio foi distribuído em tubo de 16x150 mm com tampão de algodão. Após a inoculação incubou-se a 30°C, colocando-o dentro de um tubo maior de 24x250 mm juntamente com 10ml de solução saturada de hidróxido de bário. O tubo maior foi selado com rolha de borracha a fim de impedir a penetração do CO₂ atmosférico. Após incubação por 72 horas a 30°C, verificou-se a precipitação do carbonato de bário (CURRAN et alii, 1983). A inclusão de tubo controle (sem inóculo) permitiu elucidar dúvidas, quando havia a presença de pequenas quantidades de carbonato de bário nos tubos com cepas não produtoras de dióxido de carbono (cepas homofermentativas).

O resultado foi considerado positivo quando havia precipitado entre 24 a 72 horas de incubação.

1.6.6. Fermentação de Carboidratos

No interior do tubo de ensaio (12x75 mm) foram introduzidos 3 ml do meio de cultivo. O meio básico utilizado para este teste, o vermelho fenol agar (DIFCO), foi preparado conforme recomendação do fabricante, sendo que, em metade desse meio, introduziu-se o açúcar teste em forma de solução a 10% (esterilizado por filtração) num volume tal que a concentração final foi de 1%. Em seguida, inoculou-se a cultura de bactéria com alça de níquel-cromo, tomando-se o cuidado para inocular em primeiro o meio sem açúcar (controle), depois o meio com adição do açúcar a fim de

evitar a contaminação de açúcar no meio sem esse componente. No tubo inoculado acrescentou-se solução de agar 2% esterilizado na superfície para reduzir a tensão de oxigênio no interior do tubo.

Incubou-se a 30°C durante sete a quatorze dias. A leitura foi feita considerando resultado positivo o crescimento visível e a mudança da cor do meio de vermelho para amarelo devido a produção de ácido (Mac FADDIN, 1980). Os açúcares testados foram: glicose, ribose, sacarose, manose, arabinose, celobiose, lactose, rafinose, melezitose e melibiose.

1.8.7. Litmus Milk

O meio Litmus Milk, preparado em tubos de culturas e distribuído em tubos esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121°C, foi inoculado com a cultura através de alça de níquel-cromo. Incubou-se a 30°C por 7 a 14 dias. O desenvolvimento da cor vermelho-rosado indicou reação ácida - fermentação da lactose. A cor azulada indicou que não houve fermentação da lactose, e o organismo pôde ter atacado substâncias nitrogenadas presentes no meio. A cor branca indicou redução do Litmus (indicador de oxido-redução). Formação de coágulo indicou coagulação das proteínas do leite ou a conversão da caseína em paracaseína pela enzima renina. A produção de gás indicou a fermentação da lactose com produção de gás carbônico (Mac FADDIN, 1980).

1.6.8. Crescimento em Caldo MRS a 15 e 45°C

As cepas foram inoculadas em caldo MRS (obtidas após crescimento em caldo de composição idêntica e incubadas a 30°C por 24 horas) em duplicata, sendo que uma foi incubada a 15°C, e a outra a 45°C. Após 72 horas fez-se a leitura dos tubos e foi considerado resultado positivo, as culturas que apresentaram crescimento visível.

1.7. TESTES USADOS NA SELEÇÃO DO CONTAMINANTE

1.7.1. Resistência ao Álcool Etílico

Preparou-se caldo MRS em frasco Erlenmeyer de 250 ml e

esterilizou-se a 121°C por 15 min. Após resfriamento, introduziu-se álcool etílico em quantidade suficiente para obter frascos com 0, 5, 7 e 10% (v/v) no meio. Volumes de 6 ml foram transferidos desses frascos para tubos de ensaio estéreis (16x150 mm) com tampa de baquelite rosqueável. As culturas foram inoculadas em tubos contendo meio de caldo MRS nas quatro concentrações de álcool citadas acima, através de alça de níquel-cromo. A incubação foi a 30°C durante 72 horas e o crescimento visível foi considerado resultado positivo.

1.7.2. Flocculação do Fermento

O teste de flocculação foi executado de acordo com o método de YOKOYA e OLIVA-NETO (1990). Um volume total de 40 ml com suspensões de células de bactérias e leveduras foi colocado em um frasco Erlenmeyer de 125 ml. Agitou-se durante 10 minutos em um agitador orbital a 30°C a velocidade de 90 rpm. Após a agitação, uma amostra do sobrenadante foi cuidadosamente retirada deixando antes em repouso por 5 minutos.

A turbidez das amostras do sobrenadante foi lida com espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 600 nm.

1.8 Seleção do Agente Contaminante

A cepa nº 28 (*Lactobacillus fermentum*) foi escolhida para a realização dos ensaios de fermentação mista.

2. FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM CONDIÇÃO MISTA

2.1. MOSTO PARA FERMENTAÇÃO

Foi utilizado HTM (High Test Molasses) (MAGNANI et al. 1985), convenientemente diluído com água potável de forma a obter-se, para o mosto do 1º ciclo, uma quantidade de sólidos solúveis de 25º Brix e para os ciclos seguintes, 18º Brix. Como suplementação de sais adicionou-se 0,5 g/l de ureia. O mosto preparado foi esterilizado em autoclave a 121ºC por 15 minutos.

2.2. INÓCULO

O inóculo do 1º Ciclo, foi preparado pesando-se uma quantidade um pouco superior a 150 gramas de fermento comercial de panificação (Fleishmann) adquirido no mesmo dia. Lavou-se esse último, misturando-se com água destilada num volume tal que permitisse uma boa homogeneização e, em seguida, centrifugando-se em centrífuga refrigerada (International Mod. B-20A). Após essa lavagem, para remoção dos aditivos que podem vir com o fermento, pesou-se 150 gramas da massa de fermento centrifugada e misturou-se com 3,0 g/l de massa úmida de *Lactobacillus fermentum* nº 28 isolado e caracterizado neste trabalho, e diluiu-se para um volume final de 1 litro com água destilada.

A cultura de *Lactobacillus* utilizada foi obtida em quantidade suficiente para inoculação e com alta viabilidade, da seguinte maneira:

Da suspensão da cepa pura retirou-se assepticamente 1ml e adicionou-se em 9 ml de caldo MRS (DIFCO) em tubo de ensaio com tampão de algodão. O tubo foi incubado a 30°C por 24 horas. A transferência e cultivo foi repetida por tres vezes consecutivas (3 dias).

Preparou-se um outro caldo MRS com um volume de 90 ml, em frasco Erlenmeyer de 250 ml com tampão de algodão. O volume de 10 ml da cultura ativa de *Lactobacillus* do tubo de ensaio foi transferido ao frasco Erlenmeyer e incubado em estufa de 30°C por 24 horas.

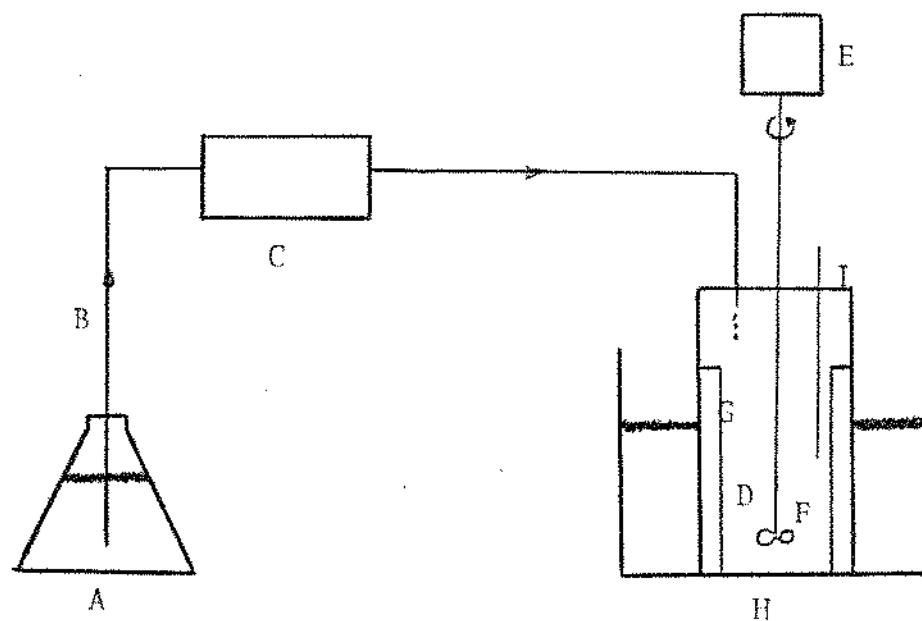
Preparou-se 900 ml de meio de cultivo a base de melaço com 2,5° Brix, em frasco Erlenmeyer de 2000 ml complementando-se com uréia a 0,5 g/l e esterilizando-se por autoclavagem a 121°C por 15 minutos. O conteúdo incubado do frasco de 250 ml foi transferido para o Erlenmeyer de 2000 ml com meio de melaço preparado. Incubou-se também a 30°C por 24 horas. As células de bactérias foram coletadas centrifugando-se a 7500 rpm por 12 minutos (Centrífuga International Modelo B-20 A). Uma quantidade suficiente de massa bacteriana foi obtida do centrifugado para adição no pé-de-cuba.

2.3. DESCRIÇÃO DO EQUIPAMENTO

O Fermentador consistiu de um banho termostatizado, modelo UNITEMP (FANEM - São Paulo - SP), uma cuba de vidro (capacidade de 4 litros) com tampa e um agitador mecânico (Modelo TE-85, FISATON - São Paulo). A cuba de vidro era parcialmente submersa na água do banho para manter a temperatura e serviu como o reator do processo. A agitação do líquido da cuba foi feita por palheta acoplada a haste do agitador.

O depósito do meio de cultura (mosto) estéril era conectado à cuba por meio de um tubo de silicone (0,5cm x 3m), passando por uma bomba dosadora peristáltica (Milan - Equip. Científ. LTDA - Colombo - Paraná) cuja função era controlar a vazão do líquido no tubo.

A temperatura do banho foi mantida a 32°C durante todo o período de ensaio. A figura 5 mostra um esquema do sistema utilizado neste trabalho.



- A - Reservatório do mosto
- B - Tubo de silicone
- C - Bomba dosadora peristáltica
- D - Bioreator
- E - Agitador mecânico
- F - Palheta acoplada a haste do agitador
- G - Chincanas simétricamente distintas (quatro)
- H - Banho termostatizado
- I - Termômetro

FIGURA 5 - Sistema utilizado nos ensaios de fermentação.

2.4. DESCRIÇÃO DE UM CICLO FERMENTATIVO.

Para o 1º ciclo, o inóculo foi preparado pela adição do fermento comercial e de *Lactobacillus*, em água potável, conforme descrito no item 2.2. Nos demais ciclos, o inóculo foi obtido da massa celular centrifugada do ciclo anterior. Para isso, a massa sem a lavagem, após centrifugação do mosto fermentado, foi diluída com o próprio "vinho" para um volume final de 1 litro. O inóculo preparado foi colocado na cuba de fermentação e mantido sob agitação por 30 minutos para sua homogeneização.

As primeiras amostras de 5 ml do inóculo e 10 ml do mosto de alimentação eram retiradas para análise. Em seguida a bomba foi acionada dando início à alimentação e fermentação. O acompanhamento foi feito por amostragens em intervalos de tempo regulares. A alimentação era interrompida com o esgotamento do mosto de alimentação, coincidindo com o tempo programado de enchimento (5,5 horas). O acompanhamento da fermentação foi feito até completar 10 horas de fermentação, retirando-se amostras de 5 ml a cada hora. Uma última amostra era retirada após 24 horas.

As análises da viabilidade e brotamento eram feitas nos tempos de 5 e 9 horas de fermentação, retirando-se pequenas amostras de mosto fermentado. Ao final da fermentação, o mosto fermentado (vinho) foi centrifugado e uma amostra (10 ml) era congelada para análises químicas. Com a massa celular centrifugada preparou-se o novo inóculo, recomeçando-se o ciclo fermentativo subsequente.

2.4.1. Condições Experimentais

A fermentação era realizada no sistema de batelada alimentada e as condições experimentais fixadas foram:

- Temperatura: 32°C.
- pH do mosto de alimentação: 5,2 - 5,5.
- tempo de enchimento: 5,5 horas.
- tempo total do ciclo: 24 horas.
- Graus Brix de substrato HTM: 25° (1° ciclo) e 18° (demais ciclos).
- Concentração de células de levedura: 24,6 g/l massa seca no (1° ciclo).
- Concentração de células de *Lactobacillus*: 0,123 g/l massa seca no (1° ciclo).
- Agitação: 300 rpm.
- Volume total: 2,9 litros.
- Volume do inóculo: 1 litro.
- Volume do HTM: 1,9 litros.
- Vazão de alimentação: 0,345 l/h.

2.4.2. Tratamento das Amostras do mosto fermentado

As amostras com um volume de 5 ml foram imediatamente congeladas para serem tratadas e analisadas após as fermentações, conforme o esquema da figura 6.

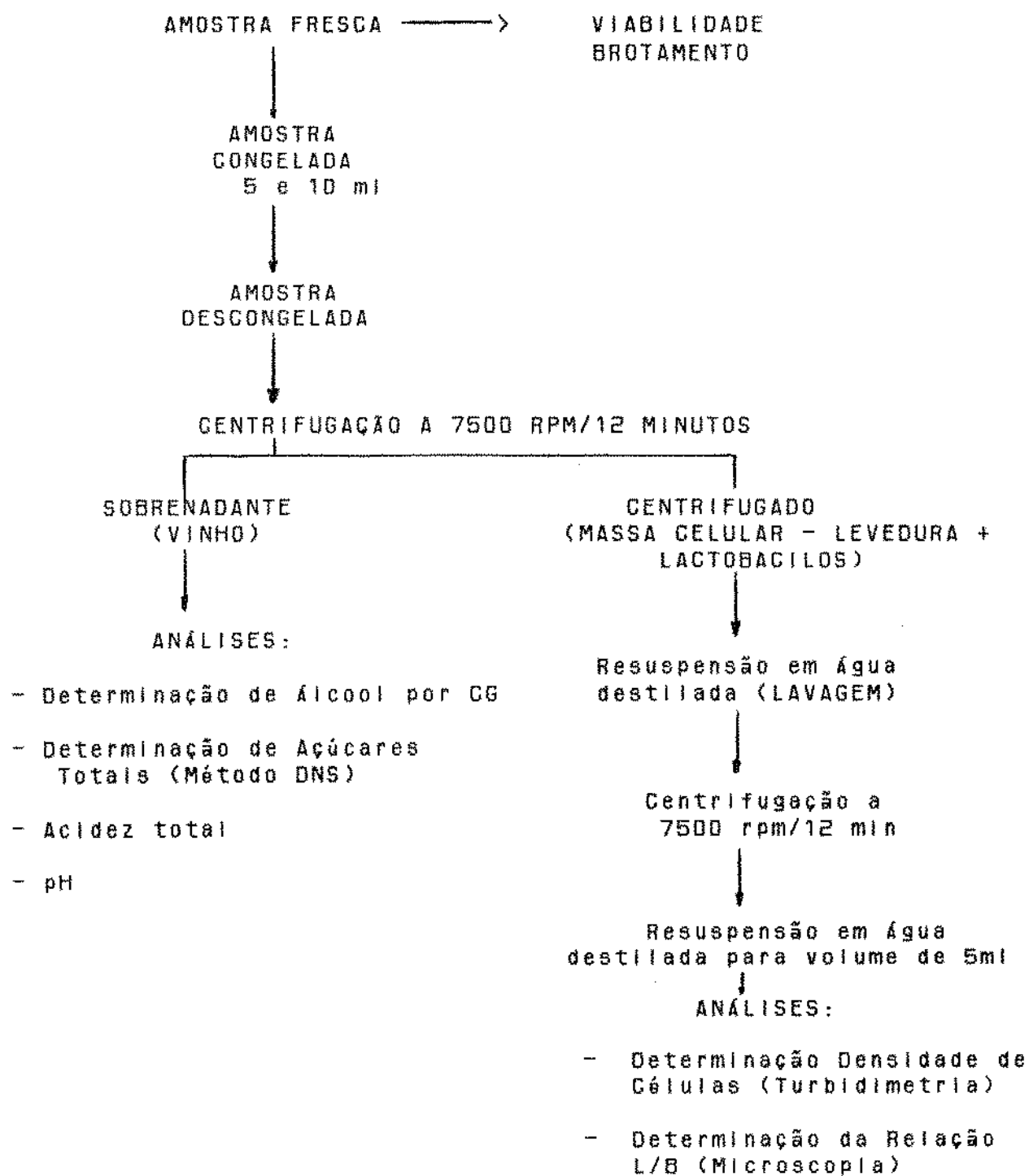


FIGURA 6 - Esquema do tratamento das amostras dos ensaios de fermentação

2.5. TÉCNICAS ANALÍTICAS

2.5.1. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA ANÁLISE DOS MICRORGANISMOS

2.5.1.1. Relação Levedura/Bactéria

A relação entre células de levedura e de bactérias foi feita seguindo a técnica de coloração com azul de metileno segundo LOFFER (Cit. NORRIS e RIBBONS, 1971). Cuidados especiais foram tomados, para observação das células bacterianas e diluição da amostra a fim de obter um número de células apropriado para a contagem no microscópio. A escolha dos campos foi feita ao acaso, observando-se 30 campos por lâmina e contando em torno de 10 células (entre levedura e bactéria) por campo. Contando-se 30 campos, fez-se uma média aritmética para se obter o valor da relação entre leveduras/bactérias.

2.5.1.2. Número de Células

O número de leveduras e de *Lactobacillus* nas amostras foi calculado utilizando-se: a relação levedura/bactéria, a densidade óptica total medida nas amostras centrifugadas e através de curvas de calibração feitas de maneira separada com culturas puras de *Saccharomyces uvarum* IZ 1904 e *Lactobacillus fermentum* no 18.

A densidade óptica total (levedura + bactéria) foi lida em espectrofotômetro Baush e Lomb, modelo Spectronic 20 a 600 nm

com as amostras centrifugadas, lavadas e convenientemente diluídas.

As curvas de calibração de células de leveduras e bactérias foram feitas, respectivamente, com culturas puras de *Saccharomyces uvarum* (faixa de concentração de 7,5 a 64,0 g/l) e *Lactobacillus fermentum* (0,03 a 7,6 g/l). As contagens do número de colônias viáveis de leveduras foram feitas para a faixa de concentração acima descrita através da técnica de semeadura em placas (SPECK, 1978) com meio agar de contagem padrão - PCA (DIFCO) e a adição de 0,01% de clorotetraciclina e 0,01% de cloranfenicol para evitar crescimento bacteriano. Para o caso de *Lactobacillus* repetiu-se o mesmo procedimento, porém com o meio agar MRS (DIFCO) + 0,01% de Actidiona.

Também para essas mesmas faixas de concentrações foram feitas as leituras de densidade ótica, da mesma forma que para a densidade ótica total descrita anteriormente. Com isso pôde ser resolvido o sistema com duas equações:

$$DOB = K_B (N_b) \quad (1)$$

$$DOL = K_L (N_l) \quad (2)$$

onde:

N_b = número de células de bactéria/ml.

N_l = número de células de levedura/ml.

DOB = densidade ótica de bactéria.

DOL = densidade ótica de levedura.

K_B = coeficiente angular da equação da reta da bactéria.

K_L = coeficiente angular da equação da reta da levedura.

Somando-se as equações 1 e 2 tem-se:

$$DOB + DOL = K_B N_b + K_L N_l \quad (3).$$

sendo que as constantes K_B e K_L eram conhecidas devido as curvas de calibração e, também, a densidade ótica total (DOT). Pôde-se então encontrar uma equação que através dos valores r e DOT permitiram calcular N_b e N_l , através de mais 2 equações:

$$r = N_l / N_b \quad (4)$$

$$DOT = DOB + DOL \quad (5)$$

substituindo as equações (4) e (5) em (3) obteve-se:

$$DOT = [K_B + (K_L.r)] N_b \quad (6)$$

Calculando N_b pôde-se calcular N_l pela equação 4.

No experimento a equação (6) ficou:

$$DOT = [(1,388 \times 10^{-9}) + (1,1778 \times 10^{-7}) * r] * Nb$$

sendo que o r da equação (4) variou a cada ciclo.

2.5.1.3. Concentração Celular

A determinação da concentração celular foi feita utilizando-se suspensões de células puras de *Saccharomyces uvarum* e *Lactobacillus fermentum*. As suspensões das culturas acima mencionadas foram centrifugadas e as células ressuspensas em água destilada e novamente centrifugadas (lavagem). O centrifugado foi então colocado em cadinho de alumínio (previamente tarado) e pesado. Após isso, a amostra contida no cadinho foi então colocada em estufa a 105°C para secagem por aproximadamente 5 horas (até peso constante) e, em seguida, resfriada em dessecador e pesada novamente. As duas relações obtidas, (para leveduras e bactérias) entre o peso da massa úmida pela massa seca, foram usadas para o cálculo da concentração celular de levedura e bactérias lácticas em gramas de matéria seca por litro de amostra.

2.5.1.4. Viabilidade e Brotamento das Leveduras

O número de células de leveduras vivas (viabilidade) e de brotamento, em relação ao total de células contadas, foi feito através de análise microscópica com o corante azul de metileno (LEE et alii, 1981) utilizando-se câmara de Neubauer sendo tomados os tempos de fermentação de 5 e 9 horas como parâmetros. Os resultados foram expressos em % de células vivas (viabilidade) e % de brotos vivos (brotamento) em função do número total de células.

las contadas.

2.5.2. Determinação de Açúcares Totais - ART

Inicialmente foi feita uma hidrólise ácida da amostra misturando 1 ml da amostra com 1 ml de HCl 2N, aquecendo-se durante 5 minutos a 100°C (em água fervente). Após resfriamento adicionou-se 1 ml de NaOH 2N e procedeu-se a determinação de ART pelo método de redução do ácido dinitrosalicílico (SUMMER, 1924; MILLER, 1959). Fez-se a curva de calibração com glicose na faixa de 0,5 a 1,4 g/l de glicose (0,2 a 0,6 de absorbância em espectrofotômetro Bausch e Lomb Espectronic 20. Os resultados foram expressos em gramas de açúcares totais por litro de mosto, calculados como glicose.

2.5.3. Determinação da Concentração de Etanol

A concentração de etanol foi determinada através de cromatografia gasosa em um cromatógrafo a gás da Instrumentos CG Ltda - São Paulo, modelo CG-37-D munido da coluna Porapak PS e a leitura feita por um integrador acoplado, modelo CG-20, do mesmo fabricante que o cromatógrafo. A amostra foi convenientemente diluída de forma que a leitura no integrador se apresentasse na faixa de 1 a 2 g/l de etanol. Foram fixados as seguintes condições: Vazão do gás de arraste (nitrogênio) = 30 ml/min.; temperatura de vaporização e do detector = 210°C; temperatura da coluna de 122°C; atenuação = 2; intervalo eletrômetro = 10^{-1} A/mU, sendo a curva de calibração feita por padronização externa com solução de

etanol 1,5 g/l.

2.5.4. Determinação do pH

A determinação do pH (concentração hidrogeniônica) foi feita com potenciômetro Corning Scientific Instr., modelo 110 calibrado com soluções tampão a pH 7,0 e 4,0, sendo o pH das amostras determinado nas mesmas condições de temperatura.

2.5.5. Determinação da Acidez Total

Um volume de 5 ml de amostra foi completado para 50 ml com água destilada recentemente fervida e, em seguida, titulado com NaOH - 0,1N usando fenolftaleína como indicador até viragem para coloração rosa (pH 8,3) (método AOAC 22038-22039, 1984). Para a padronização de NaOH foi usado o biftalato de potássio (dessecado a 120°C/2 horas antes de usado). A equação abaixo foi feita para um volume de 5 ml de amostra e usada para conversão do volume de NaOH gasto, para concentração (g/l) de ácido, expressa em ácido láctico:

$$\text{Acidez total (g ácido láctico/l)} = V \text{ (ml NaOH)} \times 0,98$$

2.8. CÁLCULOS

2.8.1. Rendimento

O rendimento em etanol (R) foi calculado da seguinte forma:

$$R = \frac{(Me_{10} - Me_0)}{Me \text{ teórica}} \times 100 \quad (\%)$$

onde: Me teórica = $0.511 \times F \times S_0 \times t_e$

S_0 = Conc. em glicose no substrato inicial (g/l)

F = vazão (l/h)

t_e = tempo de enchimento (horas)

Me_{10} = Massa de etanol produzida (gramas) ao final de 10 horas de fermentação.

Me_0 = Massa de etanol inicial (gramas) (tempo zero).

0,511 = coeficiente de transformação de glicose em etanol.

2.8.2. Produtividade de Etanol

A produtividade é uma grandeza cinética que expressa a velocidade média de produção de etanol. Ela foi calculada pela quociente entre a massa de etanol produzida e, o volume e tempo transcorrido para se atingir esta quantidade (neste experimento, 2,9 l. e 10 horas, respectivamente).

$$Pe = \frac{(Me_{10} - Me_0)}{t \times V} \quad (g/l.h)$$

$$Pem = \frac{(Me_{10} - Me_0)}{t \times Mt} \quad (g/g.h)$$

onde: t = tempo de fermentação (horas)

V = volume (litros)

Pe = produtividade de etanol expressa em g/l.h

Pem= produtividade de etanol expressa em g/g.h

Mt = massa total de células (leveduras+bactérias) após 10 horas de fermentação, em gramas.

2.6.3. Produtividade de Células

Analogamente à produtividade de etanol, a produtividade de células também expressa uma grandeza de velocidade média só que em relação à biomassa produzida em um intervalo de tempo e volume, no caso 10 horas e 2,9 litros, respectivamente.

$$Pb = \frac{(Mb - Mb_0)}{t \times V} \quad (g/l.h)$$

$$PI = \frac{(M_L - M_{Lo})}{t_e \cdot V} \quad (g/l.h)$$

onde:

Pb = Produtividade de massa de bactérias produzidas por hora e litros de mosto fermentado.

PI = Produtividade de massa de leveduras produzidas por hora e litros de mosto/(caldo) fermentado.

Mb = massa bacteriana ao final de 10 horas de fermentação (gramas)

M_l = massa de leveduras ao final de 10 horas de fermentação (gramas).

Mbo = massa inicial de células de bactérias.

Mlo = massa inicial de células de leveduras.

2.6.4. Taxa de Consumo de Açúcar

A taxa de consumo de açúcar (Ps) mede a velocidade média de consumo de açúcar total (ART) pela levedura e a bactéria em um determinado tempo e massa de células totais, no caso do tempo, 10 horas.

$$Ps = \frac{ARTc}{t \cdot Mt (g)} \quad (g/g.h)$$

onde:

ARTc = massa de açúcares totais consumidos durante 10 horas de fermentação, expresso em gramas de glicose.

2.6.5. Fator de Conversão - Yp/s

O fator de conversão - Yp/s - representa a quantidade de etanol produzido por unidade de massa de açúcar consumida. É dado por:

$$Yp/s = \frac{Me_{10} - Me_0}{ARTc} \quad (\text{gramas/gramas})$$

2.6.6. Fator de Conversão - Yp/s0

O fator de conversão Yp/s0 representa a quantidade de etanol produzido por unidades de massa de açúcar no substrato inicial. É um parâmetro importante já que relaciona o rendimento de álcool com a quantidade total de substrato no sistema. Permite interpretar o efeito da contaminação láctica não só na capacidade de consumir o açúcar total como também na produção de etanol. É dado por:

$$Yp/s0 = \frac{Me_{10} - Me_0}{ART \text{ total}} \quad (\text{g/g})$$

onde: ART total = massa de açúcares totais oferecida ao sistema,
expressa em gramas de glicose.

2.6.7. Porcentagem de Açúcar Consumido (%Ac)

Mede o consumo de açúcares totais pela massa microbiana, ao final de 10 horas de fermentação.

$$\%Ac = \frac{ART_c}{ART\ total} \times 100$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO SOBRE AS CULTURAS ISOLADAS

1. ANÁLISE QUANTITATIVA

Os resultados das contagens em placa (contagem viável) e tubos (número mais provável), além do pH das amostras, encontram-se descritos nas tabelas 1 e 2 respectivamente:

TABELA 1 - Contagem em placa de bactérias lácticas em amostras de "leite" de leveduras nas usinas Modelo e Santa Adélia, em placas com meio MRS+Actidiona(0,01%) e pH.

Amostras	Contagem em placas (ufc/ml)*	pH
Usina Santa Adélia 1	$4,0 \times 10^6$	3,3
Usina Santa Adélia 2	$4,8 \times 10^7$	4,1
Usina Modelo	$1,4 \times 10^5$	3,9

* ufc/ml - unidade formadora de colônia

Analisando-se a tabela 1 verifica-se que as amostras 1 e 2 da usina Santa Adélia (Jaboticabal - SP), apresentaram maior número de bactérias lácticas que a da usina Modelo. Isso era esperado já que, segundo informações obtidas na época da coleta, havia problemas de ordem microbiológica, na primeira usina.

2. CARACTERÍSTICAS DAS BACTÉRIAS LÁTICAS ISOLADAS DO "LEITE"

As características morfológicas e bioquímicas das cepas isoladas encontram-se descritas na tabela 2 (apêndice) . Todas as culturas isoladas eram bactérias lácticas, como esperado, já que o meio de isolamento foi o MRS(DIFCO) próprio para este grupo de microrganismos e o crescimento de bolores e leveduras foram evitadas com adição de actidiona a 0,01 %. Das 44 culturas isoladas, 40 eram em bastonetes Gram positivos e uma coco Gram positivo. Tres culturas foram perdidas ao longo da identificação.

2.1 Características da bactéria em forma de coco

A cultura nº 21 coco Gram positivo foi identificada como pertence ao gênero *Leuconostoc*. Esta cepa apresentou turbidez uniforme e sedimento liso no crescimento em meio líquido. As colônias em superfície de MRS agar (DIFCO) apresentaram-se pequenas, diâmetro pouco superior a 1 mm, lisas, perfeitamente circulares e não pigmentadas. O arranjo foi predominantemente em pares , havendo também células isoladas e em cadeias curtas. Apresentou metabolismo fermentativo e oxidativo, particularmente, heterofermentativo com produção de gás que distingue *Leuconostoc* dos demais cocos Gram positivos, catalase negativos (figura 2). Em LITMUS MILK (DIFCO) esta cepa mostrou-se inativa após 14 dias de incubação a 30 °C. Na realidade, o litmus é um meio pobre para *Leuconostoc* que usualmente é inativo nesse meio (GARVIE - 1986). Não houve crescimento nem a 45° C nem a 15° C. Os testes de fermentação de açúcares : glicose, lactose, ribose, celobiose, rafinose, e arabinose apresentaram resultado positivo; já com os

açúcares: sacarose, melezitose, melibiose e manose apresentaram resultados negativos. Comparando-se os resultados com a figura 2, pôde-se identificar essa cepa como *Leuconostoc*. Este pela literatura (GARVIE, 1986) não apresenta a enzima catalase. O teste da catalase apresentou resultado positivo para esta cepa, porém isso não era devido a catalase clássica mas uma pseudocatalase. Isso foi confirmado pelo teste da pseudocatalase que demonstrou a ausência do grupo heme (típico da catalase clássica). Estes resultados estão de acordo com a literatura (Mac FADDIN, 1980) já que no caso de bactérias lácticas, pode estar presente uma pseudocatalase com atividade peroxidase. A dúvida entre ser um estafilococo ou *Leuconostoc*, foi eliminada pela: (a) presença de falso catalase positivo, (b) ausência de arranjo típico em cachos e (c) produção de ácido a partir de arabinose, celobiose e rafinose. (SCHLEIFER 1986).

Essa cultura (de nº. 21) apresentou ainda forte resistência ao álcool mantendo o mesmo padrão de crescimento com turvação uniforme.

2.2 CARACTERÍSTICAS DAS BACTÉRIAS EM FORMA DE BASTONETES

Todos os 40 bastonetes Gram positivos eram do gênero *Lactobacillus*. Apresentaram crescimento lento em superfície de MRS agar (DIFCO), o que era esperado por tratar-se de um microaerófilo. Apresentaram-se como colônias puntiformes, esbranquiçadas, a maioria com bordas irregulares exceto as culturas 4,7, 10, 15, 17,18, e 19, que se mostraram mais regulares quanto a borda. Nenhuma colônia apresentou pigmento.

O crescimento em caldo apresentou turbidez uniforme com sedimento liso em 30 culturas e sedimento floculento em 10 culturas, sendo que oito com turbidez do meio uniforme e duas com meio límpido (culturas 4 e 15). O arranjo das células se mostrou bastante variado, na maioria, em pares isolados e, em menor número, cadeias curtas (ver tabela 2).

Na montagem úmida todas apresentaram-se imóveis, sendo observadas cápsulas nas culturas 5 e 7.

Apenas quatro cepas não produziram CO₂ no teste com hidróxido de bário, sendo portanto a maioria heterofermentativa. (Figura 7)

No teste de oxidação/fermentação da glicose, a maioria mostrou-se inativa no meio OF BASAL (DIFCO). Na verdade, em virtude dos altos requerimentos nutricionais dos lactobacilos, o meio acima citado não se mostrou satisfatório para este grupo de microrganismos, mesmo com adição de extrato de levedura ao meio. Foi necessário mudar o meio utilizando-se o meio basal de fenol vermelho agar (DIFCO), com o qual obteve-se resultados mais sa-

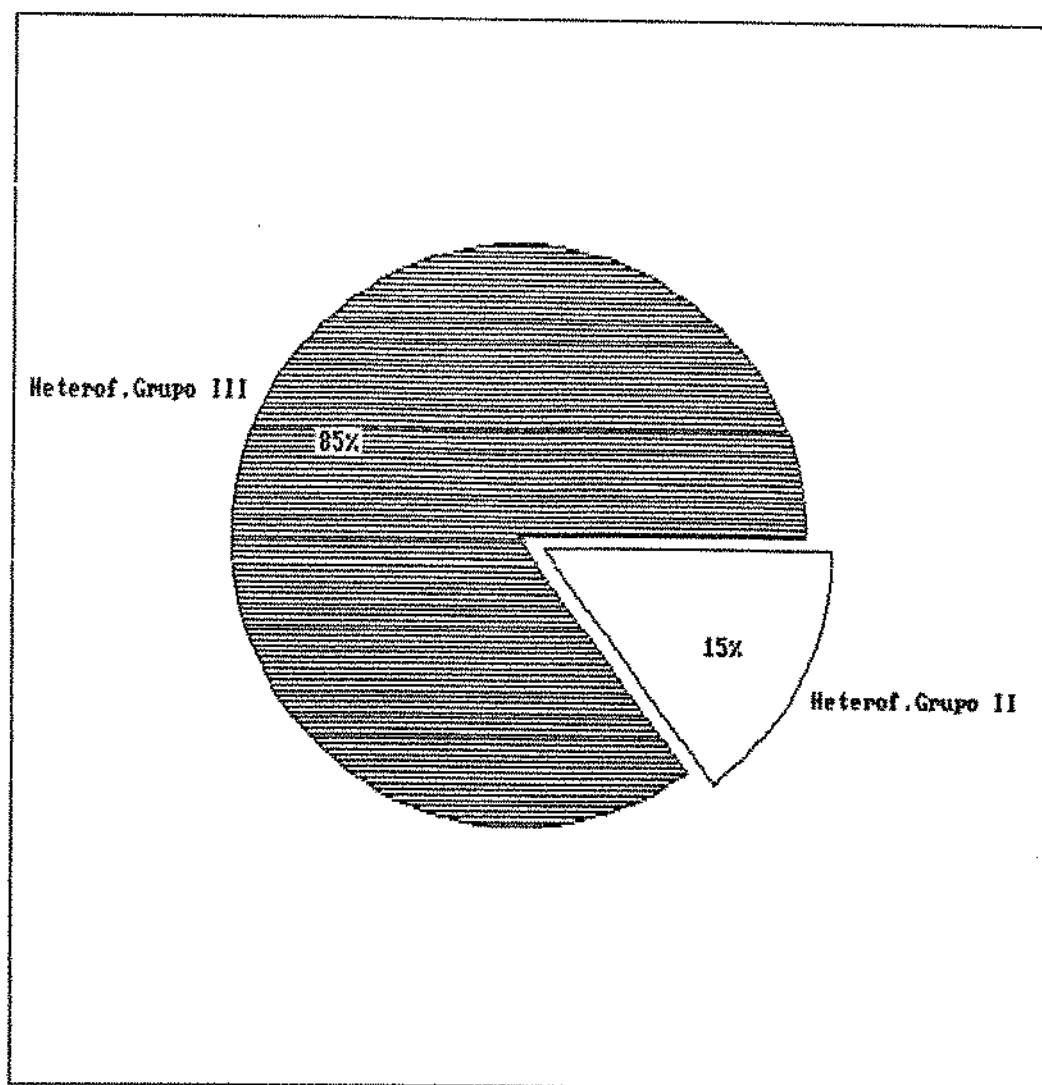


FIGURA 7 - Distribuição dos lactobacilos quanto ao tipo fermentativo.

tisfatórios, pois este contém maior quantidade de peptona assemelhando-se mais ao MRS (MAN et alli, 1960)

O resultado obtido para as 40 culturas, em relação ao teste de metabolismo fermentativo e/ou oxidativo dos carboidratos, mostrou maior crescimento no meio com redução de oxigênio comparado com o meio sem a sobrecamada de ágar, essa característica é própria de *Lactobacillus* que é microaerófilo, desenvolvendo-se melhor em meios com reduzida tensão de oxigênio. (KANDER and WEISS, 1986).

Em LITMUS MILK (DIFCO), a maioria dos lactobacilos isolados permaneceram inativos. Apenas quatro cepas acidificaram o meio (culturas 7,16,20 e 44), sendo que somente duas (n 7 e 20) coagularam o leite e, em seguida, desfizeram o coágulo. (tabela 2).

As quarenta cepas foram subdivididas em dois grandes grupos: a) as "homofermentativas" em número de seis (cepas de nºs 3,4,14,16,37 e 44) que fermentaram a pentose ribose e não produziram gás CO₂, identificadas como pertencentes ao grupo II da classificação de ORLA-JANSEN - 1919, Heterofermentativas Facultativas; b) as "heterofermentativas" totalizando 34 cepas (as cepas restantes excessão as de nºs 24,32 e 36 que foram perdidas e n 21 - em forma de coco), identificadas como pertencentes ao grupo III - Heterofermentativas Obrigatórias, seguindo a classificação do autor acima citado.

Para os lactobacilos "homofermentativos", os testes bioquímicos de fermentação de açúcares serviram para a identificação de duas espécies, *Lactobacillus murinus* e *Lactobacillus plantarum*, A diferenciação entre essas duas espécies foi possível

através de teste de crescimento a temperaturas de 15 e 45°C, pois *Lactobacillus plantarum* cresce a 15°C e não a 45°C e *Lactobacillus murinus*, o contrário.

Em relação aos lactobacilos "heterofermentativos", a combinação dos testes bioquímicos sobre carboidratos e os testes de crescimento a temperaturas de 15 e 45°C, permitiram a identificação de duas espécies: *Lactobacillus fermentum*, em maior número e *Lactobacillus vacciностercus*.

Os seis lactobacilos do grupo II foram identificados como sendo: *Lactobacillus murinus* (n^{os} 4, 5, 14 e 37), *Lactobacillus plantarum* (n^o 16) e, *Lactobacillus plantarum* ou *murinus* (n^o 44). Dos 35 lactobacilos do grupo III, 3 não foram identificados até espécie (n^{os} 15, 17 e 40), 27 como sendo *Lactobacillus fermentum* as cepas de números 1, 2, 3, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 19, 20, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 31', 33, 34, 35, 38, 39 e 42. *Lactobacillus vacciностercus* como as de números: 7, 18, 41 e 43. As que morreram foram as de números: 24, 32 e 36. A figura 8 ilustra a distribuição total da microbiota isolada, e a tabela 3, a relação das cepas identificadas.

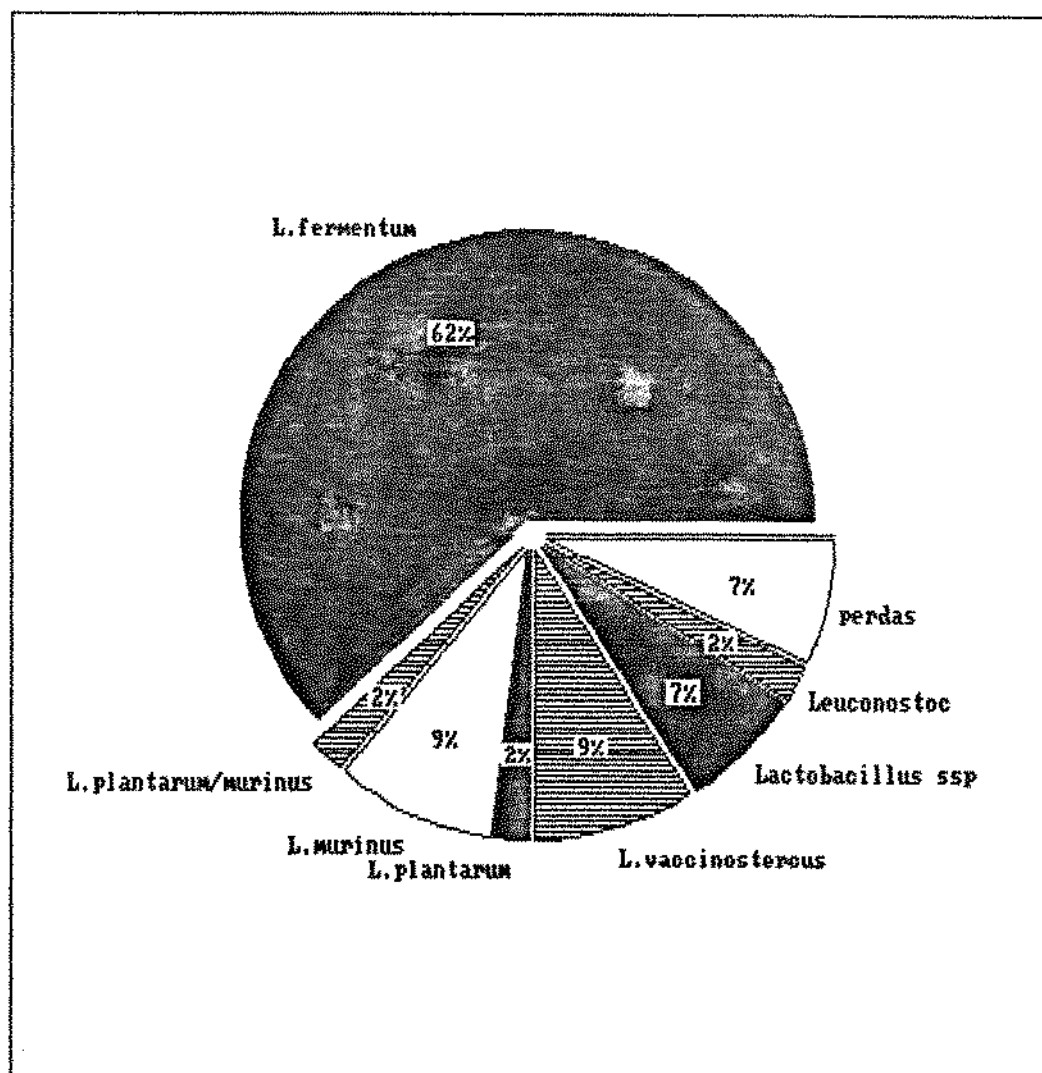


FIGURA 8 - Distribuição percentual da microbiota bacteriana de usinas de produção de etanol.

TABELA 3 - Identificação das bactérias lácticas isoladas de usi-
nas de produção de etanol.

N	IDENTIFICAÇÃO
1	- <i>Lactobacillus fermentum</i>
2	- <i>Lactobacillus fermentum</i>
3	- <i>Lactobacillus fermentum</i>
4	- <i>Lactobacillus murinus</i>
5	- <i>Lactobacillus murinus</i>
6	- <i>Lactobacillus fermentum</i>
7	- <i>Lactobacillus vaccिनosterculus</i>
8	- <i>Lactobacillus fermentum</i>
10	- <i>Lactobacillus fermentum</i>
12	- <i>Lactobacillus fermentum</i>
13	- <i>Lactobacillus fermentum</i>
14	- <i>Lactobacillus murinus</i>
15	- <i>Lactobacillus</i> sp
16	- <i>Lactobacillus plantarum</i>
17	- <i>Lactobacillus</i> sp.
18	- <i>Lactobacillus vaccिनosterculus</i>
19	- <i>Lactobacillus fermentum</i>
20	- <i>Lactobacillus fermentum</i>
21	- <i>Leuconostoc</i>
22	- <i>Lactobacillus fermentum</i>
23	- <i>Lactobacillus fermentum</i>
24	- perdida
25	- <i>Lactobacillus fermentum</i>
26	- <i>Lactobacillus fermentum</i>
27	- <i>Lactobacillus fermentum</i>
28	- <i>Lactobacillus fermentum</i>
29	- <i>Lactobacillus fermentum</i>
30	- <i>Lactobacillus fermentum</i>
31	- <i>Lactobacillus fermentum</i>
31,	- <i>Lactobacillus fermentum</i>
32	- perdida
33	- <i>Lactobacillus fermentum</i>
34	- <i>Lactobacillus fermentum</i>
35	- <i>Lactobacillus fermentum</i>
36	- perdida
37	- <i>Lactobacillus murinus</i>
38	- <i>Lactobacillus fermentum</i>
39	- <i>Lactobacillus fermentum</i>
40	- <i>Lactobacillus</i> sp.
41	- <i>Lactobacillus vaccिनosterculus</i>
42	- <i>Lactobacillus fermentum</i>
43	- <i>Lactobacillus vaccिनosterculus</i>
44	- <i>Lactobacillus plantarum/murinus</i>

Segundo KANDLER & WEISS (1986) *Lactobacillus fermentum* geralmente cresce a 45°C, porém dentre os identificados somente 48% cresceram bem a essa temperatura. Dificuldades na identificação baseadas nas temperaturas máximas e mínimas (respectivamente 45 e 15°C) eram esperadas, pois esses dados segundo BRYAN-JONES (1975), podem ser falhos para lactobacilos isolados de destilarias, devido a adaptação a um ambiente muito específico. Os resultados obtidos nos testes de fermentação de carboidratos, para as 40 cepas, apresentaram poucas divergências daquelas apresentadas por KANDLER & WEISS (1986). As cepas identificadas como *Lactobacillus vacciostercus*, estavam em conformidade com os dados obtidos na literatura (KANDLER and WEISS, 1986) quanto aos testes de temperatura e fermentação de carboidratos, exceto melibiose que para todas as cepas obteve-se resultado positivo, sendo que os resultados esperados deveriam ser negativos (tabela 2). Como já foi discutido, as condições como pH, nutrientes, e o ambiente altamente seletivo de onde foram isolados os microrganismos podem ter contribuído para este resultado, já que para todos os outros açúcares não houve discrepância com os dados da literatura.

Outros testes mais aprimorados, que necessitam de técnicas e aparelhos mais sofisticados seriam necessários para uma identificação mais segura. Os testes de % de guanina mais citosina (G+C) do DNA, perfil eletroforético de proteínas e análises dos componentes da parede celular são usados para a identificação de espécies de bactérias lácticas. Isso pode ser bem ilustrado na diferenciação de *Lactobacillus fermentum* de *Lactobacillus reuteri*.

ri, que requer a determinação da % de moles de G+C do DNA, diaminácido de mureína e mobilidade eletroforética. (KANDER e WEISS, 1986).

2.3 RESISTÊNCIA A ÁLCOOL E FLOCULAÇÃO

Os resultados do teste de resistência ao álcool etílico a 7% (v/v), da tabela 4, mostraram que *Lactobacillus* e *Leuconostoc* isolados das duas usinas não mostravam diferenças significativas. Nos dois casos apresentaram resistência ao etanol a 7%, em 95 a 100% das cepas. Já no teste com 10% (v/v) de álcool etílico, houve uma diferença bastante significativa entre as amostras dessas usinas. Somente 45% das cepas da Usina Modelo se apresentaram resistentes a 10 % de álcool, enquanto que na Usina Santa Adélia esse índice foi de 73%. Isso pode ser devido ao estado de adaptação das cepas isoladas da segunda usina, já que as mesmas foram encontradas em número relativamente alto caracterizando uma infecção. A figura 9 mostra a distribuição total entre as cepas isoladas resistentes a 10 % de etanol o que indica uma alta porcentagem (64%).

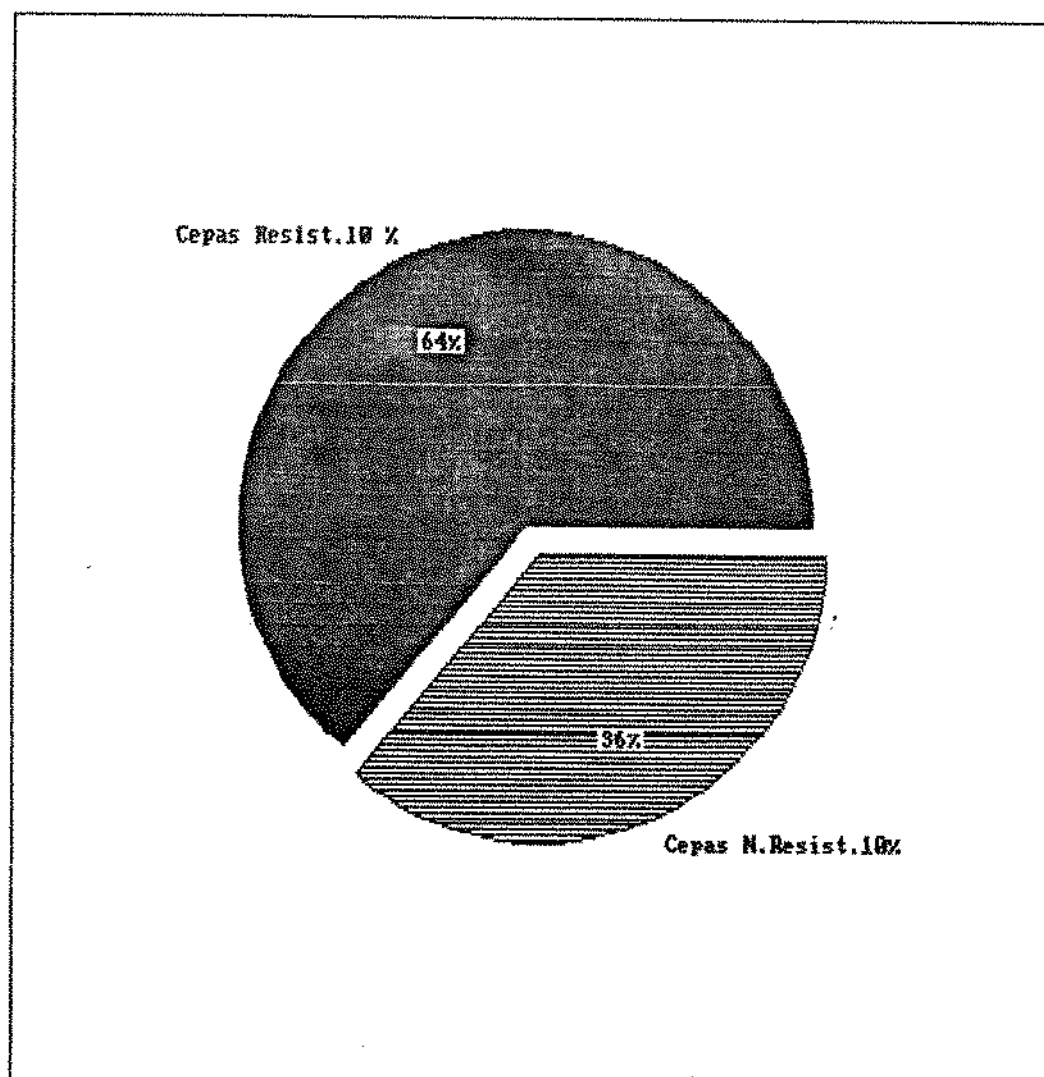


FIGURA 9 - Distribuição das cepas isoladas resistentes a 10% (v/v) de etanol.

TABELA 4 - Caracterização das 41 cepas isoladas com relação a resistência a 7 e 10 % (v/v) de álcool etílico

% álcool	usina Santa Adélia				usina Modelo	
	Amostra 1	2	1+2		3	
	n.	n.	n	%	n.	%
Crescimento 7%	10	11	21	95	11	100
Inibição a 7%	0	1	1	5	0	0
Não testado	1	1	2		6	
total testado	10	12	22	100	11	100
Crescimento 10%	6	10	16	73	5	45
Inibição 10%	4	2	6	27	6	55
Não testado	1	1	2			
Total testado	10	12	22	100	11	100

n. quantidade de cepas

A figura 10 apresenta o percentual total das cepas isoladas que flocularam o fermento. Na tabela 5 pode-se analisar o percentual em relação as amostras. Foi encontrado um número elevado de cepas floculentas nas amostras 1 e 2 (74%) da usina Santa Adélia. Isso, associado ao número de células expressivamente maior encontrado (respectivamente $4,0 \times 10^6$ e $4,8 \times 10^7$ células por ml) na usina Santa Adélia, demonstrou coerência nos resultados encontrados e permitiu indicar sobre um dos possíveis agentes causadores do fenômeno da floculação na usina amostrada - o

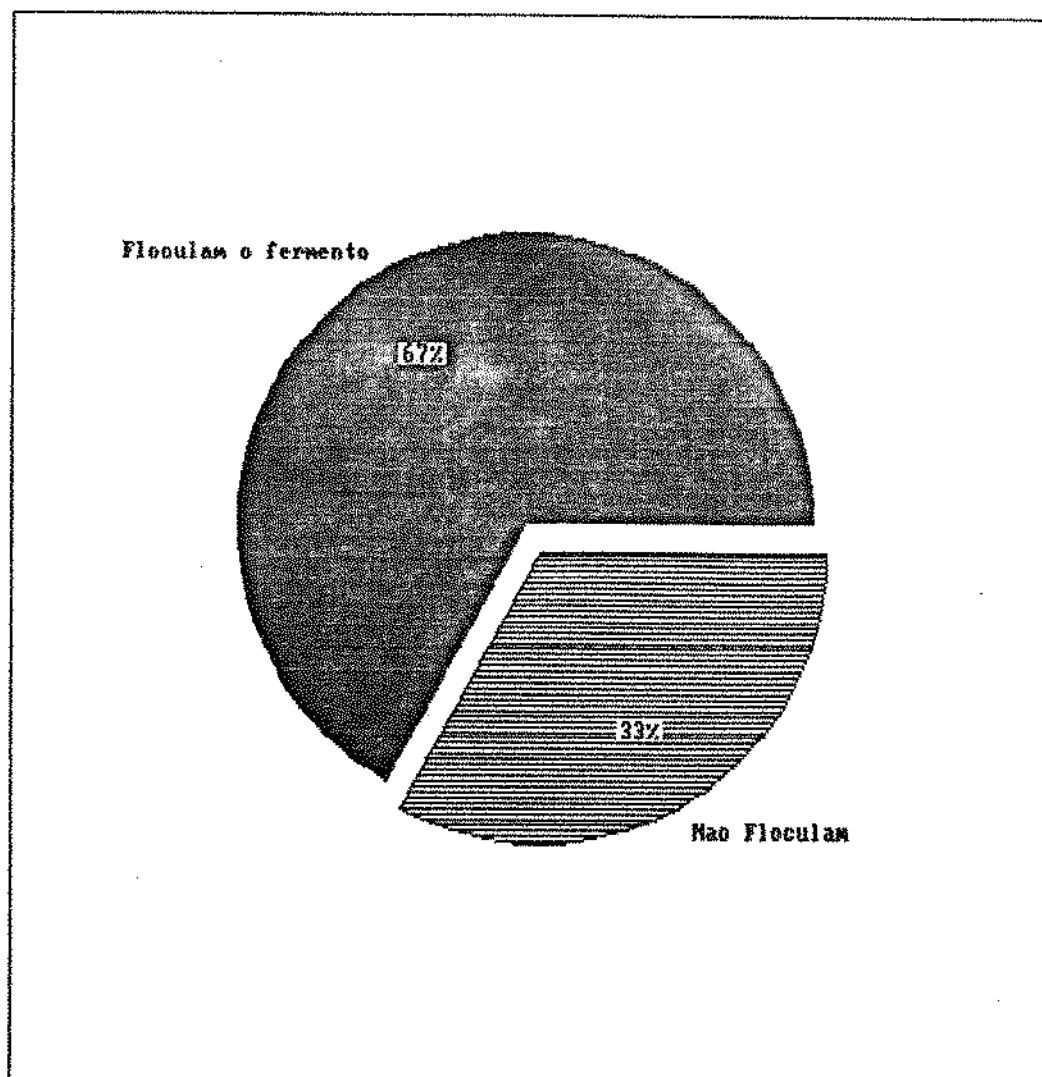


FIGURA 10 - Distribuição das cepas isoladas quanto a capacidade de floccular o fermento.

Lactobacillus fermentum. Essa foi a bactéria mais predominantemente encontrada (tabela 3).

TABELA 5 - Caracterização das 41 cepas isoladas quanto a floculação do fermento comercial.

tipos	usina Santa Adélia				usina Modelo	
	Amostras	1	2	1+2	3	
		n.	n.	n. %	n. %	
floculento		7	10	17 74	7	64
não floculento		4	2	6 26	4	36
não testadas		2	1	3	2	
total testadas		11	12	23 100	15	100

RESULTADOS DOS ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO

1. RESULTADOS DO 1º AO 6º CICLO

1.1 - 1º Ciclo - Dia 25/11/89

Condições iniciais:

Ml= 24,63 g/l

nl= $4,4 \times 10^8$ cel./ml

Mb= 0,123 g/l

nb= $2,3 \times 10^8$ cel./ml

S(mosto)= 272,8g/l

P(etanol residual)= 3,95g/l

Resultados obtidos:

R= 61,7%

ART consumido= 87,8%

Ps=1,08g/gh

r(l/b)= 2,0

Pem=0,386g/gh

Brotos vivos (5h)= 9,49%

Pe =5,60 g/lh

Brotos vivos (9h)=10,3%

Pxb=3,95mg/lh

Brotos mortos(5h)= 0,20%

Pxl=0,585g/l.h

Brotos mortos(9h)= 0,43%

Acidez tot.(vinho)

Viabilidade (5h)=96,6%

expres.ac.lático=4,31g/l

Viabilidade (9h)=96,8%

pH (vinho)= 4,00

rel.Brot. v/m(9h)=24,0

Yp/s = 0,360

Yp/so = 0,299

Os valores de tempo, volume, concentrações de massa e número de células de levedura e bactérias, açúcares totais (ART) e etanol acumulado do 1º ciclo, estão na tabela 6.

TABELA 6 - Valores de concentração de massa e número de células (levedura e bactérias), ART residual e etanol acumulado para o 1º ciclo

tempo (h)	volume (l)	levedura		bactéria		ART residual	etanol acumulado
		[g/l]	Nc/ml*10 ⁸	[g/l]	Nc/ml*10 ⁸	[g/l]	[g/l]
0	1,00	24,6	4,4	0,123	2,3	5,2	3,95
0,5	1,18	23,3	4,2	0,116	2,1	21,5	7,50
1,0	1,36	20,7	3,7	0,102	1,9	27,7	15,8
2,0	1,76					38,7	21,9
2,5	1,91	16,7	2,9	0,080	1,5		
3,0	2,09					56,6	26,4
4,0	2,45					74,4	30,1
5,0	2,86	12,6	2,2	0,060	1,1	78,3	34,9
6,0	2,86					67,6	40,3
7,0	2,86	14,0	2,4	0,067	1,2	41,2	43,2
8,0	2,86					40,6	47,1
9,0	2,86	14,4	2,5	0,069	1,3	28,3	55,1
10,0	2,86	14,5	2,5	0,069	1,3		

Os valores de tempo, biomassa, massa de ART (adicionado, consumido e residual) e etanol acumulado (produzido+resíduo do inóculo); estão na tabela 7 e na figura 11.

TABELA 7 - Valores de biomassa, massa de ART (res., adic e consumido) e etanol acumulado para o 1º ciclo.

tempo (h)	biomassa		massa de ART (g)			etanol(g) acumulado
	l(g)	b(g)	residual	adiconado	consumido	
0	24,6	0,123	5,16	0,00	0,00	3,95
0,5	27,5	0,137	25,4	49,6	24,2	8,87
1,0	28,2	0,139	32,4	99,2	66,9	21,6
2,0			68,0	206	138	38,5
2,5	31,9	0,153				
3,0			118,3	298	179	55,2
4,0			182,6	397	214	73,8
5,0	36,1	0,172	224,2	508	284	100
6,0			193,6	508	315	115
7,0	40,1	0,192	117,9	508	390	124
8,0			116,1	500	392	135
9,0	41,2	0,198	80,9	508	427	158
10,0	41,5	0,198	58,1	508	450	164

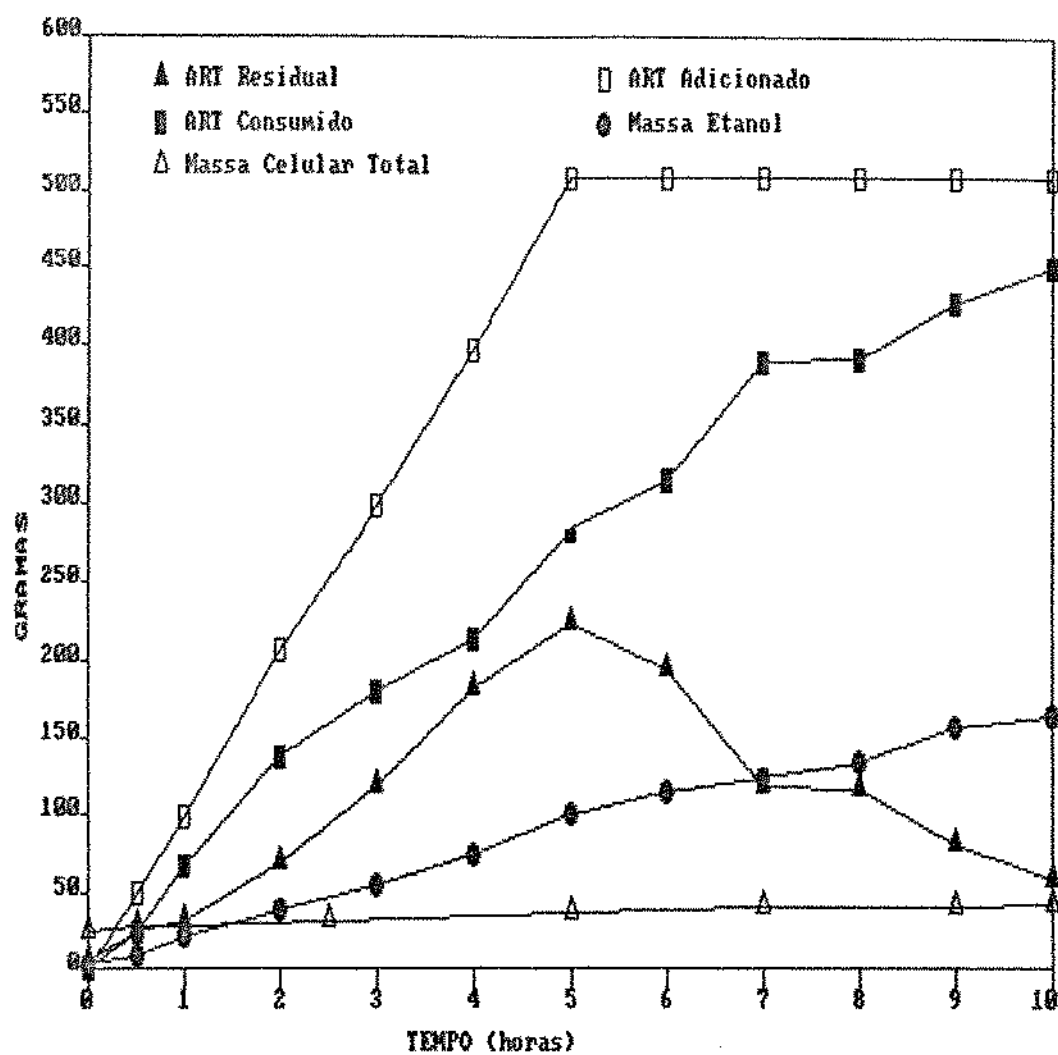


FIGURA 11 - Massa de : ART, etanol acumulado (produzido+resíduo do inóculo) e células (leveduras+bactérias); em 10 horas de fermentação no 1º ciclo.

Condições iniciais:

Ml=25,0 g/l	nl= $4,49 \times 10^8$ cel./ml
Mb=0,067g/l	nb= $1,25 \times 10^8$ cel./ml
S(mosto)= 178,3g/l	P(etanol residual)= 57,4g/l

Resultados obtidos:

R= 75,4%	ART consumido=83,3%
Ps=0,836 g/g.h	r(l/b)=3,59
Pem=0,379 g/g.h	Broto vivos (5h)= 4,0 %
Pe =3,95 g/l.h	Broto vivos (9h)= 9,8 %
Pxb=3,95 mg/gh	Broto mortos(5h)= 0,80 %
Pxl=0.306 g/gh	Broto mortos(9h)= 0,58 %
Acidez tot.(vinho)=3,54g/l	Viabilidade (5h)= 93,3 %
Acidez produzida= 1,79g/l	Viabilidade (9h)= 92,1 %
pH (vinho)= 4,12	rel.Brot. v/m(9h)= 17,0
Yp/so =0,333	
Yp/s =0,453	

Os valores de tempo, volume, concentrações de massa e número de células de levedura e bactérias, açúcares totais (ART) e etanol acumulado estão na tabela 8.

TABELA 8 - Valores de concentração de massa e número de células (levedura e bactérias), ART residuais e etanol acumulado para o 2º ciclo.

tempo		volume		levedura		bactéria		ART	etanol
								residual	acumulado
(h)	(l)	[]g/l	Nc/ml*10 ⁸	[]g/l	Nc/ml*10 ⁸	[]g/l	[]g/l		
0	1,00	25,0	4,5			0,067	1,3	7,38	57,4
0,5	1,19	21,9	3,9			0,059	1,1	25,2	55,0
1,0	1,37	19,1	3,4			0,051	0,9	38,7	50,8
2,0	1,75							56,6	45,3
2,5	1,93	14,1	2,4			0,036	0,7		
3,0	2,12							60,9	43,9
4,0	2,49							63,9	42,5
5,0	2,86	10,2	1,7			0,025	0,5	70,9	42,2
6,0	2,86							53,5	45,8
7,0	2,86	10,9	1,8			0,027	0,5	44,3	51,6
8,0	2,86							35,7	55,9
9,0	2,86	11,5	1,9			0,029	0,5	25,0	59,5
10,0	2,86	11,8	2,0			0,030	0,6	17,2	64,8

Os valores de tempo, biomassa, massa de ART (adicionado, consumido e residual) e, etanol acumulado (produzido+resíduo do inóculo); estão na tabela 9 e na figura 12.

TABELA 9 - Valores de biomassa, massa de ART (res., adic. e consumido), e etanol acumulado para o 2º ciclo.

tempo (h)	biomassa		massa de ART (g)			etanol(g)
	l(g)	b(g)	residual	adicionado	consumido	acumulado
0	25,0	0,067	7,38	0,00	0,00	57,4
0,5	26,0	0,070	29,9	33,3	3,36	65,3
1,0	26,2	0,070	53,2	66,6	13,4	69,7
2,0			98,8	133	34,3	79,2
2,5	27,3	0,070				
3,0			129	200	70,6	93,0
4,0			159	266	107	106
5,0	29,2	0,072	203	333	129	129
6,0			153	333	179	131
7,0	31,2	0,077	127	333	206	148
8,0			102	333	231	160
9,0	33,0	0,083	71,5	333	261	171
10,0	33,8	0,086	49,3	333	283	186

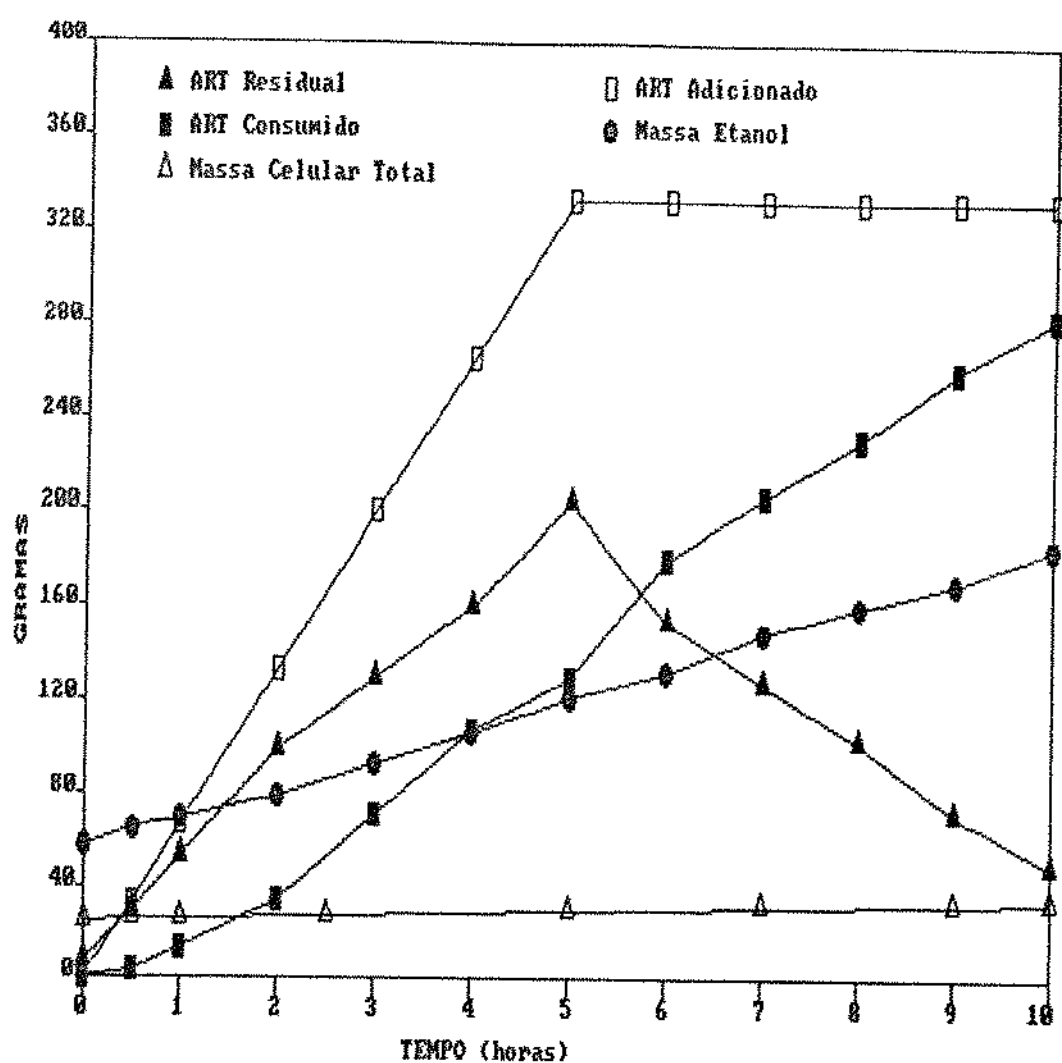


FIGURA 12 - Massa de : ART, etanol acumulado (produzido+resíduo do inóculo) e células (leveduras+bactérias); em 10 horas de fermentação no 2º ciclo.

Condições iniciais:

Ml=24,2g/l	nl= $4,3 \times 10^8$ cel./ml
Mb=0,04g/l	nb= $0,72 \times 10^8$ cel./ml
S(mosto)=170,6 g/l	P(etanol residual)=60,4 g/l

Resultados obtidos:

R= 77,5%	ART consumido= 85,2 %
Ps=0,900g/g.h	Brotos vivos (5h)= 9,24 %
Pxl=0,20 g/g.h	Brotos vivos (9h)= 4,03 %
Pxb=0,18 mg/g.h	Brotos mortos(5h)= 1,45 %
r(l/b)= 6,0	Brotos mortos(9h)= 1,85 %
Acidez tot.(vinho)=3,04g/l	Viabilidade (5h)= 88,9 %
Acidez produzida= 1,22	Viabilidade (9h)= 81,7 %
pH (vinho) = 4,12	rel.Brot. v/m(9h)= 2,2
Pem= 0,414 g/g.h	
Pe = 4,390 g/l.h	
Yp/so = 0,391	
Yp/s = 0,460	

Os valores de tempo, volume, concentrações de massa e número de células de levedura e bactérias, açúcares totais (ART) e etanol acumulado estão na tabela 10.

TABELA 10 - Valores de concentração de massa e número de células (levedura e bactérias), ART e etanol acumulado para o 3º ciclo.

tempo (h)	volume (l)	levedura		bactéria		ART	etanol
		[]g/l	Nc/ml*10 ⁸	[]g/l	Nc/ml*10 ⁸	residual []g/l	acumulado []g/l
0,00	1,00	24,2	4,34	0,040	0,72	3,93	60,4
0,50	1,17	21,2	3,77	0,034	0,63	21,89	
1,0	1,35	17,7	3,11	0,030	0,52	35,66	52,6
2,0	1,66					38,24	51,6
2,5	1,81	11,7	1,97	0,020	0,33		
3,0	2,04					52,63	44,9
4,0	2,33					57,69	47,2
5,0	2,67	10,5	1,75	0,015	0,29	61,48	44,0
6,0	2,85					52,26	50,3
7,0	2,85	10,1	1,67	0,015	0,28	39,35	52,1
8,0	2,85					33,20	57,7
9,0	2,85	10,2	1,69	0,015	0,28	20,90	61,3
10	2,85	10,6	1,76	0,015	0,29	15,25	65,1
24	2,85	11,1	1,86	0,016	0,31	3,93	73,0

Os valores de tempo, biomassa, massa de ART (adicionado, consumido e residual) e, etanol acumulado (produzido+resíduo do inóculo); estão na tabela 11 e na figura 13.

TABELA 11 - Valores de biomassa, massa de ART (res., adic. e consumido), e etanol acumulado para o 3º ciclo.

tempo (h)	biomassa		massa de ART (g)			etanol(g) acumulado
	l(g)	b(g)	residual	adiconado	consumido	
0	24,2	0,039	3,93	0,00	0,00	60,4
0,5	24,9	0,040	25,7	29,5	3,87	
1,0			48,0	59,1	11,1	70,8
2,0			63,4	112	48,9	85,6
2,5						
3,0			107	177	70,0	91,5
4,0			134	226	92,2	110
5,0	28,1	0,040	164	285	121	118
6,0			149	315	166	143
7,0	28,7	0,043	112	315	203	148
8,0			94,5	315	221	164
9,0	29,0	0,043	59,5	315	256	174
10	30,2	0,043	43,4	315	272	185
24	31,6	0,045	11,2	315	303	208

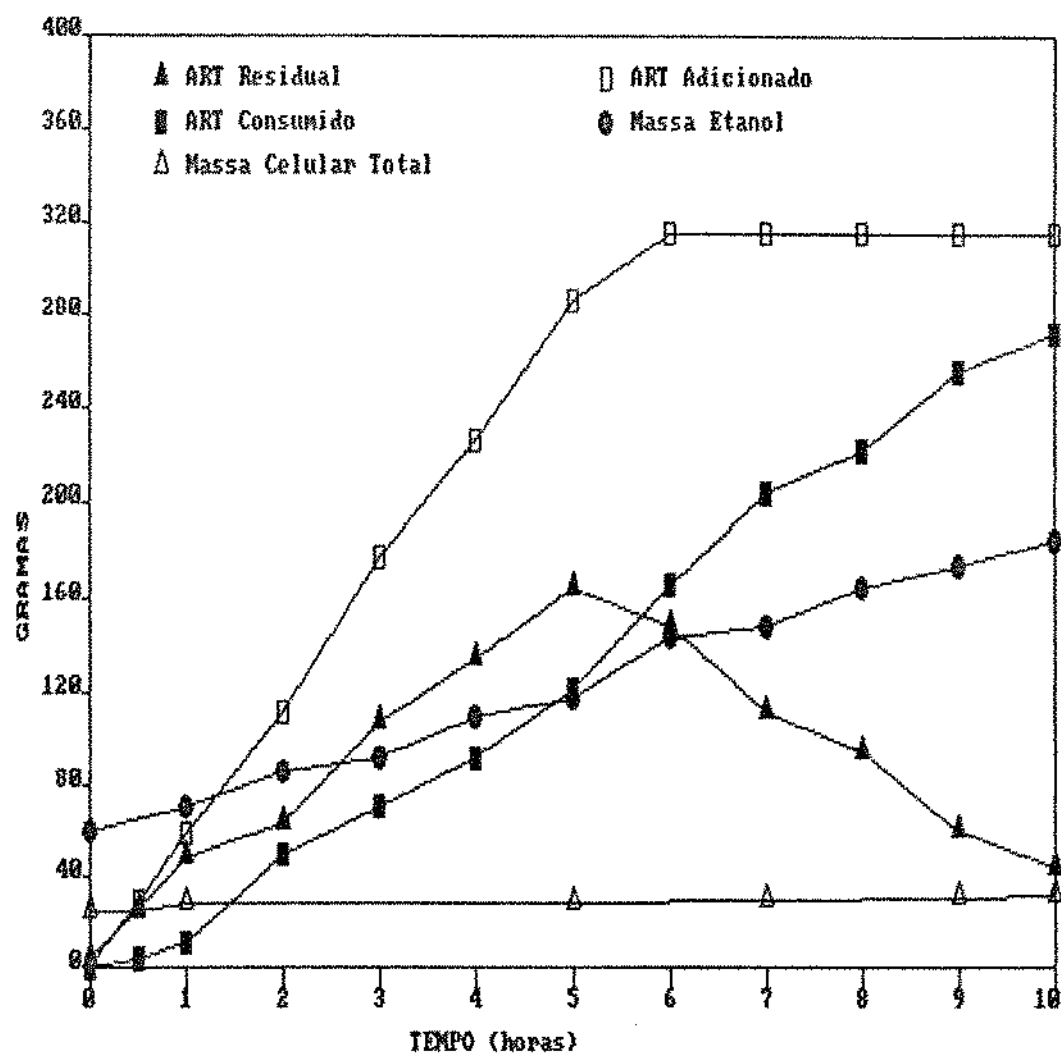


FIGURA 13 - Massa de : ART, etanol acumulado (produzido+resíduo do inóculo) e células (leveduras+bactérias); em 10 horas de fermentação no 3º ciclo.

1.4 - 4º Ciclo - dia 28/11/ 89

Condições iniciais:

Ml=24,1g/l	nl= $4,30 \times 10^8$ cel./ml
Mb=0,033g/l	nb= $0,615 \times 10^8$ cel./ml
S(mosto)= 178,3g/l	P(etanol residual)=68,4 g/l

Resultados obtidos:

R= 70,7%	ART consumido=82,4%
Ps= 0,997g/g.h	r(1/b)= 7,0
Pem= 0,431g/g.h	Broto vivos (5h)= 4,7 %
Pxl=0,229 g/g.h	Broto vivos (9h)= 3,7 %
Pxb=0,060mg/g.h	Broto mortos(5h)= 2,5 %
Pxl=0,159g/g.h	Broto mortos(9h)= 4,0 %
Acidez tot.(vinho)=2,9g/l	Viabilidade (5h)=80,5 %
Acidez produzida= 1,41g/l	Viabilidade (9h)=63,8 %
pH (vinho)= 4,32	rel.Brot. v/m(9h)= 0,93
Yp/so = 0,356	
Yp/s = 0,432	

Os valores de tempo, volume, concentrações de massa e número de células de levedura e bactérias, açúcares totais (ART) e etanol acumulado estão na tabela 12.

TABELA 12 Valores de concentração de massa e número de células (levedura e bactérias), ART residuais e etanol acumulado para o 4º ciclo.

tempo (h)	volume (l)	levedura		bactéria		ART residual	etanol acumulado
		[Jg/l]	Nc/ml*10 ⁸	[Jg/l]	Nc/ml*10 ⁸	[Jg/l]	[Jg/l]
0	1,00	24,1	4,3	0,033	0,6	5,29	68,4
0,7	1,18					29,9	
1,0	1,36					37,7	57,2
2,0	1,73	13,6	2,3	0,018	0,3	58,4	50,0
3,2	2,16	11,8	2,0	0,015	0,3	65,8	47,5
4,0	2,46					69,0	42,3
5,2	2,90	9,8	1,6	0,012	0,2	70,7	42,9
6,4	2,90					67,9	49,3
7,4	2,90					44,9	57,0
8,4	2,90					32,0	60,1
9,0	2,90	9,8	1,6	0,012	0,2	26,8	62,3
10	2,90	9,8	1,6	0,012	0,2	19,1	65,8
24	2,90	9,9	1,6	0,012	0,2	4,3	71,5

Os valores de tempo, biomassa, massa de ART (adicionado, consumido e residual) e, etanol acumulado (produzido+resíduo do inóculo); estão na tabela 13 e na figura 14.

TABELA 13 - Valores de biomassa, massa de ART (res., adic. e consumido) e etanol acumulado para o 4º ciclo.

tempo (h)	biomassa		massa de ART (g)			etanol(g)
	l(g)	b(g)	residual	adiconado	consumido	acumulado
0	24,1	0,034	5,29	0,00	0,00	68,4
0,7			35,3	32,4	2,87	
1,0			51,5	64,9	13,4	78,0
2,0			101	130	28,9	86,4
3,2	25,5	0,032	142	208	65,3	103
4,0			169	260	90,2	
5,2	28,47	0,035	205	340	134	125
6,4			197	340	142	143
7,4			131	340	209	166
8,4			93,9	340	247	175
9,0	28,47	0,035	78,9	334	262	181
10,0	28,47	0,035	55,4	334	284	191
24,0	28,76	0,035	12,5	334	327	208

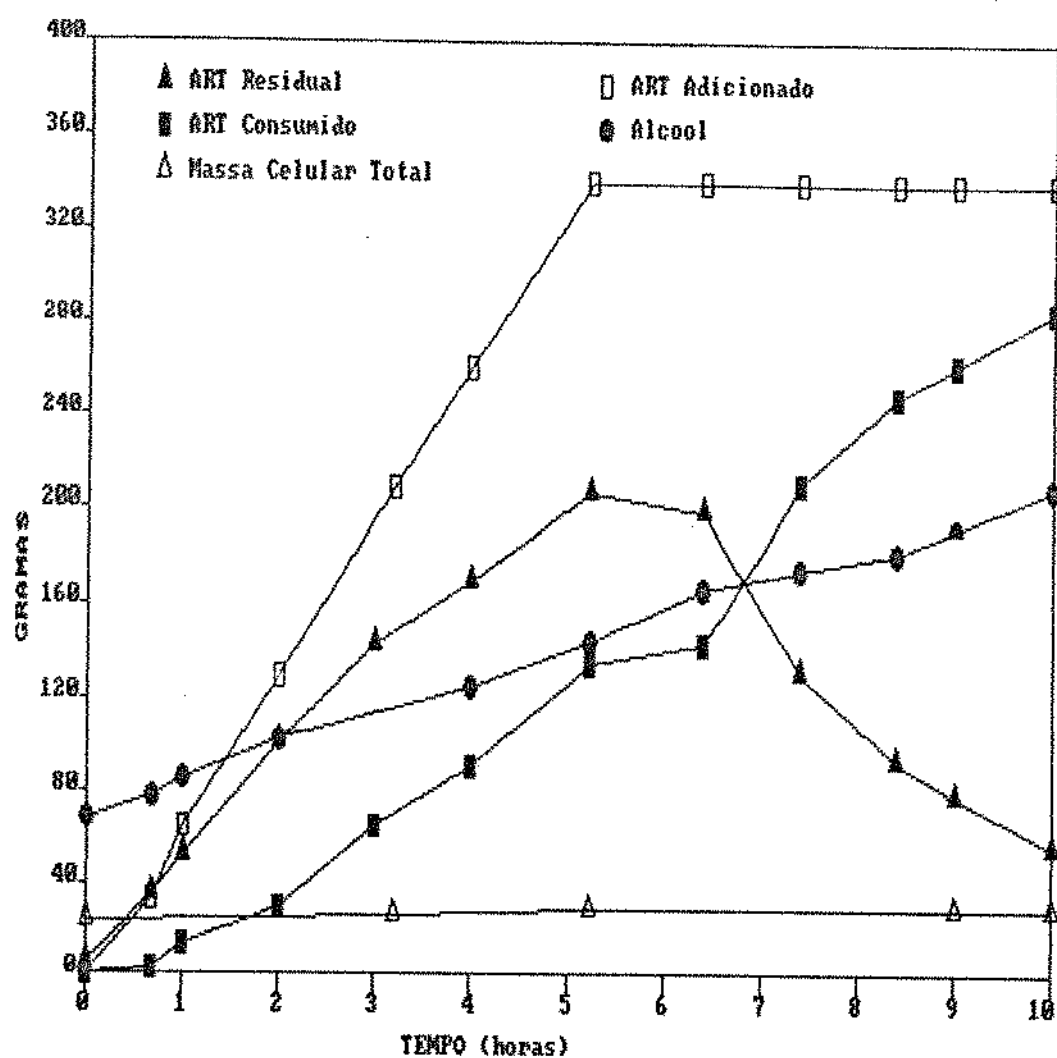


FIGURA 14 - Massa de : ART, etanol acumulado (produzido+resíduo do inóculo) e células (leveduras+bactérias); em 10 horas de fermentação no 4º ciclo.

Condições iniciais:

Ml=24,6 g/l	nl= $4,4 \times 10^8$ cel./ml
Mb=0,030g/l	nb= $0,5 \times 10^8$ cel./ml
S(mosto)= 169 g/l	P(etanol residual)=69,6 g/l

Resultados obtidos:

R= 70,7%	ART consumido=71,6 %
Ps= 0,968g/gh	r(1/b) = 8,0
Pem= 0,379g/gh	Brotos vivos (5h)= 22,8 %
Pe = 4,01 g/l.h	Brotos vivos (9h)= 19,2 %
Pxb=0,110mg/g.h	Brotos mortos(5h)= 4,9 %
Pxl=0,322 g/g.h	Brotos mortos(9h)= 5,8 %
Acidez tot.(vinho)=2,78g/l	Viabilidade (5h)=70,9 %
Acidez produzida= 1.27 g/l	Viabilidade (9h)=64,2 %
pH (vinho)= 4,47	rel.Brot. v/m(9h)= 3,3
Yp/so = 0,356	
Yp/s = 0,497	

Os valores de tempo, volume, concentrações de massa e número de células de levedura e bactérias, açúcares totais (ART) e etanol acumulado estão na tabela 14.

TABELA 14 Valores de concentração de massa e número de células (levedura e bactérias), ART residuais e etanol acumulado para o 5º ciclo.

tempo (h)	volume (l)	levedura		bactéria		ART residual	etanol acumulado
		[g/l]	Nc/ml*10	[g/l]	Nc/ml*10	[g/l]	[g/l]
0	1,00	24,6	4,4	0,03	0,5	4,92	69,6
0,5	1,18					24,0	
1,0	1,37					30,7	58,7
2,0	1,74					61,5	49,9
2,5	1,92						
3,0	2,14					62,1	48,4
4,0	2,50					64,6	46,8
5,0	2,90	10,5	1,7	0,01	0,2	69,5	46,1
6,0	2,90					55,9	48,7
7,0	2,90	10,6	1,8	0,01	0,2	41,8	50,6
8,0	2,90					34,4	57,0
9,0	2,90	10,6	1,8	0,01	0,2		
10,0	2,90	10,6	1,8	0,01	0,2	30,4	64,1
24,0	2,90	10,6	1,8	0,01	0,2	5,29	71,9

Os valores de tempo, biomassa, massa de ART (adicionado, consumido e residual) e, etanol acumulado (produzido+resíduo do inóculo); estão na tabela 15 e na figura 15.

TABELA 15 - Valores de biomassa, massa de ART (res., adic. e consumido), e etanol acumulado para o 5º ciclo.

tempo (h)	biomassa		massa de ART (g)			etanol(g)
	l(g)	b(g)	residual	adiconado	consumido	acumulado
0	24,6	0,030	4,92	0,00	0,00	69,6
0,5			28,4	31,2	2,82	
1,0			42,1	62,4	20,4	80,3
2,0			107	125	18,1	86,8
3,0			133	192	59,8	103
4,0			162	255	93,2	117
5,0	30,5	0,032	202	323	121	134
6,0			162	323	160	141
7,0	30,8	0,032	121	323	201	147
8,0			100	323	223	166
9,0	30,8	0,032				
10,0	30,8	0,032	88,2	323	234	186
24,0	30,8	0,032	15,4	323	307	209

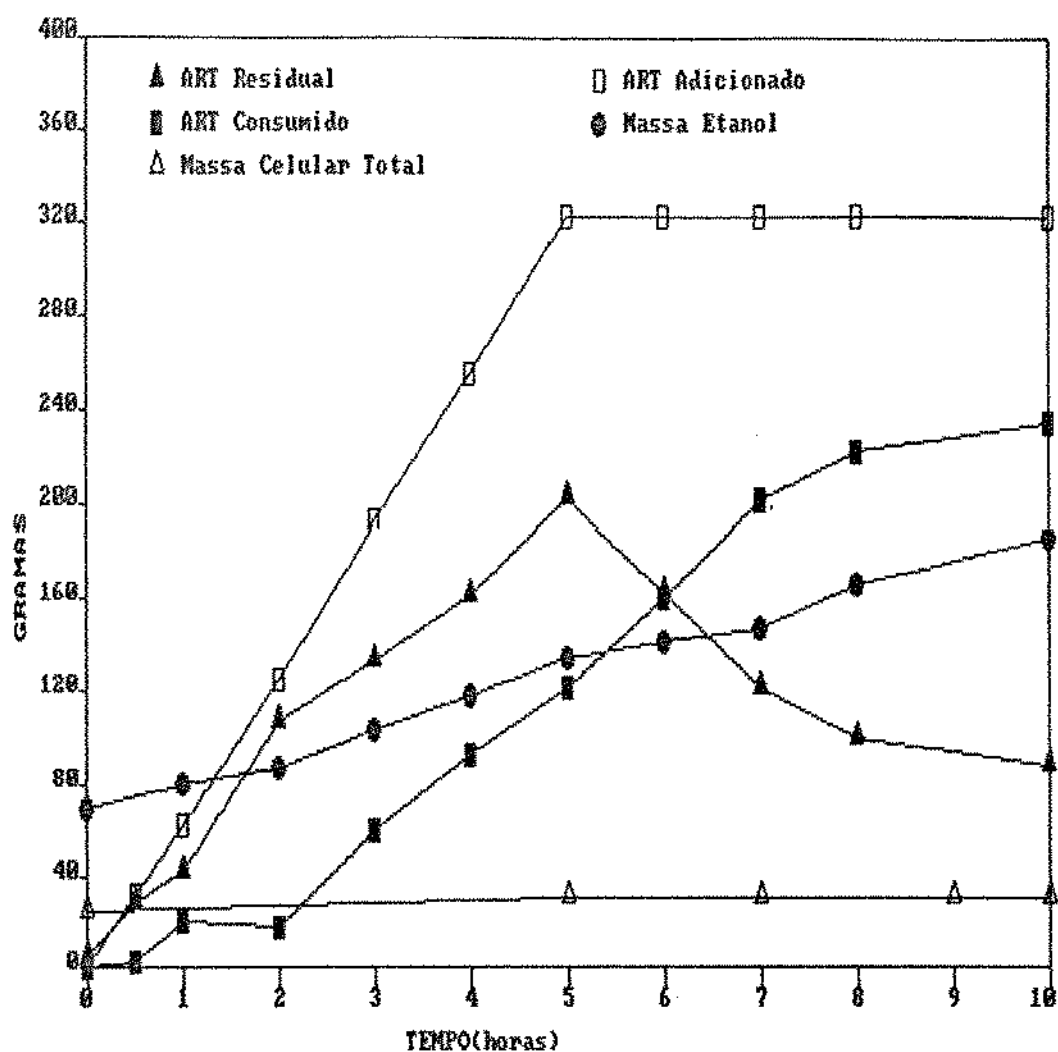


FIGURA 15 - Massa de : ART, etanol acumulado (produzido+resíduo do inóculo) e células (leveduras+bactérias); em 10 horas de fermentação no 5º ciclo.

Condições iniciais:

Ml=20,7 g/l	nl= $3,7 \times 10^8$ cel./ml
Mb=0,021g/l	nb= $0,38 \times 10^8$ cel/ml
S(mosto)= 160 g/l	P(etanol residual)=67,0 g/l

Resultados obtidos:

R= 61,2%	ART consumido=76,6%
Ps= 0,917g/g.h	r(l/b)= 9,6
Pem= 0,375g/g.h	Brotos vivos (5h)= 29,9%
Pe = 3,230g/l.h	Brotos vivos (9h)= 38,6%
Pxb=0,000mg/g.h	Brotos mortos(5h)= 16,4%
Pxl=0.124 g/g.h	Brotos mortos(9h)= 16,1%
Acidez tot.(vinho)=2,76g/l	Viabilidade (5h)= 51,5%
Acidez produzida= 1,33g/l	Viabilidade (9h)= 51,0%
pH (vinho) = 4,43	rel.Brot. v/m(9h)= 2,3
Yp/s = 0,408	
Yp/so = 0,313	

Os valores de tempo, volume, concentrações de massa e número de células de levedura e bactérias, açúcares totais (ART) e etanol acumulado estão na tabela 16.

TABELA 16 - Valores de concentração de massa e número de células (levedura e bactérias), ART residuais e etanol acumulado para o 6º ciclo.

tempo (h)	volume (l)	levedura		bactéria		ART residual	etanol acumulado
		[g/l]	Nc/ml*10 ⁸	[g/l]	Nc/ml*10 ⁸	[g/l]	[g/l]
0	1,00	20,7	3,7	0,021	0,38	0,00	66,8
0,5	1,19					21,5	
1,0	1,38					30,1	54,2
2,0	1,75					47,7	45,8
2,5	1,94	11,3	1,9	0,010	0,20		
3,0	2,13					55,3	42,7
4,0	2,51	9,0	1,5	0,008	0,15	60,6	40,9
4,8	2,81					68,2	39,6
6,5	2,81					49,7	45,5
7,5	2,81	8,30	1,3	0,007	0,14	41,8	49,7
9,0	2,81	8,40	1,4	0,007	0,14	29,5	51,9
10,0	2,81	8,60	1,4	0,007	0,14	24,1	56,0
24,0	2,81	10,1	1,7	0,009	0,17	0,00	65,2

Os valores de tempo, biomassa, massa de ART (adicionado, consumido e residual) e, etanol acumulado (produzido+resíduo do inóculo); estão na tabela 17 e na figura 16.

TABELA 17 - Valores de biomassa, massa de ART (res.,adic. e,consumido), e etanol acumulado para o 6º ciclo.

tempo (h)	biomassa		massa de ART (g)			etanol(g)
	l(g)	b(g)	residual	adiconado	consumido	acumulado
0	20,7	0,021	0,00	0,00	0,00	66,8
0,5			25,6	30,1	4,55	
1,0			41,5	60,2	18,7	74,6
2,0			83,7	120	36,8	80,3
2,5	21,9	0,019				
3,0			118	181	62,8	91,0
4,0	22,6	0,020	152	241	88,9	103
4,8			192	290	98,0	111
6,5			140	290	150	128
7,5	23,4	0,020	118	290	172	140
9,0	23,6	0,020	83,0	290	207	146
10,0	24,2	0,020	67,8	290	222	158
24,0	28,4	0,025	0,00	290	290	183

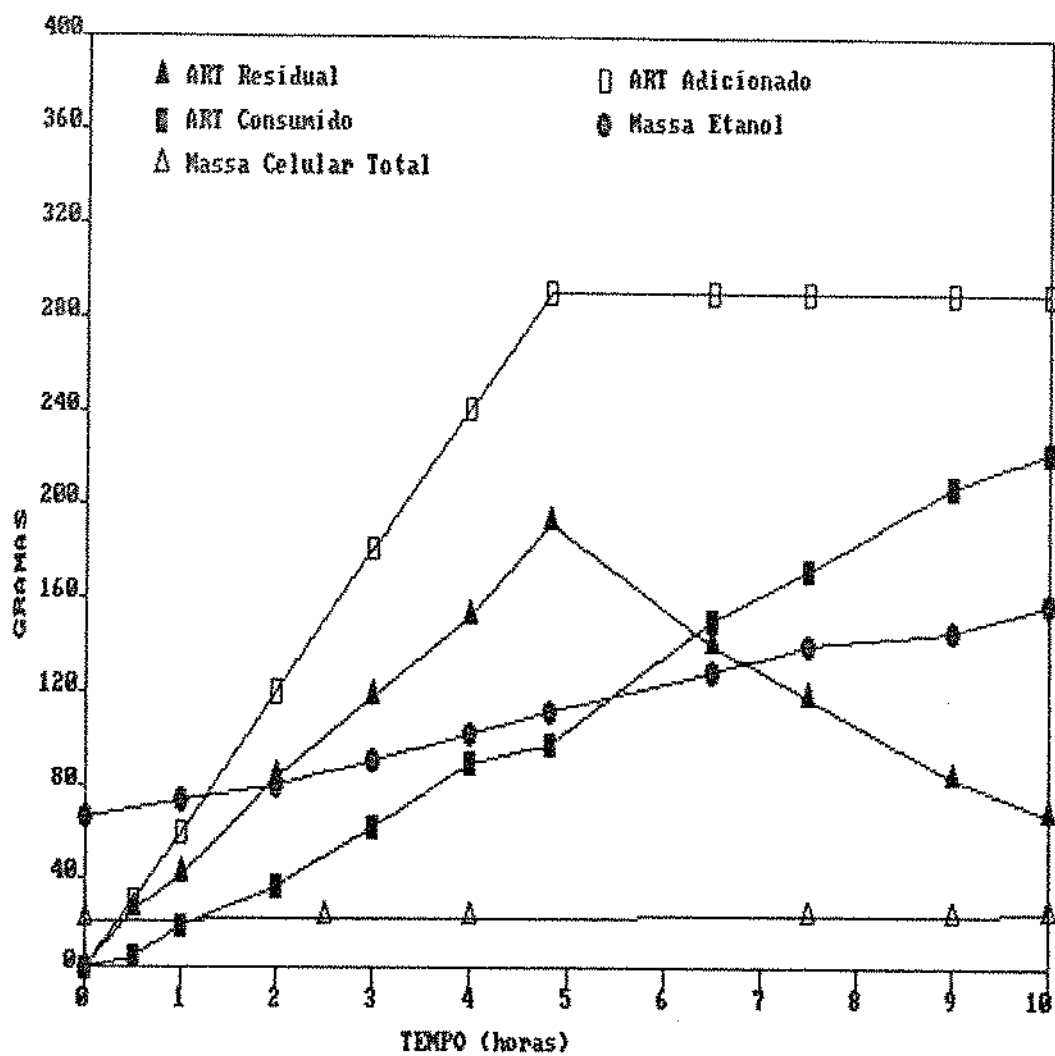


FIGURA 16 - Massa de : ART, etanol acumulado (produzido+resíduo do inóculo) e células (leveduras+bactérias); em 10 horas de fermentação no 6º ciclo.

1.7 ANÁLISE DO 1º AO 6º CICLO

Passados 6 dias de fermentação mista (6 ciclos consecutivos), pôde-se observar um decréscimo do número de bactérias, que era de $2,3 \times 10^8$ cel./ml no 1º ciclo, para $0,38 \times 10^8$ células/ml no 6º ciclo. As leveduras apresentaram-se variando de $4,4 \times 10^8$ cel./ml no 1º ciclo para $3,7 \times 10^8$ cel./ml no 6º ciclo. Por esses números percebe-se que as leveduras variaram muito pouco (decréscimo de 17%) e as bactérias sofreram uma acentuada redução (aproximadamente 6 vezes menor que no 1º ciclo). Isso explica o elevado aumento da relação entre leveduras e bactérias (2,0 no 1º ciclo e 9,6 no 6º ciclo), que deveu-se fundamentalmente a redução do número de bactérias já que as leveduras não variaram nesse período. A acidez total no vinho neste período diminuiu ao passar dos ciclos, de 4,31g/l no 1º ciclo, para 2,76 g/l, expressas em ácido láctico, no 6º ciclo

O quociente entre, acidez acumulado (expressa em g/l de ácido láctico) e a relação levedura/bactéria, apresenta um índice bastante ilustrativo no que se refere a infecção por bactérias lácticas, o que será demonstrado ao longo deste trabalho. Nesta etapa este índice se apresentou em declínio variando de 2,21 no 1º ciclo para 0,288 no 6º ciclo

Analisando a porcentagem de brotos vivos e mortos até o 4º ciclo, notou-se um declínio da % de brotos vivos e um aumento da % de brotos mortos. A partir do 5º ciclo ambas apresentaram elevação com um aumento significantemente maior de brotos vivos fazendo com que o índice entre a divisão de brotos vivos por mortos, que se mostrava decrescente até o 4º ciclo, passasse a per-

manecer quase constante do 4º até o 9º ciclo, na faixa entre 2 ou 3 brotos vivos para cada broto morto.

A viabilidade caiu sensivelmente ao final de 9 horas de fermentação entre o 1º e o 6º ciclo, respectivamente, 96,8 e 51,0%. Os parâmetros de avaliação do processo neste período foram analisados sem a participação do 1º ciclo já que este não refletiu as mesmas condições dos demais. A porcentagem de ART no mosto de alimentação foi superior, e as condições fisiológicas das leveduras foram diferentes dos demais não estando adaptadas ao etanol. A partir do 2º ciclo houve uma exposição contínua do inóculo ao etanol a concentrações de 60-70 g/l até o 18º ciclo, assemelhando-se às condições das usinas.

Analisando-se os parâmetros de rendimento alcoólico baseado no teórico (R), fatores de conversão (Y_p/s e Y_p/s_0), produtividades (P_e , P_{em} e P_s), para o 2º até o 5º ciclo; observou-se que esta foi a faixa ótima do experimento, onde foram obtidos os melhores resultados em termos de processo, com destaque para o 3º ciclo onde obteve-se o maior rendimento e o 5º com o maior valor de Y_p/s . O 4º ciclo se destacou-se pelos melhores resultados de produtividade (P_s e P_e) e o 3º ciclo devido a P_{ex} , Y_p/s_0 e a porcentagem de ART consumido.

Nesta fase, onde a acidez total e o número de bactérias contaminantes decresceram, pôde-se assumir que a levedura se mostrou bastante superior em termos competitivos, não apresentando reduções drásticas no sistema como as bactérias. Quanto aos resultados em termos de processo e das condições fisiológicas das leveduras, os melhores resultados do experimento foram obtidos nesta fase.

2. RESULTADOS DO 7º AO 9º CICLO

2.1 - 7º Ciclo - Dia 01/12/89

Condições iniciais:

Ml=22,4 g/l	nl= $4,0 \times 10^8$ cel./ml
Mb=0,02 g/l	nb= $0,4 \times 10^8$ cel./ml
S(mosto)= 182,9 g/l	P(etanol residual)=56,8 g/l

Resultados obtidos:

R=59,2%	ART consumido=74,5%
Ps= 0,822 g/g.h	r(l/b) = 11,1
Pem=0,334 g/g.h	Broto vivos (5h)= 34,4%
Pe =3,640 g/l.h	Broto vivos (9h)= 37,8%
Pxb=0,330mg/g.h	Broto mortos(5h)= 16,8%
Pxl=0,325 g/g.h	Broto mortos(9h)= 13,5%
Acidez tot.(vinho)=2,65g/l	Viabilidade (5h)= 47,6%
Acidez produzida= 1.18g/l	Viabilidade (9h)= 55,0 %
pH (vinho)= 4,44	rel.Brot. v/m(9h)= 2,8
Yp/so = 0,303	
Yp/s = 0,406	

Os valores de tempo, volume, concentrações de massa e número de células de levedura e bactérias, açúcares totais (ART) e etanol acumulado estão na tabela 18.

TABELA 18 - Valores de concentração de massa e número de células (levedura e bactérias), ART residuais e etanol para o 7º ciclo.

tempo volume		levedura		bactéria		ART	etanol
						residual	acumulado
(h)	(l)	[]g/l	Nc/ml*10	[]g/l	Nc/ml*10	[]g/l	[]g/l
0	1,00	22,4	4,0	0,020	0,36	0,00	56,8
0,5	1,16					25,2	
1,0	1,32					40,6	46,7
2,0	1,64					40,9	44,8
3,0	1,94					46,7	45,1
4,0	2,24	11,3	1,9	0,009	0,17	62,7	42,3
4,5	2,40	10,9	1,8	0,009	0,16		
5,0	2,56	10,4	1,7	0,008	0,16	68,2	40,1
6,0	2,92					73,2	41,2
7,0	2,92	9,5	1,6	0,007	0,14	63,9	42,2
8,0	2,92					48,8	47,3
9,0	2,92	10,4	1,7	0,008	0,16	39,0	51,3
10,0	2,92	10,9	1,8	0,009	0,16	30,7	55,8
24,0	2,92	11,1	1,9	0,009	0,17	0,00	69,4

Os valores de tempo, biomassa, massa de ART (adicionado, consumido e residual) e, etanol acumulado (produzido+resíduo do inóculo); estão na tabela 19 e na figura 17.

TABELA 19 - Valores de biomassa, massa de ART (res., adic. e consumido) e etanol acumulado para o 7º ciclo.

tempo (h)	biomassa		massa de ART (g)			etanol(g)
	l(g)	b(g)	residual	adiconado	consumido	acumulado
0	22,4	0,020	0,00	0,00	0,00	56,8
0,5			29,3	29,4	0,15	
1,0			53,6	58,8	5,21	61,7
2,0			67,3	118	50,4	73,7
3,0			90,6	172	81,0	87,5
4,0	25,4	0,022	141	227	86,8	95,0
4,5	26,2	0,022				
5,0	26,6	0,020	175	286	111	103
6,0			214	352	138	120
7,0	27,8	0,020	187	352	165	123
8,0			143	352	209	138
9,0	30,4	0,023	114	352	238	150
10,0	31,9	0,026	89,9	352	262	163
24,0	32,5	0,026	0,00	352	352	203

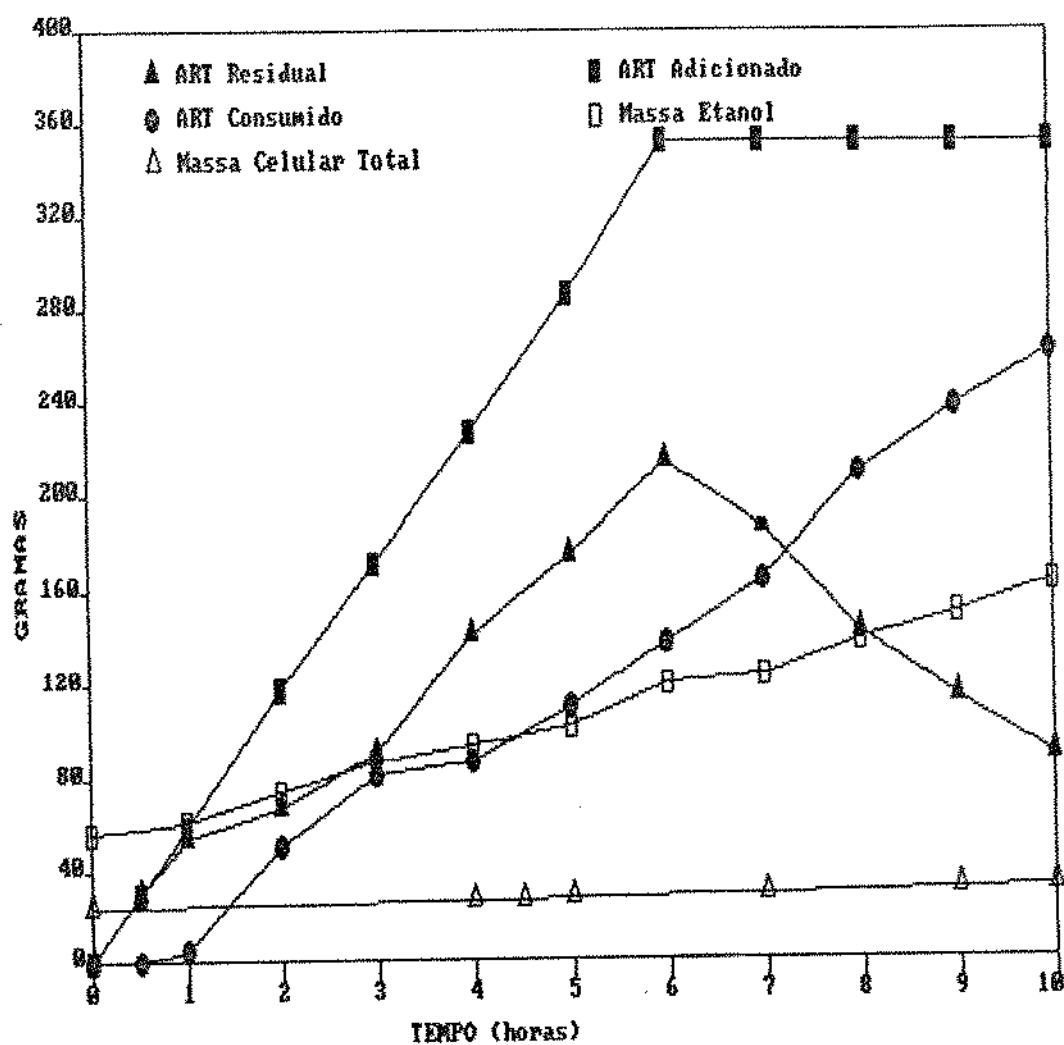


FIGURA 17 - Massa de : ART, etanol acumulado (produzido+resíduo do inóculo) e células (leveduras+bactérias); em 10 horas de fermentação no 7º ciclo.

2.2 - 82 Ciclo - Dia 02/12/ 89

Condições iniciais:

Ml=22,5 g/l	n1= $4,0 \times 10^8$ cel./ml
Mb=0,062g/l	nb= $1,1 \times 10^8$ cel./ml
S(mosto)= 171 g/l	P(etanol residual)=62,7 g/l

Resultados obtidos:

R= 55,1%	ART consumido=77,3%
Ps = 0,865g/g.h	r(1/b) = 3,5
Pem= 0,350g/g.h	Broto vivos (5h)= 36,4%
Pe = 3,36 g/l.h	Broto vivos (9h)= 31,9%
Pxb=0,360mg/g.h	Broto mortos(5h)= 19,8%
Pxl=0,184 g/g.h	Broto mortos(9h)= 15,2%
Acidez tot.(vinho)=3,2 g/l	Viabilidade (5h)= 47,6 %
Acidez produzida= 1.71 g/l	Viabilidade (9h)= 55,0 %
pH (vinho) = 4,27	Rel.Brot.v/m (9h)= 2,1
Yp/so = 0,282	
Yp/s = 0,364	

Os valores de tempo, volume, concentrações de massa e número de células de levedura e bactérias, açúcares totais (ART) e etanol acumulado estão na tabela 20.

TABELA 20 - Valores de concentração de massa e número de células (levedura e bactérias), ART residuais e etanol acumulado para o 8º ciclo.

tempo (h)	volume (l)	levedura		bactéria		ART residual	etanol acumulado
		[g/l]	Nc/ml*10 ⁸	[g/l]	Nc/ml*10 ⁸	[g/l]	[g/l]
0	1,00	22,5	4,0	0,062	1,1	0,00	62,7
0,5	1,18					19,7	
1,0	1,36					38,1	50,5
2,0	1,72					55,1	43,8
3,0	2,08					60,9	41,7
4,0	2,44					68,2	40,6
5,0	2,80	8,90	1,4	0,022	0,41	71,9	38,1
6,5	2,87					59,6	43,5
7,0	2,87	9,10	1,5	0,022	0,42	56,6	46,7
8,0	2,87	9,50	1,6	0,024	0,45	44,9	48,9
9,0	2,87	9,70	1,6	0,024	0,45	35,4	54,6
10,0	2,87	9,70	1,6	0,024	0,45	27,0	55,4
24,0	2,87	9,70	1,6	0,024	0,45	0,00	66,7

Os valores de tempo, biomassa, massa de ART (adicionado, consumido e residual) e, etanol acumulado (produzido+resíduo do inóculo); estão na tabela 21 e na figura 18.

TABELA 21 - Valores de biomassa, massa de ART (res., adic. e, consumido) e, etanol acumulado para o 8º ciclo.

tempo (h)	biomassa		massa de ART (g)			etanol(g)
	l(g)	b(g)	residual	adicionado	consumido	acumulado
0	22,5	0,062	0,00	0,00	0,00	62,7
0,5			23,2	32,9	9,67	
1,0			51,8	65,7	13,9	68,7
2,0			94,7	131	36,8	75,3
3,0			126	197	70,7	86,6
4,0			166	263	96,6	98,9
5,0	24,9	0,061	201	329	127	107
6,0			171	343	171	125
7,0	26,2	0,063	163	343	180	134
8,0	27,3	0,069	129	343	214	140
9,0	27,9	0,069	102	343	241	157
10,0	27,9	0,069	77,8	343	265	159
24,0	27,9	0,069	0,00	343	343	192

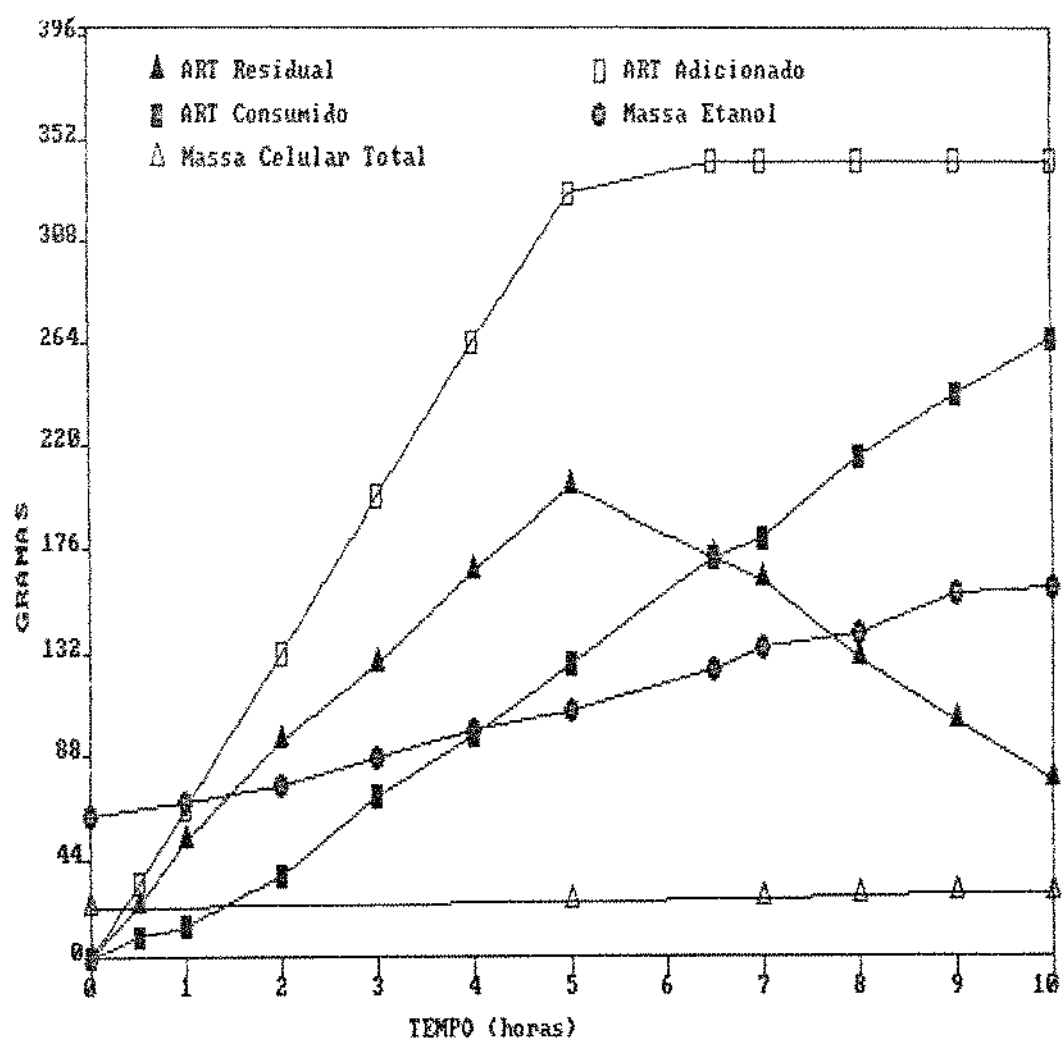


FIGURA 18 - Massa de : ART, etanol acumulado (produzido+resíduo do inóculo) e células (levedura+bactérias), em 10 horas de fermentação no 8º ciclo.

2.3 9º Ciclo - 03/12/89

Condições iniciais:

Ml=24,5g/l	nl= $4,4 \times 10^8$ cel./ml
Mb=0,15 g/l	nb= $2,8 \times 10^8$ cel./ml
S(mosto)= 173 g/l	P(etanol acumulado)=61,2 g/l

Resultados obtidos:

R= 62,2%	ART consumido=73,9%
Ps= 0,808g/g.h	r(1/b)= 1,6
Pem= 0,350g/g.h	Brotos vivos (5h)= 26,0%
Pe =3,61g/g.h	Brotos vivos (9h)= 39,5%
Pxb=0,940mg/g.h	Brotos mortos(5h)= 19,7%
Pxl=0,184 g/g.h	Brotos mortos(9h)= 17,3%
Acidez tot.(vinho)=3,71g/l	Viabilidade (5h)=57,0 %
Acidez produzida= 2,10g/l	Viabilidade (9h)=59,0 %
pH (vinho) = 4,27	Rel.Brot. v/m(9h)= 2,3
Yp/so= 0,319	
Yp/s = 0,431	

Os valores de tempo, volume, concentrações de massa e número de células de levedura e bactérias, açúcares totais(ART) e etanol acumulado estão na tabela 22.

TABELA 22 - Valores de concentração de massa e número de células (levedura e bactérias), ART residuais e etanol acumulado para o 9º ciclo.

tempo (h)	volume (l)	levedura		bactéria		ART residual	etanol acumulado
		[g/l]	Nc/ml*10 ⁸	[g/l]	Nc/ml*10 ⁸	[g/l]	[g/l]
0	1,00	24,5	4,4	0,153	2,8	0,00	61,2
0,5	1,15					20,0	
1,0	1,29					36,9	50,1
2,0	1,59					50,4	45,7
3,0	1,88					56,6	43,2
4,0	2,18					63,3	44,4
5,0	2,49					63,9	42,3
6,0	2,77					65,8	45,0
7,2	2,89	9,40	1,5	0,053	1,0	56,3	48,2
8,0	2,89					47,3	50,6
9,0	2,89	10,1	1,7	0,058	1,1	37,7	56,8
10,0	2,89	10,3	1,7	0,059	1,1	29,5	57,2
24,0	2,89	10,3	1,7	0,059	1,1	0,00	71,4

Os valores de tempo, biomassa, massa de ART (adicionado, consumido e residual) e, etanol acumulado (produzido+resíduo do inóculo); estão na tabela 23 e na figura 19.

TABELA 23 - Valores de biomassa, massa de ART (res., adic. e, consumido) e etanol acumulado para o 9º ciclo.

tempo (h)	biomassa		massa de ART (g)			etanol (g)
	l(g)	b(g)	residual	adicionado	consumido	acumulado
0	24,5	0,153	0,00	0,00	0,00	61,2
0,5			23,0	25,5	2,49	
1,0			47,7	51,0	3,22	64,8
2,0			80,1	102	21,8	72,6
3,0			106	153	46,4	81,4
4,0			138	204	65,9	96,7
5,0			159	257	98,3	105
6,0			182	306	124	124
7,2	27,2	0,153	163	327	164	139
8,0			137	327	190	146
9,0	29,2	0,168	109	327	218	164
10,0	29,8	0,170	85,3	327	242	165
24,0	29,8	0,170	0,00	327	327	206

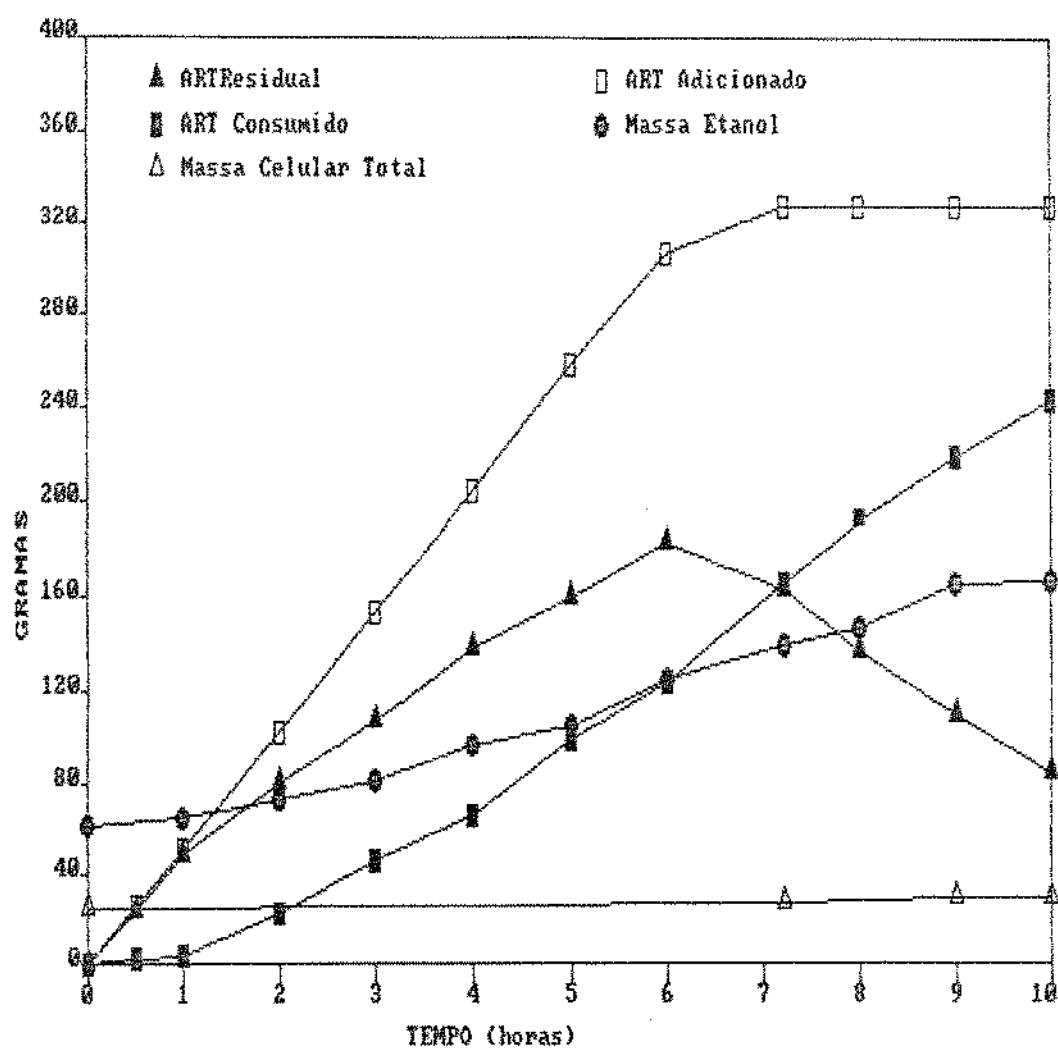


FIGURA 19 - Massa de : ART, etanol acumulado (produzido+resíduo do inóculo) e células (levedura+bactérias), em 10 horas de fermentação no 9º ciclo.

2.4 ANÁLISE DOS CICLOS 7º AO 9º

A fase que compreende os ciclos 7, 8 e 9 foi considerada como uma fase intermediária e foi marcada por uma recuperação das células dos lactobacilos, havendo um aumento significativo do número de células bacterianas de $0,36 \times 10^8$ para $2,8 \times 10^8$ células por ml de inóculo, um aumento de 7,8 vezes. A levedura também sofreu um aumento, de $4,0 \times 10^8$ no 7º ciclo, para $4,4 \times 10^8$ cel./ml de inóculo no 9º ciclo, porém bastante inexpressivo se comparado com o das bactérias. Isso resultou na diminuição marcante da relação levedura/bactéria, de 11,1 no 7º ciclo, para 1,56 no 9º ciclo (diminuição 7,1 vezes).

A variação da acidez total se mostrou fiel a variação do número de células bacterianas aumentando significativamente, de 2,65 g/l, expressas em ácido láctico, para 3,71 g/l no 9º ciclo (um aumento de 40%).

É importante ressaltar que até esta fase a relação entre brotos vivos e mortos, o índice indicativo do equilíbrio das condições fisiológicas da células juntamente com a viabilidade, se mostrou favorável ao crescimento, ou seja, ainda havia um maior número de brotos vivos em relação aos mortos (média de 2,4 brotos vivos para cada broto morto ao final de 9 horas de fermentação).

Ainda nesta fase pôde-se destacar um fato interessante. Os parâmetros de avaliação do processo, não sofreram grandes perdas em relação ao período anterior e apresentaram valores com pouca variação entre os ciclos, exceto para o Y_p/s do 8º ciclo. Para os demais o rendimento (R) ficou na faixa de 60%, a produtivi-

vidade de etanol- P_{em} - na faixa de 0,34 g/g.h e P_e em torno de 3,5 g/l.h, os fatores de conversão $Y_{p/s}$ e Y_{pso} respectivamente 0,42 e 0,30 e o valor médio de consumo de ART de 75%, ao final de 10 horas de fermentação.

3. RESULTADOS DO 10º AO 18º CICLO

3.1 10º Ciclo - Dia 04/12/89

Condições iniciais:

$M_1 = 23,3 \text{ g/l}$	$n_1 = 4,2 \times 10^8 \text{ cel./ml}$
$M_b = 0,220 \text{ g/l}$	$n_b = 4,0 \times 10^8 \text{ cel./ml}$
$S(\text{mosto}) = 175 \text{ g/l}$	$P(\text{etanol residual}) = 65,7 \text{ g/l}$

Resultados obtidos:

$r(1/b) = 1,0$
Brotos vivos (7h) = 23,8%
Brotos mortos (7h) = 18,5%
Rel. Brot.v/m (7h) = 1,3
Acidez tot. (vinho) = 4,23 g/l
Acidez produzida = 2,48 g/l
pH (vinho) = 4,09
Viabilidade (7h) = 53,1 %

3.2 11º Ciclo - Dia 04/12/89

Condições iniciais:

Ml=28,3 g/l

nl= $5,1 \times 10^8$ cel./ml

Mb=0,356g/l

nb= $5,1 \times 10^8$ cel./ml

S(mosto)= 173 g/l

P(etanol residual)=65,0 g/l

Resultados obtidos:

$r(1/b) = 1.0$

Brotos vivos (5h)= 29,0%

Brotos mortos(5h)= 19,2%

Rel. Brot.v/m(5h)= 1,50

Acidez tot.(vinho)=4,72g/l

Acidez produzida= 2,85g/l

Viabilidade (5h)= 55,8 %

3.3 12º Ciclo - Dia 06/12/ 89

Condições iniciais:

Ml=31,4 g/l	nl= $5,7 \times 10^8$ cel./ml
Mb=0,356g/l	nb= $6,5 \times 10^8$ cel./ml
S(mosto)= 175 g/l	P(etanol residual)=65,7 g/l

Resultados obtidos:

R= 58,5 %	ART consumido=75,4%
Ps= 0,594g/gh	r(1/b) = 0,87
Pem= 0,238g/g.h	Brotos vivos (5h)= 31,6%
Pe = 3,43 g/l.h	Brotos vivos (9h)= 35,9%
Pxb=4,87 mg/g.h	Brotos mortos(5h)= 19,5%
Pxl=0,355 g/g.h	Brotos mortos(9h)= 16,2%
Acidez tot.(vinho)=4,83g/l	Viabilidade (5h)= 55,1%
Acidez produzida= 2,84 g/l	Viabilidade (9h)= 59,0 %
pH (vinho)= 4,04	Rel. Brot.v/m(9h)= 2,22
Yp/so = 0,299	
Yp/s = 0,397	

Os valores de tempo, volume, concentrações de massa e número de células de levedura e bactérias, açúcares totais (ART) e etanol acumulado estão na tabela 24.

TABELA 24 - Valores de concentração de massa e número de células (levedura e bactérias), ART residuais e etanol acumulado para o 12º ciclo.

tempo	volume	levedura		bactéria		ART	etanol
						residual	acumulado
(h)	(l)	[]g/l	Nc/ml*10 ⁸	[]g/l	Nc/ml*10 ⁸	[]g/l	[]g/l
0	1,00	31,4	5,7	0,356	6,5	0,00	65,7
5,0	2,65	14,7	2,5	0,159	2,9		
9,0	2,90	13,9	2,4	0,150	2,8	31,72	54,6
10	2,90	14,4	2,5	0,155	2,9	28,28	57,0
24	2,90	14,4	2,5	0,155	2,9	0,00	67,6

Os valores de tempo, biomassa, massa de ART (adicionado, consumido e residual) e, etanol acumulado (produzido+resíduo do inóculo); estão na tabela 25 e na figura 20.

TABELA 25 - Valores de biomassa, massa de ART (res., adic. e, consumido) e etanol acumulado para o 12º ciclo.

tempo (h)	biomassa		massa de ART (g)			etanol(g) acumulado
	l(g)	b(g)	residual	adiconado	consumido	
0	31,4	0,356	0,00	0,00	0,00	65,7
5,0	39,0	0,422				
9,0	40,3	0,435	92,0	333	241	158,4
10,0	41,8	0,450	82,0	333	251	165,3
24,0	41,8	0,450	0,00	333	333	196,1

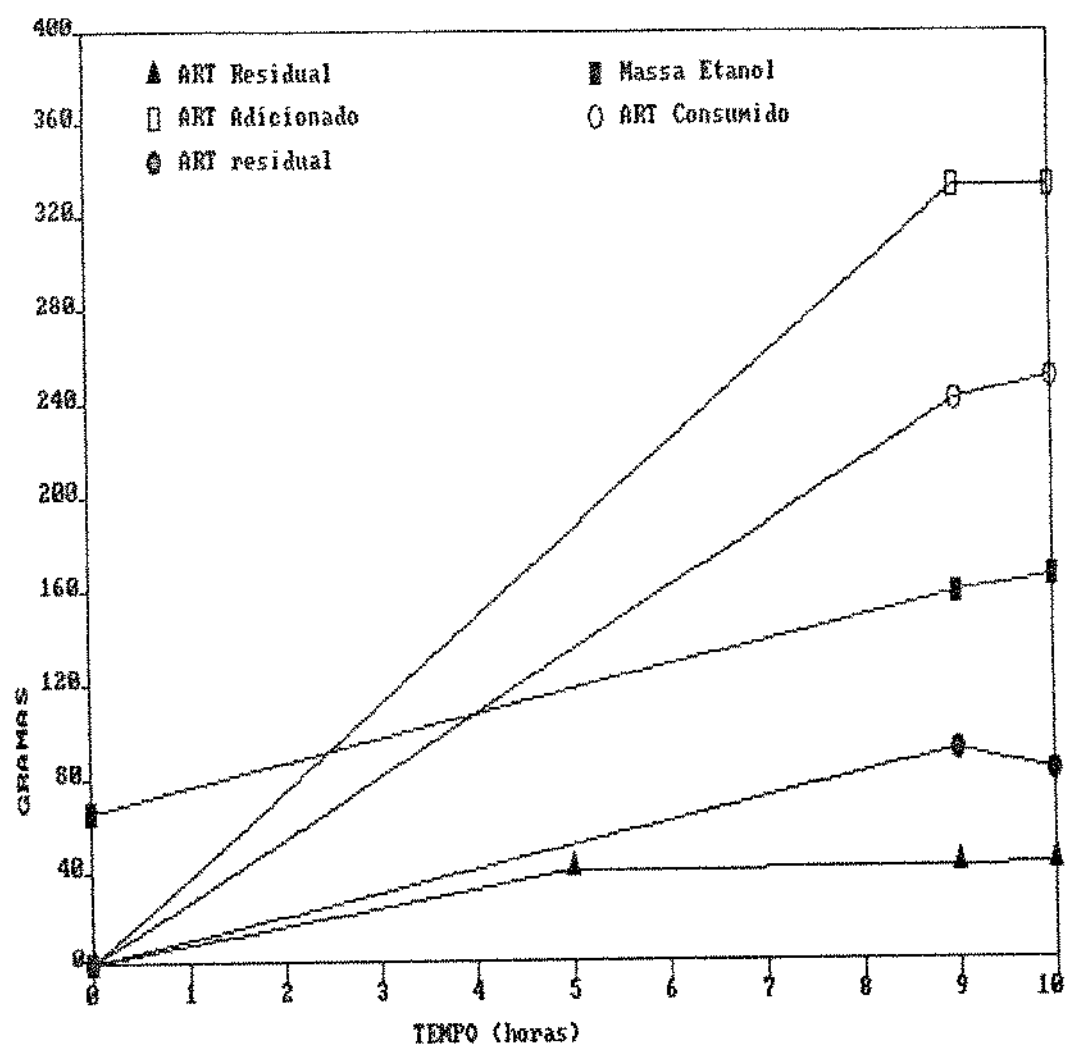


FIGURA 20 - Massa de : ART, etanol acumulado (produzido+resíduo do inóculo) e células (levedura+bactérias), em 10 horas de fermentação no 12º ciclo.

3.4 13º Ciclo - Dia 07/12/89

Condições iniciais:

Ml=34,0 g/l	nl= $6,2 \times 10^8$ cel./ml
Mb=0,481g/l	nb= $8,8 \times 10^8$ cel./ml
S(mosto)= 171 g/l	P(etanol residual)=64,1 g/l

Resultados obtidos:

R= 61,9%	ART consumido=76,1%
Ps= 0,553 g/g.h	r(1/b)= 0,70
Pem= 0,233 g/g.h	Brotos vivos (5h)= 32,4%
Pe = 3,52 g/l.h	Brotos vivos (9h)= 33,2%
Pxb=5,70 mg/g.h	Brotos mortos(5h)= 20,3%
Pxl=0,323 g/g.h	Brotos mortos(9h)= 18,5%
Acidez tot.(vinho)=5,32g/l	Viabilidade (5h)=47,0 %
Acidez produzida= 3,27g/l	Viabilidade (9h)=44,0 %
pH (vinho) = 4,02	Rel.Brot. v/m(9h)= 1,80
Yp/s = 0,415	
Yp/so = 0,316	

Os valores de tempo, volume, concentrações de massa e número de células de levedura e bactérias, açúcares totais(ART) e etanol acumulado estão na tabela 26.

TABELA 26 - Valores de concentração de massa e número de células (levedura e bactérias), ART residuais e etanol acumulado para o 13º ciclo.

tempo (h)	volume (l)	levedura		bactéria		ART residual	etanol acumulado
		[g/l]	Nc/ml*10 ⁸	[g/l]	Nc/ml*10	[g/l]	[g/l]
0,0	1,00	34,0	6,2	0,481	8,8	0,00	64,1
1,0	1,33					32,9	51,8
2,0	1,67					48,0	47,4
3,0	2,00					53,5	44,3
4,0	2,34					63,7	40,7
5,6	2,87	13,3	2,3	0,177	3,2	68,2	39,5
6,0	2,87	13,9	2,4	0,185	3,4	65,8	41,0
8,0	2,87	15,0	2,6	0,202	3,7	46,5	51,2
9,0	2,87					36,3	54,5
10	2,87	15,1	2,6	0,204	3,8	26,6	57,5
24	2,87	15,1	2,6	0,204	3,8	0,00	70,9

Os valores de tempo, biomassa, massa de ART (adicionado, consumido e residual) e, etanol acumulado (produzido+resíduo do inóculo); estão na tabela 27 e na figura 21.

TABELA 27 - Valores de biomassa, massa de ART (res., adic. e, consumido) e etanol acumulado para o 13º ciclo.

tempo (h)	biomassa		massa de ART (g)			etanol(g)
	l(g)	(g)	residual	adiconado	consumido	acumulado
0	34,0	0,481	0,00	0,00	0,00	64,1
1,0			44,0	57,1	13,1	69,1
2,0			80,0	114	34,1	79,1
3,0			107	171	64,1	88,8
4,0			149	228	79,4	95,3
5,6	38,2	0,509	196	320	123	113
6,0	39,9	0,532	189	320	131	118
8,0	43,1	0,580	134	320	186	147
9,0			104	320	215	157
10	43,4	0,590	76,3	320	243	165
24	43,4	0,590	0,00	320	320	204

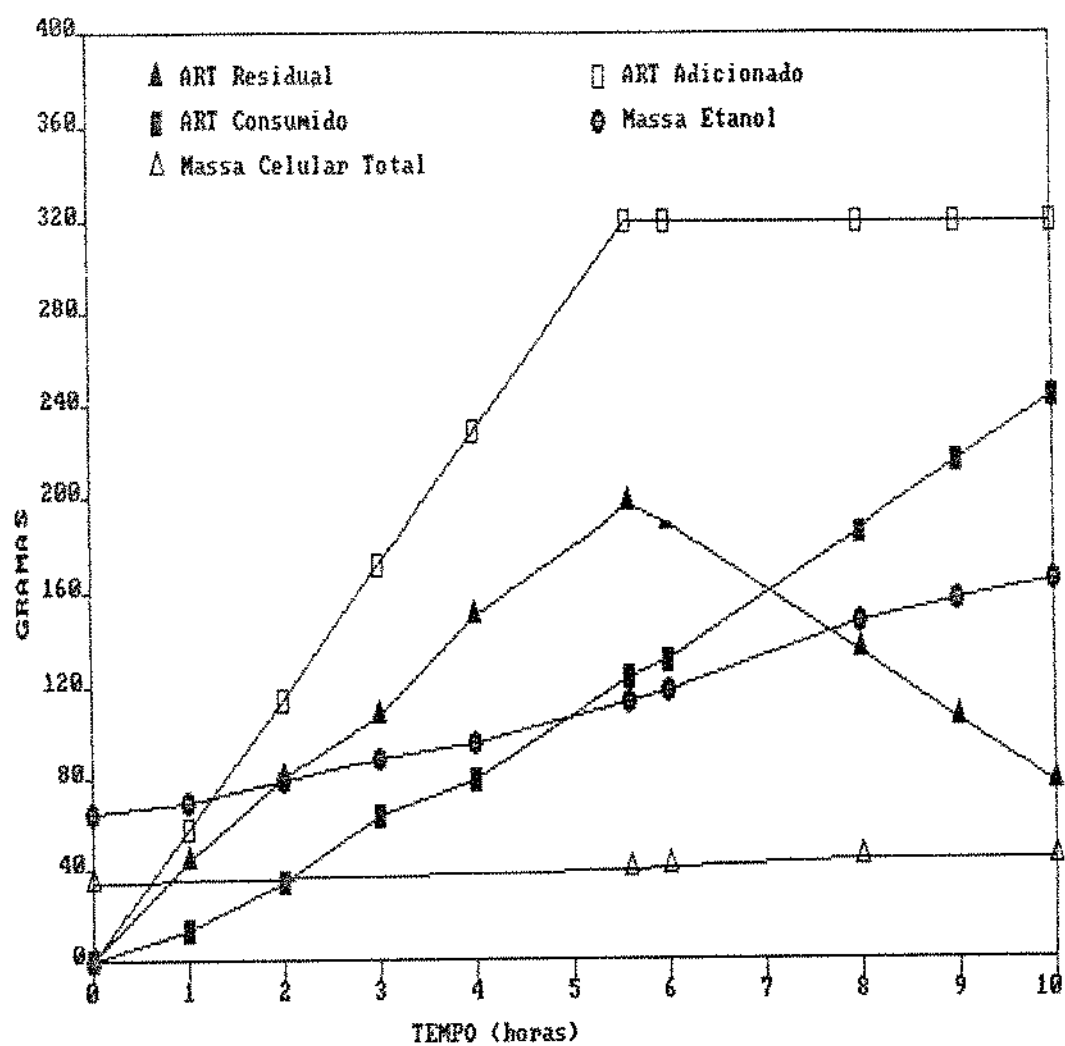


FIGURA 21 - Massa de : ART, etanol acumulado (produzido+resíduo do Inóculo) e células (levedura+bactérias), em 10 horas de fermentação no 13^o ciclo.

Condições iniciais:

Ml=32,16g/l	nl= $5,6 \times 10^8$ cel./ml
Mb=0,55 g/l	nb= 10×10^8 cel./ml
S(mosto)= 183 g/l	P(etanol residual)=66,4 g/l

Resultados obtidos:

R= 59,8%	ART consumido=73,4%
Ps= 0,628 g/g.h	r(1/b) = 0,55
Pem= 0,266 g/g.h	Brotos vivos (5h)= 26,6 %
Pe = 3,64 g/l.h	Brotos vivos (9h)= 22,1 %
Pxb= 4,0 mg/l.h	Brotos mortos(5h)= 25,5 %
Pxl= 0,248 g/l.h	Brotos mortos(9h)= 22,7 %
Acidez tot.(vinho)=5,60g/l	Viabilidade (5h)= 41,5 %
Acidez produzida= 3,45 g/l	Viabilidade (9h)= 45,7 %
pH (vinho) = 3,97	Rel.Brot. v/m(9h)= 0,97
Yp/so = 0,305	
Yp/s = 0,416	

Os valores de tempo, volume, concentrações de massa e número de células de levedura e bactérias, açúcares totais (ART) e etanol acumulado estão na tabela 28.

TABELA 28 Valores de concentração de massa e número de células (levedura e bactérias), ART residuais e etanol acumulado para o 14º ciclo.

tempo	volume	levedura		bactéria		ART	etanol
						residual	acumulado
(h)	(l)	[g/l]	Nc/ml*10 ⁸	[g/l]	Nc/ml*10 ⁸	[g/l]	[g/l]
0	1,00	35,6	6,5	0,642	12	0,00	66,4
1,0	1,32					40,6	57,6
2,0	1,65					57,2	49,8
3,0	1,97					66,1	46,1
4,0	2,30	14,8	2,6	0,253	4,7	68,2	44,9
5,0	2,62	13,3	2,3	0,225	4,1	74,4	44,0
6,0	2,87	13,1	2,2	0,221	4,1	65,8	42,8
7,0	2,87					59,6	49,0
8,0	2,87	13,2	2,2	0,223	4,1	47,8	52,4
9,0	2,87	13,6	2,3	0,230	4,2	40,0	57,6
10	2,87	13,7	2,3	0,232	4,3	31,7	59,5
24	2,87	13,7	2,3	0,232	4,3	3,9	75,7

Os valores de tempo, biomassa, massa de ART (adicionado, consumido e residual) e etanol acumulado (produzido+resíduo do inóculo); estão na tabela 29 e na figura 22.

TABELA 29 - Valores de biomassa, massa de ART (res., adic. e, consumido) e etanol acumulado para o 14º ciclo.

tempo (h)	biomassa		massa de ART (g)			etanol (g)
	l(g)	b(g)	residual	adiconado	consumido	acumulado
0			0,00	0,00	0,00	66,4
1,0			53,7	59,3	5,56	76,0
2,0			94,3	119	24,3	82,1
3,0			130	178	47,4	91,0
4,0	33,99	0,581	157	237	80,5	103
5,0	34,86	0,590	197	296	99,3	116
6,0	37,66	0,635	189	343	154	123
7,0			171	343	171	141
8,0	37,95	0,641	137	343	205	151
9,0	39,10	0,661	115	343	228	165
10,0	39,39	0,667	91,2	343	252	171
24,0	39,39	0,667	11,3	343	332	218

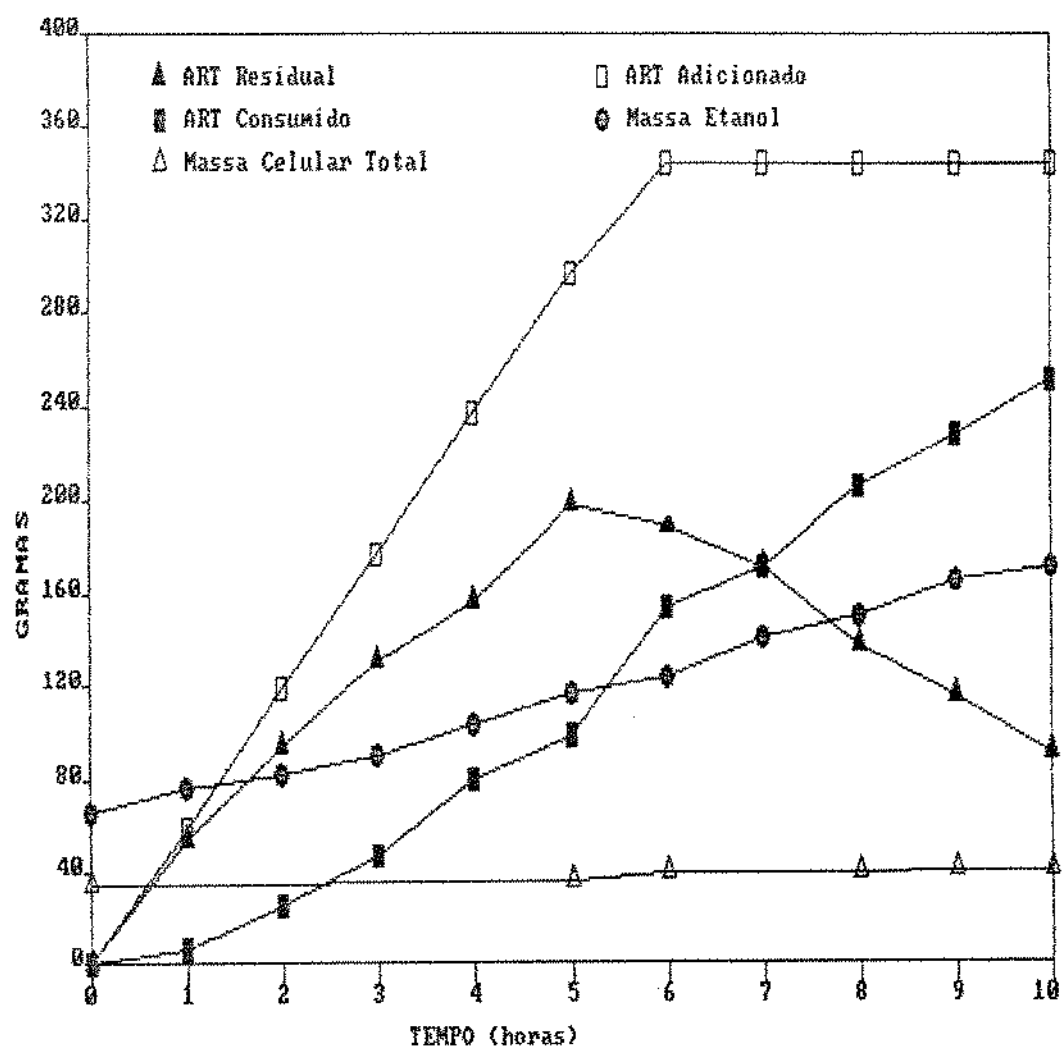


FIGURA 22 - Massa de : ART, etanol acumulado (produzido+resíduo do inóculo) e células (levedura+bactérias), em 10 horas de fermentação no 14º ciclo.

3.6 15º Ciclo - Dia 09/12/89

Condições iniciais:

Ml=35,5 g/l	nl= $6,5 \times 10^8$ cel./ml
Mb=0,704g/l	nb= $12,9 \times 10^8$ cel./ml
S(mosto)= 187 g/l	P(etanol residual)=68,7 g/l

Resultados obtidos:

R= 76,0%	ART consumido=70,8%
Ps = 0,598g/g.h	r(1/b)= 0,50
Pem= 0,236g/g.h	Broto vivos (5h)= 22,4%
Pe = 3,36 g/l.h	Broto vivos (9h)= 21,5%
Pxb= 3,44 mg/gh	Broto mortos(5h)= 27,7%
Pxl= 0,192 g/g.h	Broto mortos(9h)= 22,6%
Acidez tot.(vinho)=5,96g/l	Viabilidade (5h)= 38,3%
Acidez produzida= 3,69g/l	Viabilidade (9h)= 40,0%
pH (vinho) = 3,95	Rel.Brot. v/m(9h)= 0,95
Yp/so = 0,275	
Yp/s = 0,388	

Os valores de tempo, volume, concentrações de massa e número de células de levedura e bactérias, açúcares totais (ART) e etanol acumulado estão na tabela 30

TABELA 30 - Valores de concentração de massa e número de células (levedura e bactérias), ART residuais e etanol acumulado para o 15º ciclo.

tempo (h)	volume (l)	levedura		bactéria		ART residual	etanol acumulado
		[]g/l	Nc/ml*10 ⁸	[]g/l	Nc/ml*10 ⁸	[]g/l	[]g/l
0	1,00	35,5	6,47	0,704	12,9	40,0	68,7
1,2	1,39					40,6	53,3
2,0	1,65					56,6	46,9
3,0	1,39	16,8	2,94	0,319	5,88	68,1	43,6
4,0	2,30					70,7	42,3
5,0	2,62					70,7	41,1
6,0	2,89	13,2	2,27	0,240	4,54	67,0	43,7
7,0	2,89	13,3	2,28	0,248	4,56	54,1	44,3
8,0	2,89	13,7	2,35	0,255	4,70	50,8	50,9
9,0	2,89	13,8	2,37	0,257	4,74	39,3	53,0
10	2,89	14,2	2,45	0,266	4,90	35,7	57,3
24	2,89	14,3	2,47	0,268	4,94	0,00	73,0

Os valores de tempo, biomassa, massa de ART (adicionado, consumido e residual) e etanol acumulado (produzido+resíduo do inóculo); estão na tabela 31 e na figura 23.

TABELA 31 - Valores de biomassa, massa de ART (res., adic. e, consumido) e etanol acumulado para o 15º ciclo.

tempo (h)	biomassa		massa de ART (g)			etanol (g) acumulado
	I(g)	b(g)	residual	adiconado	consumido	
0	35,5	0,704	0,00	0,00	0,00	68,7
1,2			56,4	72,6	16,2	74,0
2,0			91,6	121	29,4	77,4
3,0			134	181	47,1	86,0
4,0			162	242	79,6	97,1
5,0			185	302	117	108
6,0	38,2	0,695	194	354	160	126
7,0	38,5	0,718	157	354	197	128
8,0	39,7	0,738	147	354	207	147
9,0	39,9	0,744	114	354	240	153
10	41,1	0,770	103	354	250	166
24	41,4	0,776	0,00	353	354	211

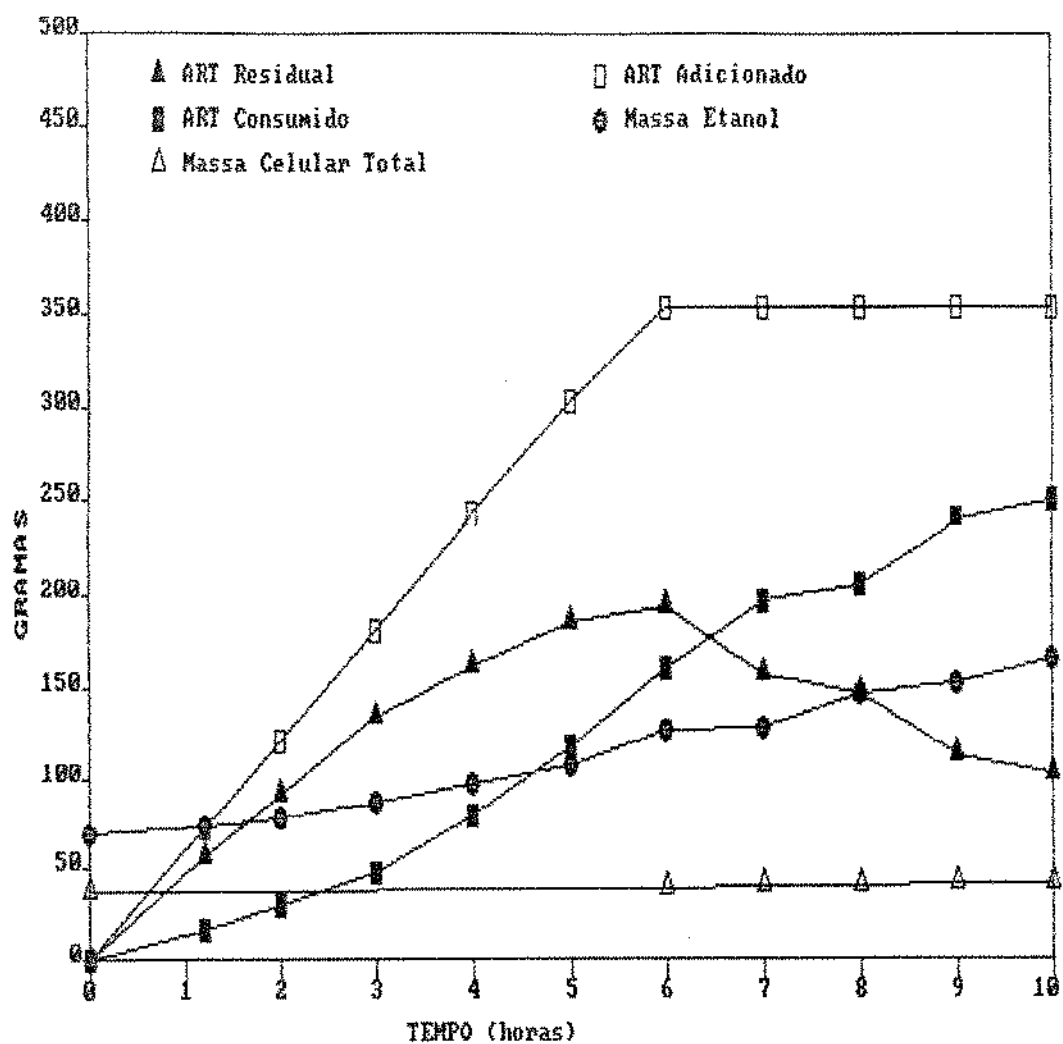


FIGURA 23 - Massa de : ART, etanol acumulado (produzido+resíduo do inóculo) e células (levedura+bactérias), em 10 horas de fermentação no 15º ciclo.

3.6 16º Ciclo - Dia 10/12/89

Condições iniciais:

Ml=34,7 g/l	nl= $6,3 \times 10^8$ cel./ml
Mb=1,91 g/l	nb= $35,1 \times 10^8$ cel./ml
S(mosto)= 181 g/l	P(etanol residual)=69,9 g/l

Resultados obtidos:

R= 46,7 %	ART consumido= 59,7%
Ps= 0,488g/gh	r(l/b)= 0,18
Pem= 0,202g/gh	Brotos vivos (5h)= 16,9%
Pe = 2,83 g/l.h	Brotos vivos (9h)= 15,8%
Pxb= 10,0mg/gh	Brotos mortos(5h)= 33,9%
Pxl= 0,195 g/g.h	Brotos mortos(9h)= 29,3%
Acidez tot.(vinho)=6,22g/l	Viabilidade (5h)= 29,7%
Acidez produzida= 3,90 g/l	Viabilidade (9h)= 36,0%
pH (vinho) = 3,89	Rel.Brot. v/m(9h)= 0,54
Yp/so = 0,235	
Yp/s = 0,394	

Os valores de tempo, volume, concentrações de massa e número de células de levedura e bactérias, açúcares totais (ART) e etanol acumulado estão na tabela 32.

TABELA 32 - Valores de concentração de massa e número de células (levedura e bactérias), ART residuais e etanol acumulado para o 16º ciclo.

tempo (h)	volume (l)	levedura		bactéria		ART residual	etanol acumulado
		[g/l]	Nc/ml*10 ⁸	[g/l]	Nc/ml*10 ⁸	[g/l]	[g/l]
0	1,00	34,7	6,3	1,91	35	5,29	69,9
1,0	1,27					32,2	56,8
2,0	1,54					48,3	49,9
3,0	1,81					60,0	46,3
4,0	2,08					63,9	42,7
5,0	2,35					63,9	41,9
6,0	2,62					70,1	43,0
7,0	2,88	14,1	2,4	0,73	13	72,5	43,7
8,0	2,88	13,7	2,3	0,71	13	59,0	47,0
9,0	2,88	13,9	2,4	0,72	13	52,9	50,0
10	2,88	14,0	2,4	0,73	13	46,6	52,5
24	2,88	14,2	2,4	0,74	14	4,30	73,5

Os valores de tempo, biomassa, massa de ART (adicionado, consumido e residual) e, etanol acumulado (produzido+resíduo do inóculo); estão na tabela 33 e na figura 24.

TABELA 33 - Valores de biomassa, massa de ART (res., adic. e, consumido) e, etanol acumulado para o 16º ciclo.

tempo (h)	biomassa		massa de ART (g)			etanol (g)
	l(g)	b(g)	residual	adicionado	consumido	acumulado
0	34,7	1,91	5,29	0,00	0,00	69,9
1,0			40,9	48,8	7,94	72,1
2,0			74,3	97,7	23,3	76,8
3,0			108	146	38,0	83,7
4,0			133	195	62,5	88,7
5,0			150	244	94,2	98,3
6,0			183	293	108	112
7,0	40,7	2,12	209	342	133	126
8,0	39,5	2,05	170	342	172	136
9,0	40,1	2,08	152	342	189	144
10,0	40,4	2,10	134	342	207	151
24,0	41,0	2,14	12,4	342	329	212

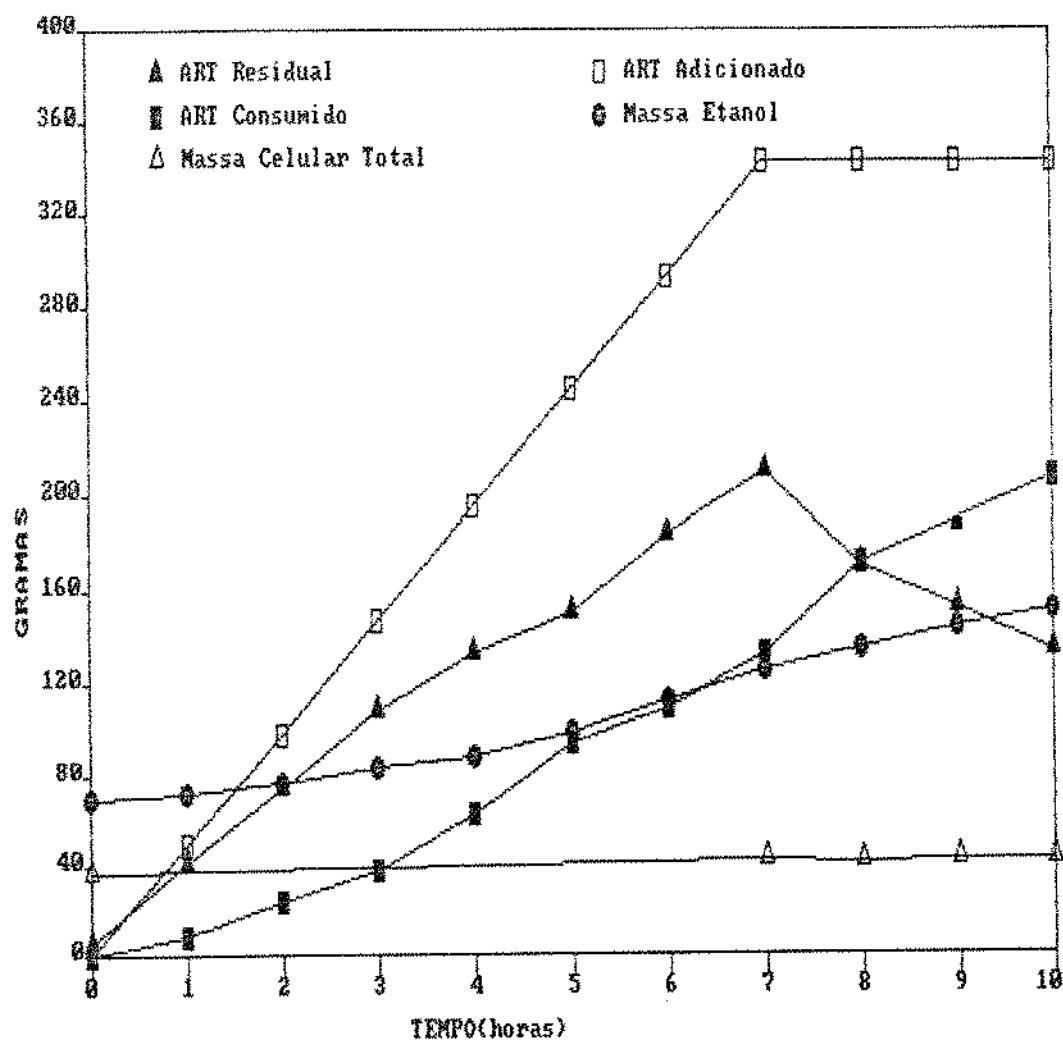


FIGURA 24 - Massa de : ART, etanol acumulado (produzido+resíduo do Inóculo) e células (levedura+bactérias), em 10 horas de fermentação no 18^o ciclo.

Condições iniciais:

Ml=35,3 g/l	nl= $6,4 \times 10^8$ cel./ml
Mb=1,40g/l	nb= 26×10^8 cel./ml
S(mosto)= 183 g/l	P(etanol residual)=70,1 g/l

Resultados obtidos:

R= 49,4%	ART consumido=64,8%
Ps= 0,524g/gh	r(1/b)= 0,25
Pem= 0,209g/gh	Brotos vivos (5h)= 13,1%
Pe= 3,02 g/g.h	Brotos vivos (9h)= 10,7%
Pxb= 8,50 mg/g.h	Brotos mortos(5h)= 30,2%
Pxl= 0,216g/g.h	Brotos mortos(9h)= 26,7%
Acidez tot.(vinho)=6,16g/l	Viabilidade (5h)= 33,2%
Acidez produzida= 3,74 g/l	Viabilidade (9h)= 32,6%
pH (vinho) = 3,83	Rel.Brot. v/m(9h)= 0,40
Yp/s = 0,385	
Yp/so = 0,250	

Os valores de tempo, volume, concentrações de massa e número de células de levedura e bactérias, açúcares totais (ART) e etanol acumulado estão na tabela 34.

TABELA 34 - Valores de concentração de massa e número de células (levedura e bactérias), ART residuais e etanol acumulado para o 17º ciclo.

tempo (h)	volume (l)	levedura		bactéria		ART	etanol
		[g/l]	Nc/ml*10 ⁸	[g/l]	Nc/ml*10 ⁸	residual [g/l]	acumulado [g/l]
0	1,00	35,3	6,4	1,40	26	3,69	70,1
1,0	1,35					44,6	54,3
2,0	1,70					62,1	47,3
3,0	2,04					68,9	41,3
4,0	2,39					75,6	41,3
5,0	2,74	14,0	2,4	0,525	9,65	78,7	38,8
6,0	2,89					78,1	41,6
7,0	2,89					68,9	45,1
8,0	2,89					57,8	48,5
9,0	2,89					49,8	50,9
10	2,89	14,4	2,5	0,541	9,96	41,2	54,4
24	2,89	14,4	2,5	0,541	9,96	0,00	68,9

Os valores de tempo, biomassa, massa de ART (adicionado, consumido e residual) e, etanol acumulado (produzido+resíduo do inóculo), estão na tabela 35 e na figura 25.

TABELA 35 - Valores de biomassa, massa de ART (res., adic. e, consumido) e etanol acumulado para o 17º ciclo.

tempo (h)	biomassa		massa de ART (g)			etanol (g)
	l(g)	b(g)	residual	adiconado	consumido	acumulado
0	35,3	1,40	3,69	0,00	0,00	70,1
1,0			60,2	63,6	3,47	73,2
2,0			105	127	22,0	80,3
3,0			141	191	50,2	84,4
4,0			181	255	73,7	98,7
5,0	38,4	1,44	216	318	103	106
6,0			225	345	120	120
7,0			199	345	146	130
8,0			167	345	178	140
9,0			144	345	201	147
10,0	41,6	1,56	119	345	226	157
24,0	41,6	1,56	0,00	345	345	199

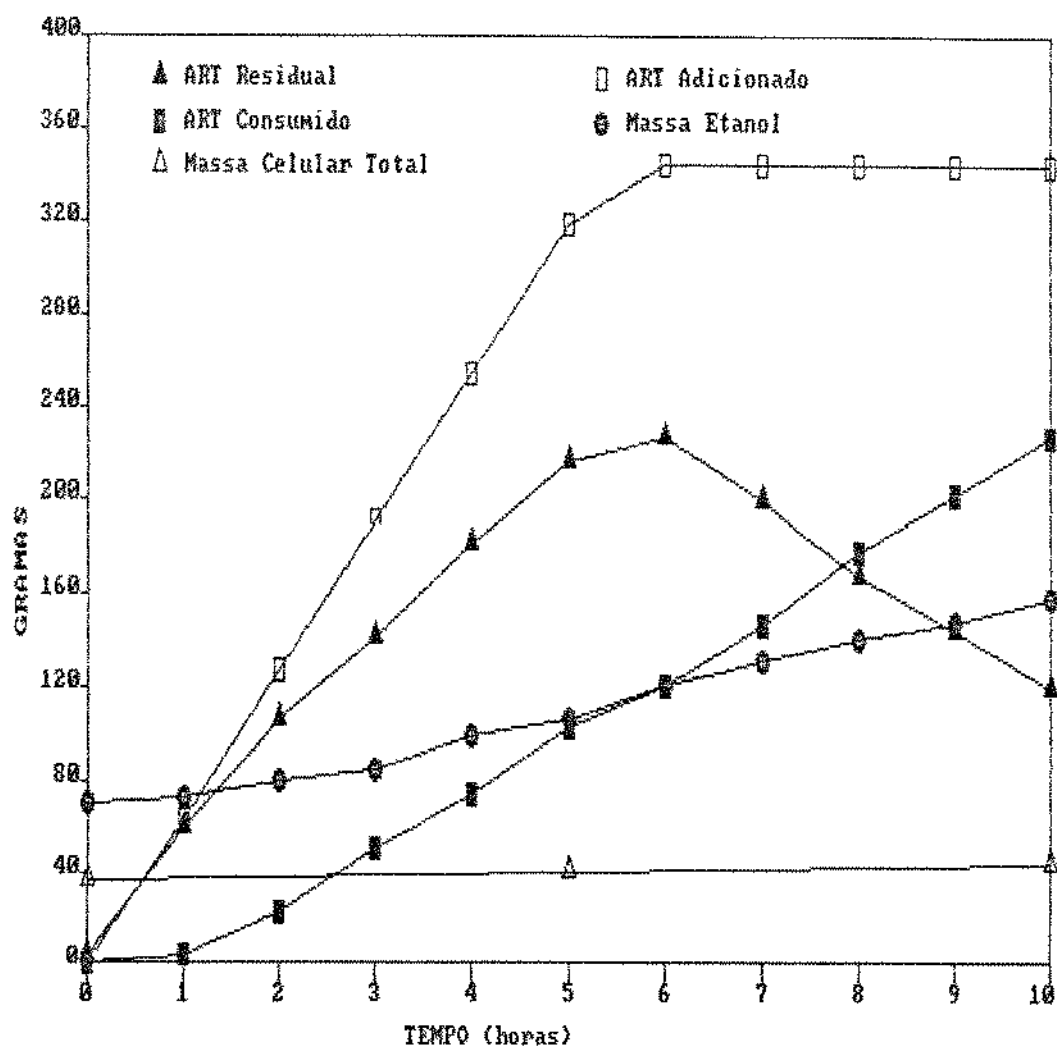


FIGURA 25 - Massa de : ART, etanol acumulado (produzido+resíduo do Inóculo) e células (levedura+bactérias); em 10 horas de fermentação no 17º ciclo.

3.8 18º Ciclo - Dia 12/12/89

Condições iniciais:

Ml=33,8	n1= $6,2 \times 10^8$ cel./ml
Mb=0,481g/l	nb= 22×10^8 cel./ml
S(mosto)= 177 g/l	P(etanol residual)=68,1 g/l

Resultados obtidos:

R= 53,9%	ART consumido=64,5%
Ps= 0,553g/g.h	r(1/b)= 0,28
Pem= 0,233g/g.h	Broto vivos (5h)= 10,7%
Pe = 3,18 g/g.h	Broto vivos (9h)= 11,3%
Pxb= 5,70 mg/g.h	Broto mortos(5h)= 36,6%
Px1= 0,267 g/g.h	Broto mortos(9h)= 33,2%
Yp/s = 3,18	Viabilidade (5h)= 28,2%
Yp/so= 0,272	Viabilidade (9h)= 31,7%
	Rel.Brot. v/m(9h)= 0,34

Os valores de tempo, volume, concentrações de massa e número de células de levedura e bactérias, açúcares totais (ART) e etanol acumulado estão na tabela 36.

TABELA 36 - Valores de concentração de massa e número de células (levedura e bactérias), ART residuais e etanol acumulado para o 18º ciclo.

tempo (h)	volume (l)	levedura		bactéria		ART residual	etanol acumulado
		[g/l]	Nc/ml*10 ⁸	[g/l]	Nc/ml*10 ⁸	[g/l]	[g/l]
0	1,00	33,8	6,2	1,20	22,0	4,55	68,1
1,0	1,47					43,0	51,7
2,0	1,94					59,6	46,4
3,0	2,41					73,2	41,7
4,0	2,88					81,2	39,8
5,0	2,88					80,5	37,9
6,0	2,88					75,6	40,4
7,0	2,88					68,2	44,7
8,0	2,88					47,8	51,0
9,0	2,88					40,9	54,4
10,0	2,88	14,4	2,5	0,484	8,90	40,0	55,4
24,0	2,88	14,8	2,6	0,498	9,16	5,29	72,5

Os valores de tempo, biomassa, massa de ART (adicionado, consumido e residual) e etanol acumulado (produzido+resíduo do inóculo); estão na tabela 37 e na figura 26.

TABELA 37 - Valores de biomassa, massa de ART (res., adic. e, consumido) e etanol acumulado para o 18º ciclo.

tempo (h)	biomassa		massa de ART (g)			etanol (g)
	l(g)	b(g)	residual	adicionado	consumido	acumulado
0	33,8	1,20	4,55	0,00	0,00	68,1
1,0			63,3	83,3	20,0	76,1
2,0			116	167	50,7	90,2
3,0			177	250	73,3	101
4,0			234	333	99,0	115
5,0			232	333	101	109
6,0			218	333	115	116
7,0			197	333	136	129
8,0			138	333	195	147
9,0			118	333	215	157
10	41,5	1,40	115	333	218	160
24	42,7	1,44	15,3	333	318	209

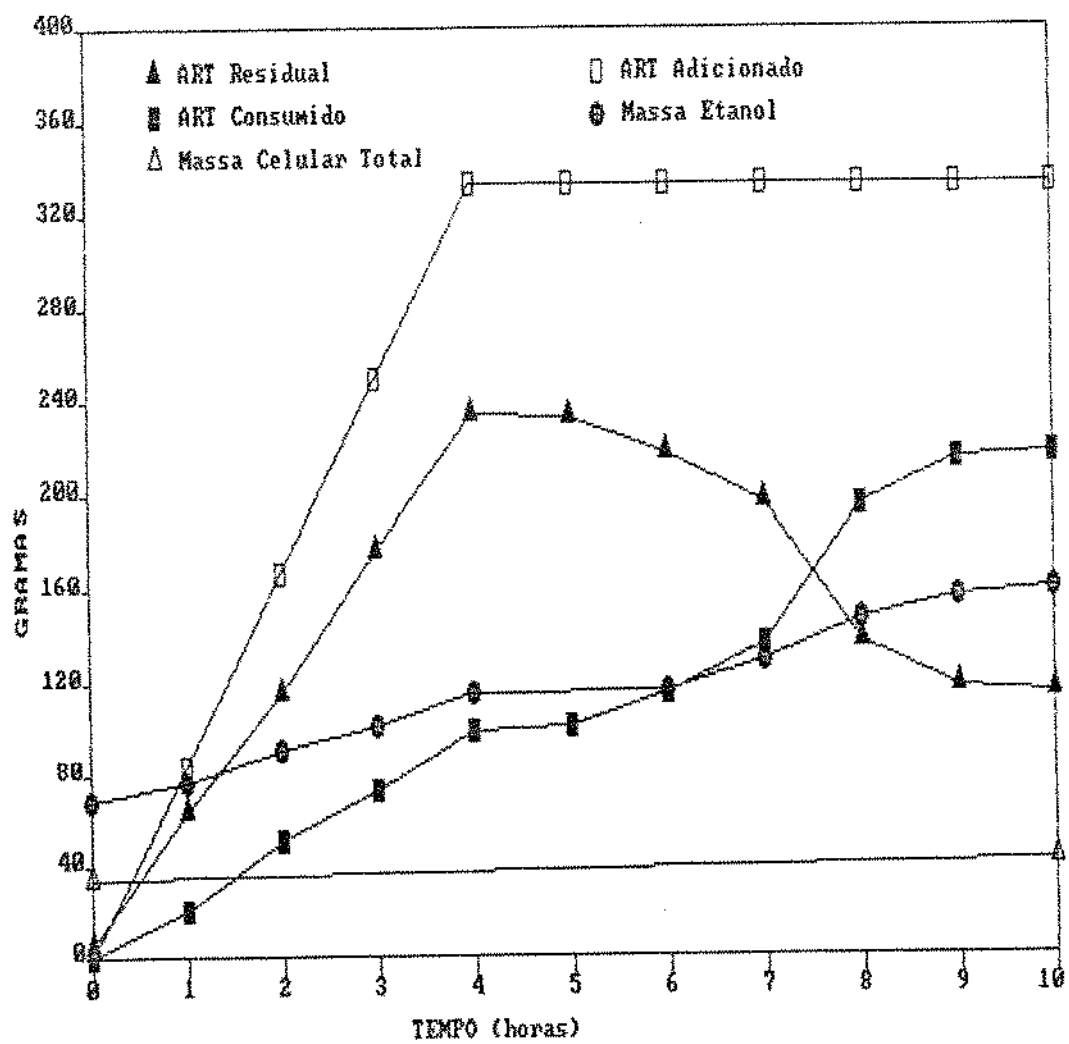


FIGURA 26 - Massa de : ART, etanol acumulado (produzido+resíduo do Inóculo) e células (levedura+bactérias), em 10 horas de fermentação no 18º ciclo.

3.9 ANÁLISE DOS CICLOS 100 ao 180

O experimento havia sido programado para terminar no 90 ciclo (9 dias), porém foram feitos 2 ciclos (100 e 110) nas mesmas condições que os anteriores, apenas fazendo controle: da acidez e pH do vinho, porcentagem dos brotos vivos e mortos, relação numérica levedura por bactéria, densidade ótica total e viabilidade. Como notava-se um aumento do número de bactérias lácticas e a relação entre a porcentagem de brotos vivos e mortos permanecia inalterada, resolveu-se continuar após o 110 ciclo, nas mesmas condições dos ciclos anteriores, e fazendo todas as análises (células, substrato, etanol, ácido e pH).

A partir do 120 até o 180 ciclo observou-se a pior fase do experimento, tanto em relação ao estado fisiológico das células de leveduras, como em relação aos parâmetros relativos ao processo.

A concentração da acidez total no vinho, expressa em gramas por litro de ácido láctico, aumentou de : 3,7 no 90 ciclo para 4,83 no 120 ciclo e para 6,21 no 160 ciclo com um ligeiro decréscimo no 170 Ciclo (o 180 ciclo não pôde ser analisado devido a um acidente no laboratório). Esse aumento de acidez entre o 90 e o 120 ciclo foi de 30%, e do 90 ao 160 ciclo foi de 67,5%. Refletiu o aumento e a predominância dos lactobacilos nesta fase em relação as leveduras. O número de células de levedura no inóculo aumentou de $4,4 \times 10^8$ para $6,3 \times 10^8$ cel./ml, entre o 90 e o 160 ciclo (um aumento de 44,3%), enquanto que o número de bactérias lácticas nesse mesmo período aumentou de $2,8 \times 10^8$ para 35×10^8 cel./ml de inóculo, um aumento de 12,5 vezes. Isso explica essa ele-

vada concentração de ácido láctico nesta fase final do experimento, e um decréscimo acentuado na relação entre leveduras e bactérias, de 1,6 no 12o ciclo para 0,18 no 16o ciclo, uma diminuição de 8,67 vezes.

Todos os parâmetros de avaliação do estado fisiológico da célula demonstraram acentuada perda nas condições vitais da levedura durante o período entre o 12o e o 16o ciclo. A viabilidade sofreu um decréscimo de 59% para 31,7%. A porcentagem de brotos vivos, ao final de 9 horas de fermentação, caiu de 36% para 11,3%, enquanto que a porcentagem de brotos mortos subiu de 16,2% para 33,24%. Isso fez com que a relação entre brotos vivos e mortos decaísse de 2,22 para 0,34, representando que ao final do experimento, para cada broto vivo nascido, tres estavam mortos.

Quanto aos parâmetros do processo também foi observado um declínio no rendimento, nas produtividades (P_e , P_{em} e P_s), fatores de conversão Y_p/s e Y_p/s_o e % de ART consumido. O rendimento (R) foi sensível ao aumento de acidez, apresentando uma diminuição, comparando-se a média dos primeiros 9 ciclos com o 16o, de 66% para 47% uma queda percentual de 29%. As produtividades P_e , P_{em} e P_s variaram desde o 9o até o 16o ciclo, respectivamente de: 3,6 g/lh; 0,35 g/gh e 0,81 g/g.h, para 2,8 g/l.h; 0,20 g/g.h e 0,49 g/g.h, o que representou uma perda de 21,6%, 42,3% e 39,6% respectivamente, em relação ao 9o ciclo.

Os fatores de conversão Y_p/s e Y_p/s_o diminuíram, respectivamente, de 0,43 e 0,32 no 9o ciclo, para 0,39 e 0,23 no 16o ciclo. A porcentagem de ART consumido em relação ao oferecido ao sistema, diminuiu de 73,9% no 9o ciclo, para 59,8% no 16o ciclo.

Os resultados expostos deixam claro que houve uma influência negativa da infecção por lactobacilos sobre as leveduras do fermento comercial, assim como, sobre o processo de obtenção de etanol por batelada alimentada.

4. RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS NOS 18 CICLOS

Os valores de pH e a acidez total no "vinho", HTM, Inóculo: e a acidez do vinho descontando o resíduo do inóculo e HTM, expressas em concentração (g/l) de ácido láctico para os 18 ciclos, estão reunidos na tabela 38 e 39 respectivamente.

TABELA 38 - Valores de pH do mosto de alimentação, inóculo e "vinho" nos 18 ciclos.

Ciclos	pH Mosto	pH Inóculo	pH Vinho
1	5,37	4,91	4,00
2	5,52	4,52	4,12
3	5,35	4,57	4,21
4	5,40	4,70	4,32
5	5,35	4,65	4,47
6	5,39	4,80	4,43
7	5,40	4,80	4,44
8	5,30	4,63	4,27
9	5,38	-	4,21
10	5,44	4,42	4,09
11	5,40	4,31	4,04
12	5,40	4,26	4,04
13	5,37	4,22	4,02
14	5,40	4,17	3,97
15	5,41	4,13	3,95
16	5,37	4,04	3,89
17	5,26	3,97	3,83
18	5,22	3,90	-

TABELA 39 - Acidez total do vinho, HTM ,Inóculo e acidez produzida descontando Inóculo e HTM nos 18 ciclos, expressa em g/l de ácido láctico.

ciclos	Acidez total vinho g/l	Acidez HTM g/l	Acidez Inóculo g/l	Acidez Produzida (descont.HTM e Inocul.) g/l
1	4,31	1,45	-	-
2	3,44	0,663	3,72	1,79
3	3,04	1,06	3,07	1,22
4	2,95	0,973	2,56	1,41
5	2,78	0,953	2,55	1,27
6	2,76	0,848	2,47	1,33
7	2,65	0,973	2,43	1,18
8	3,23	1,06	2,32	1,71
9	3,71	0,973	2,80	2,10
10	4,23	0,953	3,24	2,48
11	4,72	0,973	3,57	2,85
12	4,83	0,973	3,89	2,84
13	5,31	0,994	3,90	3,27
14	5,60	0,973	4,30	3,45
15	5,96	0,953	4,71	3,69
16	6,21	0,994	4,72	3,90
17	6,16	1,06	4,93	3,74
18	-	1,14	4,96	-

Os valores do número de células por mililitro e concentração de células no inóculo, para leveduras e bactérias nos 18 ciclos, estão na tabela 40.

TABELA 40 - Valores do número de células/ml de inóculo e concentração de células no inóculo, para leveduras e bactérias nos 18 ciclos.

ciclos no	número de células/ml(*10 ⁸)		concentração (g/l)	
	leveduras	bactérias	leveduras	bactérias
1	4,4	2,3	24,6	0,123
2	4,5	1,2	25,0	0,067
3	4,3	0,72	24,2	0,040
4	4,3	0,62	24,1	0,033
5	4,4	0,50	24,6	0,030
6	3,7	0,38	20,7	0,021
7	4,0	0,40	22,4	0,020
8	4,0	1,1	22,5	0,062
9	4,4	2,8	24,5	0,150
10	4,2	4,0	23,3	0,220
11	5,1	5,1	28,3	0,356
12	5,7	6,5	31,4	0,481
13	6,2	8,8	34,0	0,481
14	5,6	10	32,2	0,550
15	6,5	13	35,5	0,704
16	6,3	35	34,7	1,910
17	6,4	26	35,3	1,400
18	6,2	22	33,8	1,185

Os valores dos parâmetros calculados para a avaliação das condições fisiológicas das células de levedura e acidez total no sistema (expressa em g/l de ácido láctico), estão na tabela 41.

TABELA 41 - Valores dos parâmetros calculados: relação numérica leveduras/bactérias $r(l/b)$ no inóculo, relação acidez/ $r(l/b)$, viabilidade, brotamento da levedura e a relação entre a porcentagem de brotos vivos pelos mortos durante 9 horas de fermentação.

ciclos	relação (l/b)	relação acidez total/(l/b)	Viabil. % (9h)	% brotos vivo morto (9h) (9h)		Relação Brot.(v/m) (9h)
1	2,0	2,21	96,8	10,3	0,43	24,0
2	3,6	0,99	92,1	9,80	0,58	17,0
3	6,0	0,51	81,7	4,00	1,85	2,20
4	7,0	0,42	63,8	3,70	4,00	0,930
5	8,0	0,35	64,2	19,2	5,79	3,32
6	9,6	0,29	51,0	38,6	16,1	2,27
7	11	0,24	55,0	37,8	13,5	2,80
8	3,5	0,92	55,7	31,9	15,2	2,10
9	1,6	2,38	59,0	39,5	17,3	2,28
10	1,0	4,11	-	-	-	-
11	1,0	4,72	-	-	-	-
12	0,87	5,55	59,0	35,9	16,2	2,22
13	0,70	7,59	44,0	33,2	18,5	1,80
14	0,55	10,2	45,7	22,1	22,7	0,970
15	0,50	11,9	40,0	21,5	22,6	0,950
16	0,18	34,5	36,0	15,8	29,3	0,540
17	0,25	-	32,6	10,7	26,7	0,400
18	0,28	-	31,7	11,3	33,2	0,340

As tabela 42 e 43 relacionam os parâmetros de avaliação do processo de batelada alimentada de obtenção de etanol.

TABELA 42 - Valores dos parâmetros calculados: Taxa de consumo de consumo de ART devido a massa total de células (Ps), Produtividade de etanol em função do volume do fermentador (Pe) e do total de massa celular (Pem), Produtividade de células em função do volume do fermentador para leveduras (Pxl) e bactérias (Pxb).

ciclos no	Ps g/gh	Pem g/gh	Pe g/lh	Pxl g/lh	Pxb mg/lh
1	1.08	0.386	5.60	0,585	3,95
2	0.836	0.379	3.95	0,306	1,00
3	0.899	0.414	4.39	0,204	0,18
4	0.997	0.431	4.22	0,159	0,06.
5	0.968	0.379	4.01	0,322	0,11
6	0.917	0.375	3.23	0,124	0,00
7	0.822	0.334	3.64	0,325	0,33
8	0.885	0.346	3.36	0,184	0,36
9	0.808	0.350	3.61	0,184	0,84
12	0.594	0.238	3.43	0,355	4,87
13	0.553	0.233	3.52	0,323	5,70
14	0.628	0.266	3.64	0,248	4,00
15	0.598	0.236	3.36	0,192	3,44
16	0.488	0.202	2.83	0,195	10,00
17	0.524	0.209	3.02	0,216	8,50
18	0.507	0.221	3.18	0,267	10,50

TABELA 43 - Valores dos parâmetros calculados: Rendimento (R) ,
Fatores de conversão do substrato total adicionado ao
sistema em etanol produzido (Y_{p/s_0}) e e do substrato
consumido em etanol produzido ($Y_{p/s}$), e % ART consumido.

ciclos	R	Y_{p/s_0}	$Y_{p/s}$	% ART
no	(%)	g/g	g/g	consumido
1	61,7	0.299	0,360	87.7
2	75,4	0.333	0,453	83.3
3	77,5	0.391	0,460	85.2
4	70,7	0.356	0,432	82.4
5	70,7	0.356	0,497	71.6
6	61,2	0.313	0,408	76.6
7	59,2	0.303	0,406	74.4
8	55,1	0.282	0,364	77.3
9	62,2	0.319	0,431	73.9
12	58,5	0.299	0,397	75.4
13	61,9	0.316	0,415	76.1
14	59,8	0.305	0,416	73.4
15	53,8	0.275	0,388	70.8
16	46,7	0.235	0,394	59.7
17	49,4	0.250	0,385	64.8
18	53,9	0.272	0,421	64.5

DISCUSSÃO SOBRE OS ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO

1. O PROCESSO DE FERMENTAÇÃO UTILIZADO

O processo de fermentação neste trabalho visou reproduzir, dentro do possível, o processo industrial de batelada alimentada para produção de etanol. As condições foram fixadas próximas das observadas na indústria: temperatura de 32° C, o substrato (mosto) de aproximadamente 180 g/l de açúcares totais (ART) e a concentração de células de levedura no inóculo de 4×10^8 cel./ml (STUPIELLO e HORII, 1981; FINGUERUT et al., 1983; BUENO-NETO, 1982; CAMHI, 1979).

O fato de serem feitas repetições sucessivas dos ensaios de fermentação, com esvaziamento e enchimento a volumes específicos, levam a uma operação cíclica de volume variado e a um estado "quasi" equilibrado, semelhante às operações contínuas, com taxa específica de formação de produto constante (PIRT, 1974; KELLER e DUNN, 1978; AIBA, 1976) e as concentrações de substrato vão lentamente aumentando ou diminuindo. Essas características não foram objetivos desse trabalho, mas podem ser observadas variações pequenas do produto formado e concentração de células de leveduras ao longo deste experimento, através das tabelas referentes aos valores de concentração dessas variáveis a cada intervalo tempo de fermentação durante os ciclos.

As condições iniciais da contaminação bacteriana foram estabelecidas mantendo uma relação levedura/bactéria mais favorável a primeira. A população inicial de lactobacilos, de aproxi-

madamente 2×10^8 cel./ml, correspondeu a uma infecção usual nas usinas, já que segundo STUPIELLO e HORII (1981) a faixa encontrada nas usinas é de 10^5 a 10^8 cel./ml. e a relação levedura por bactéria é favorável à levedura em dornas sadias.

A escolha da cepa usada nos ensaios de fermentação como agente contaminante (a de nº 28 *Lactobacillus fermentum*), foi feita baseando-se no fato de esta ser a de maior incidência, dentre as isoladas (Tabela 3), indicando adaptação ao meio fermentativo. Além disso ela resistiu a 10% de etanol e não manifestou a característica de flocular o fermento comercial, o que comprometeria a homogeneização do sistema e dificultaria as amostragens e análises do mosto de fermentação.

Os resultados obtidos quanto ao teor alcoólico no vinho e o tempo de fermentação (50 a 60 g/l em 10 horas de fermentação) também foram parecidos aos encontrados nas usinas, que em termos médios é de 62,8 g/l em 13,9 horas de fermentação para usinas no estado de São Paulo. (FINGUERUT et al. 1983)

O uso do próprio vinho do ciclo anterior, para o preparo do inóculo, também se baseou na forma de preparo do "pé-de-cuba" nas indústrias, onde a concentração do "leite de levedura" extraído da fermentação é da ordem de 50-60%, tendo portanto, um resíduo de etanol oriundo do vinho. (STUPIELLO e HORII, 1981).

O rendimento alcoólico, segundo estes últimos autores, varia nas usinas numa faixa de 70 a 90%, dependendo das condições de instalações, matéria-prima e condução da fermentação. Dados colhidos de situações reais de produção em usinas nas safras de 1977 a 1983 (FINGUERUT et al., 1983) mostraram uma média para o rendimento fermentativo de 85%. O rendimento obtido nesse expe-

rimento para os primeiros 5 ciclos ficou na faixa de 71 a 77% (tabela 43), semelhante ao praticado na indústria. Há uma grande diferença entre o processo fermentativo praticado na indústria e o utilizado neste trabalho. Na prática industrial, um controle microbiológico é feito no inóculo, através de tratamento com ácido sulfúrico e, às vezes, com desinfetantes e/ou antibióticos. Neste experimento não foi usado nenhum tipo de agente inibidor da contaminação bacteriana, já que o objetivo era estudar o comportamento desse agente ao longo dos ciclos fermentativos.

Assim como nos parâmetros de processo, também houve semelhança à prática nas indústrias com relação às características fisiológicas das células de leveduras. É claro que os primeiros ciclos e a faixa a partir do 12º ciclo até o final, não puderam ser relacionados aos índices encontrados nas usinas, já que tanto as situações iniciais como a fase final do experimento são situações atípicas. Esta última fase é evitada na indústria pelos métodos acima citados.

A viabilidade das células de leveduras variou de 51 a 97% nos 12 primeiros ciclos (tabela 41 e figura 31). Resultados semelhantes (50 a 100%) foram encontrados na análise feita por FINGUERUT et al. (1986) em um acompanhamento ao longo de toda uma safra em usinas produtoras de etanol. Esses mesmos autores encontraram uma faixa de porcentagem de brotamento bastante variada ao longo da safra (20 a 85%). Neste trabalho, não considerando os 4 primeiros ciclos, a faixa encontrada foi de 19 a 36% (tabela 40). A relação levedura/bactéria variou, segundo esses autores, de aproximadamente 0 a 20 numa das usinas onde foi feito o acompanhamento da safra. Resultados próximos foram encontrados neste

experimento onde a relação variou de 0,2 a 11. (tabela 41)

A principal finalidade do processo de batelada alimentada, além da economia de tempo (já que enquanto o mosto vai sendo adicionado ocorre a fermentação), está na possibilidade do uso de elevadas concentrações de substrato (100 a 200 g/l), sem haver "inibição pelo substrato", caracterizada pela forte inibição da atividade fermentativa e crescimento da levedura quando a concentração de substrato é superior a 150 g/l (JONES et al., 1981). Esse valor não foi atingido neste trabalho, já que as máximas concentrações de substrato residual no fermentador foram de 78 g/l no primeiro ciclo (tabela B), quando a concentração no mosto de alimentação foi de 272,8 g/l e, de 81 g/l no 18º ciclo com uma concentração no mosto de 176,8 g/l (tabela 36). Isso é típico deste tipo de processo, onde um controle apropriado da taxa de alimentação de substrato evita o efeito inibidor do açúcar sobre a levedura (Almeida, 1980 ; Peringer e Blachere, 1979). Portanto, neste experimento onde o substrato foi introduzido ao longo de algumas horas, a semelhança do que ocorre nas usinas, o processo utilizado cumpriu o objetivo de evitar a inibição pelo substrato.

2. CONDIÇÕES VITAIS DAS LEVEDURAS (FERMENTO)

Os parâmetros, relacionados às condições vitais das células de leveduras, demonstraram 3 fases com comportamentos distintos. Na primeira (1o ao 6o ciclo) ficou caracterizada uma queda da viabilidade das células das leveduras (figura 32 e tabela 39) de 96,8 para 51%. Provavelmente decorreu do contato inicial com a exposição ao etanol e a dessecação na etapa de centrifugação, indicando o período em que as células ainda não estavam adaptadas às condições do processo. Neste período a acidez era a mais baixa do experimento (tabela 39)

A adaptação do fermento ao sistema com relação ao índice viabilidade, só começou a ser verificada a partir do 6o até o 12o ciclo. Neste período houve uma estabilidade deste parâmetro que manteve-se na faixa entre 51 e 59%. A terceira fase teve início a partir do 13o ciclo até o final. Houve uma segunda queda deste índice, de 59 para 31,7%, só que desta vez devido ao excesso de acidez nesta fase, os maiores índices encontrados (figura 29 e tabela 39).

As figuras 27 e 29 e as tabelas 38 e 39, evidenciam o aumento da acidez, do número de células bacterianas, da relação levedura/bactéria e a diminuição do pH entre a fase inicial e os últimos ciclos.

Podem ser caracterizadas duas fases distintas quanto a estas variáveis. Na primeira, do 1o ao 7o ciclo, a acidez total no vinho diminuiu de 4,31 para 2,65 g/l, expressa em ácido láctico, uma diminuição de 61,5% (tabela 39). O pH do vinho aumentou de 4,00 para 4,44 (tabela 38). A relação levedura/bactéria no

Inóculo aumentou de 2,0 para 11, um aumento de 5,5 vezes devido apenas ao coptaminante, com uma diminuição do número de bactérias no inóculo de $2,3 \times 10^8$ para $0,4 \times 10^8$ (diminuição de 82,6%), já que não houve aumento do número de leveduras e sim uma pequena diminuição (10%), de $4,4 \times 10^8$ para $4,0 \times 10^8$ no inóculo, não justificando nenhuma influência significativa na relação levedura/bactéria (e se existisse seria de diminuição da relação levedura/bactéria, o que não ocorreu).

Na segunda fase, entre o 7º e o 16º ciclo os parâmetros acima relacionados tiveram comportamento inverso. A acidez total no vinho (figura 28) aumentou de 2,65 para 6,21 g/l, expressos em ácido láctico, um aumento de 134%. O pH do vinho diminuiu gradativamente de 4,44 para 3,89 (tabela 38). A relação levedura/bactéria (tabela 41 e figura 29) diminuiu acentuadamente de 11 para 0,18 (diminuição de 61 vezes) devido também, ao número de bactérias lácticas que no inóculo aumentou de $0,4 \times 10^8$ para 35×10^8 cel./ml (diminuição de 87,5 vezes). A produtividade de massa bacteriana que no 6º ciclo era nula, no 7º ciclo era de 0,33 mg/l.h, no 16º aumentou para 10 mg/l.h (figura 29). Já o número de leveduras aumentou de $4,0 \times 10^8$ para $6,3 \times 10^8$ cel./ml (57,5% de aumento), também demonstrando nesta fase, que não foi o responsável pela variação da relação levedura/bactéria (pois deveria diminuir para justificar a diminuição dessa relação).

Uma análise estatística comprovou correlação existente entre pH e acidez total do "vinho" a nível alfa de decisão=5% :

$r = -0,922$ (entre 0 20 e 0 170 c.) onde $r = \text{coef. correl. "Pearson"}$

Teste t de "student": $t_{\text{calculado}} = 9,22 > t_{\text{crítico } 0,05} = 2,13$

Eq. reta: $y = 4,74 - 0,144 * x$

onde $x = \text{acidez total "vinho" expr. ac. láctico (g/l)}$

$y = \text{pH}$

Pela figura 28 que relaciona a acidez total do "vinho" com o número de lactobacilos no inóculo e com a relação levedura/bactéria, pode-se verificar que há uma relação entre estas variáveis até uma certa faixa de acidez. Com o aumento de acidez ocorre uma diminuição da relação levedura/bactéria e aumento do número de células bacterianas. Porém não há uma correlação neste caso se for considerada a fase final do experimento. Isso se deve ao limite da bactéria em produzir ácido, a partir do qual não há correspondência entre relação levedura/bactéria ou número de células e acidez. Ainda na figura 28, pode-se verificar a relação entre o número de células bacterianas e a relação levedura/bactéria, aumentando o primeiro diminui o segundo.

Houve também correlação entre acidez total e acidez produzida a nível alfa de decisão = 5%, indicando a não interferência de fatores externos, conforme os resultados abaixo:

$r = -0,996$ (entre 0 20 e 0 170 C.) onde $r = \text{coefic. correl. "Pearson"}$

teste t de "student": $t_{\text{calculado}} = 41,71 > t_{\text{crítico } 0,05} = 2,2$

eq. reta: $y = -0,8264 + 0,761 * x$

onde $x = \text{acidez total "vinho" expr. ac. láctico (g/l)}$

$y = \text{acidez produz. "vinho" expr. ac. láctico (g/l)}$

Portanto o aumento de acidez no sistema foi devido ao aumento da acidez produzida em cada ciclo.

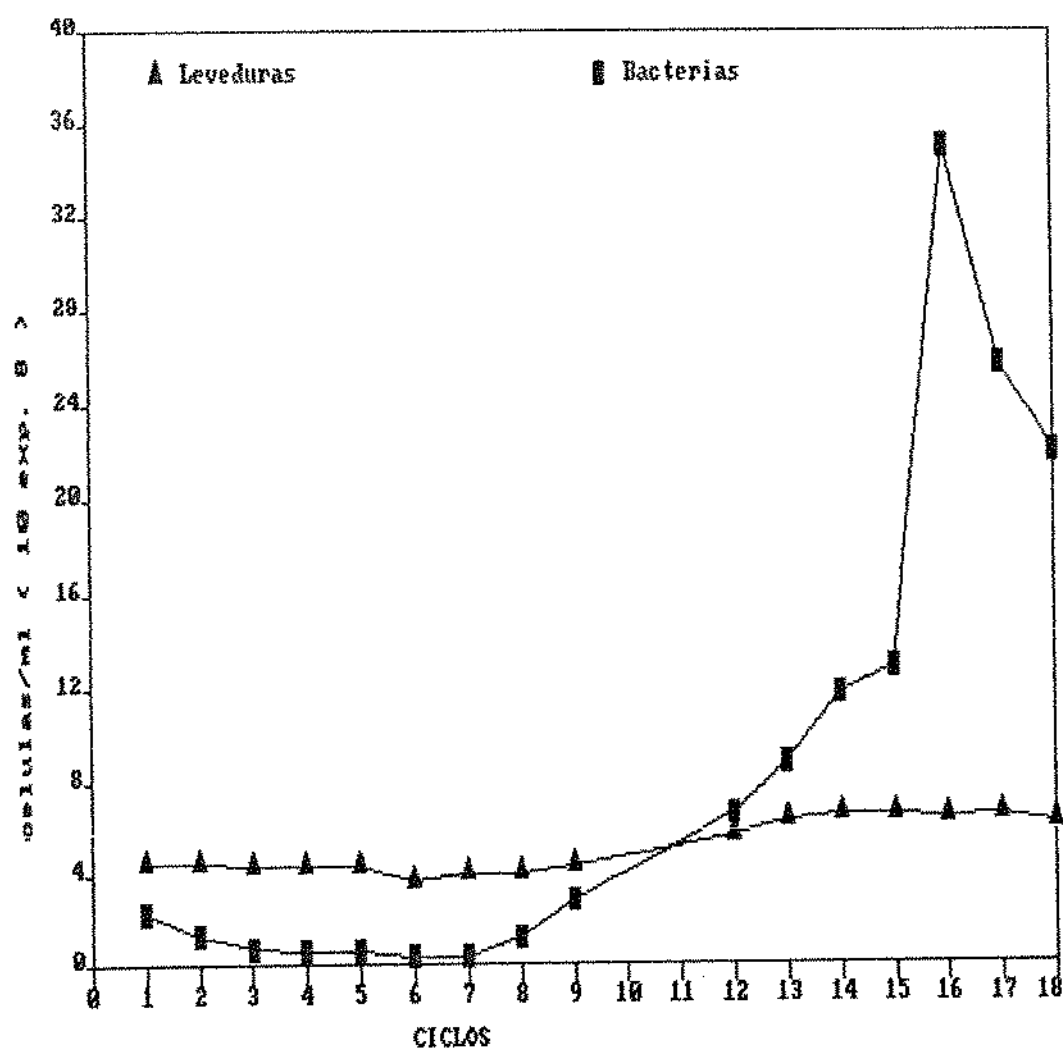


FIGURA 27 - Número de células de leveduras e bactérias no inóculo para os 18 ciclos.

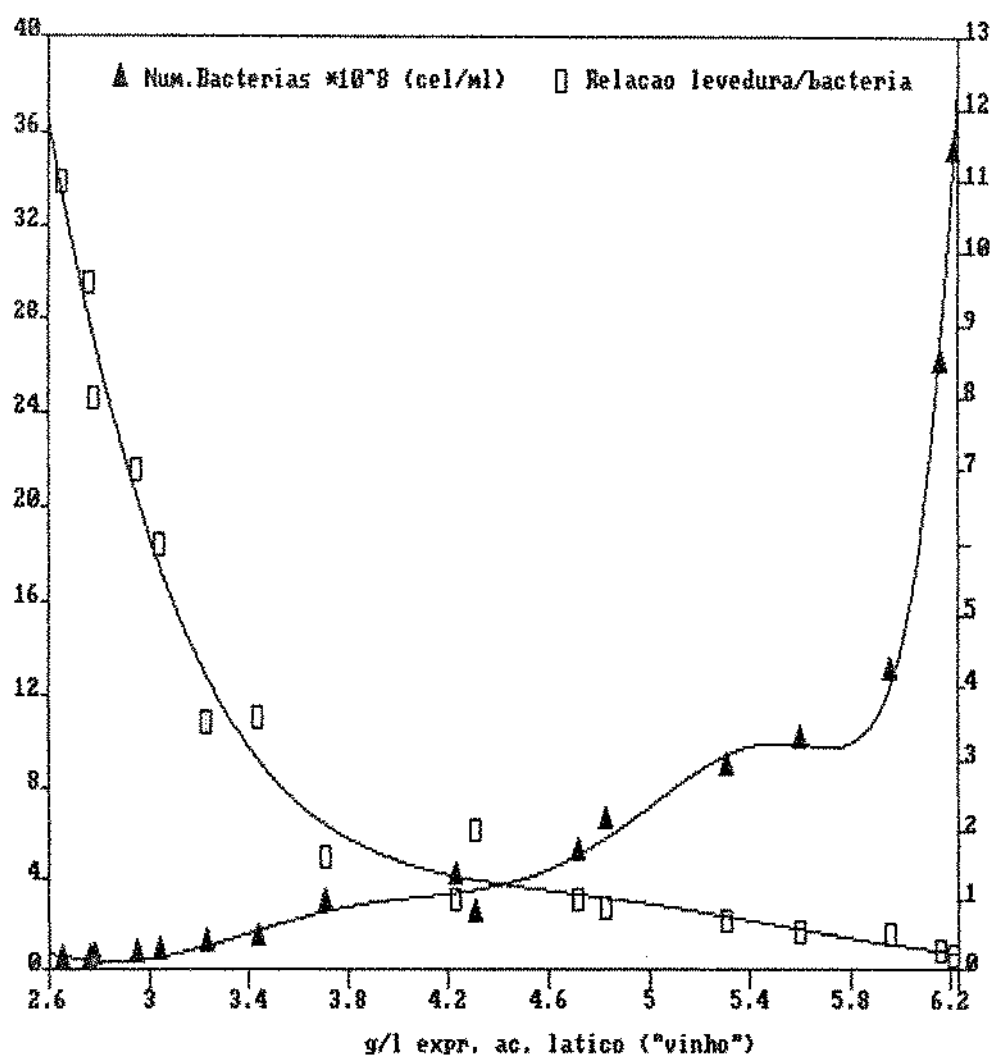


FIGURA 28 - Número de células de bactérias lácticas no inóculo e relação levedura/bactéria em função da acidez total do "vinho", expressa em ácido lático.

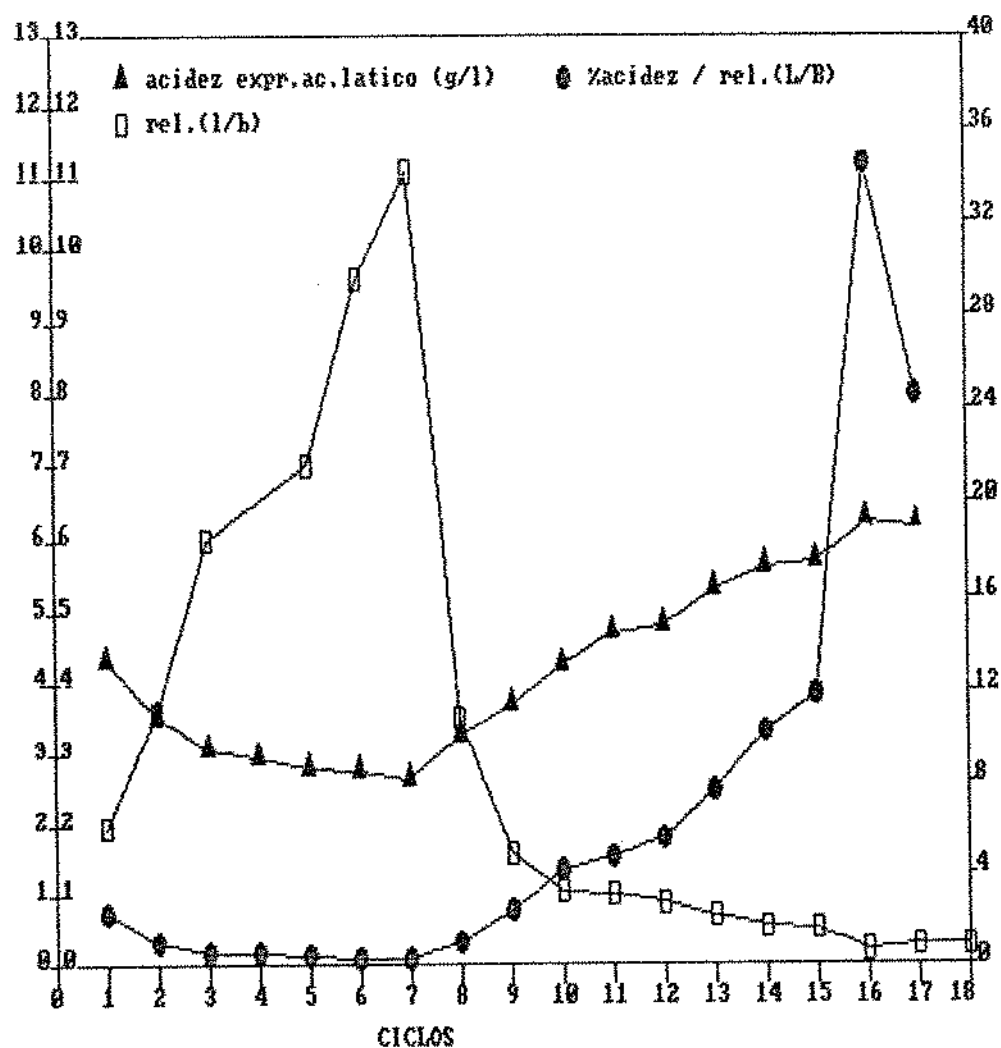


FIGURA 29 - Acidez total, relação levedura/bactéria e o quociente entre o percentual de acidez total e a relação levedura/bactéria, para os 18 ciclos.

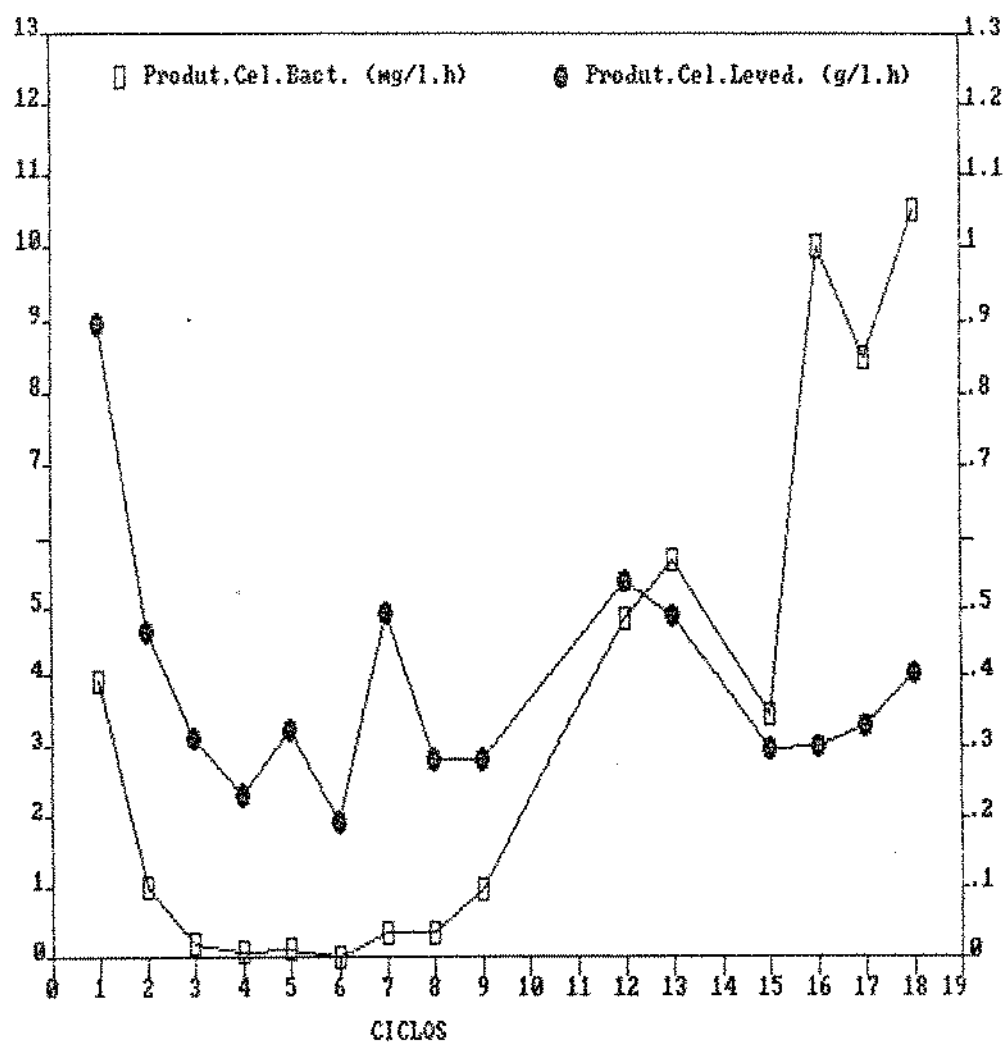


FIGURA 30 - Produtividade de células de leveduras e bactérias para os 18 ciclos.

Quanto ao brotamento das células de leveduras, pôde-se constatar uma redução significativa entre a fase com menor contaminação (1o ao 5o ciclo) e a fase final (12o ao 18o ciclo) onde o número de bactérias e a acidez eram os mais elevados.

A formação de brotos vivos (tabela 41 e figura 31), inicialmente caiu até o 4o ciclo de 10,3 para 3,70%, subiu bruscamente a partir do 5o ciclo (19,2%) e manteve-se entre 32 a 39% a partir do 6o até o 13o ciclo. A partir daí, foi verificada uma queda elevada e permanente com o menor valor no 17o ciclo (10,8%).

A porcentagem de brotos mortos mostrou-se em ascensão desde o início até o fim dos ensaios, aumentando de forma permanente (tabela 41 e figura 31). A análise do perfil da formação de brotos vivos, e dos que morreram, demonstrou que a diminuição de brotos vivos verificada nos últimos ciclos, não foi devido a uma queda na reprodução, mas ao aumento da incidência de brotos que morriam, que nos ciclos finais atingiu os valores mais elevados, próximos dos encontrados na porcentagem de brotos vivos referente ao período de estabilidade desse último. Esse fato pôde explicar a elevada densidade celular total ainda existente nos últimos ciclos, já que células moribundas, brotos mortos e células com baixa viabilidade também foram quantificadas na leitura de turbidez. Isso, juntamente com sujeira (flocos negros) presente no caldo de fermentação, refletiu no parâmetro produtividade de células de leveduras (figura 30), tornando-o duvidoso como índice de reprodução e crescimento neste trabalho.

Analisando a relação entre brotos vivos e mortos percebeu-se também a estabilização deste índice a partir do 3o até o

12o ciclo, na faixa de aproximadamente 1 a 3 brotos vivos para cada broto que morria (tabela 41 e figura 32).

A partir do 13o ciclo até o 18o ciclo, ocorreu uma contínua e gradativa queda nesta relação, baixando de 1,8 para 0,34. Nesta fase a contaminação bacteriana e a acidez foram as mais elevadas e o pH do vinho, o mais baixo.

O quociente entre a concentração (g/l) de acidez total do vinho, expressa em ácido láctico e a relação levedura/bactéria (tabela 41 e figura 29), demonstrou ser um bom indicativo do efeito da acidez e da contaminação bacteriana sobre as condições vitais da levedura.

Até o 8o ciclo este índice mostrou-se inferior a um (excessão ao 1o ciclo). Após ultrapassar a unidade, houve um sério comprometimento das condições vitais da célula de levedura, principalmente nos ciclos finais, demonstrado anteriormente quanto aos parâmetros viabilidade e brotamento. Outro aspecto interessante deste índice é que ele torna-se bastante amplificado quando a relação numérica levedura/bactéria deixa de estar próxima da unidade. Segundo Stupiello e Horii (1981), em dornas saídas, a relação levedura/bactéria é mais favorável ao agente principal do processo, a levedura. Isso está de acordo com este índice apresentado com respeito a amplificação, quando o denominador (relação levedura/bactéria) ultrapassa a unidade. Para que este índice pudesse ter algum valor, em termos de prática industrial, deveria ser testado nas usinas e comprovado estatisticamente, o que fugiria do escopo deste trabalho.

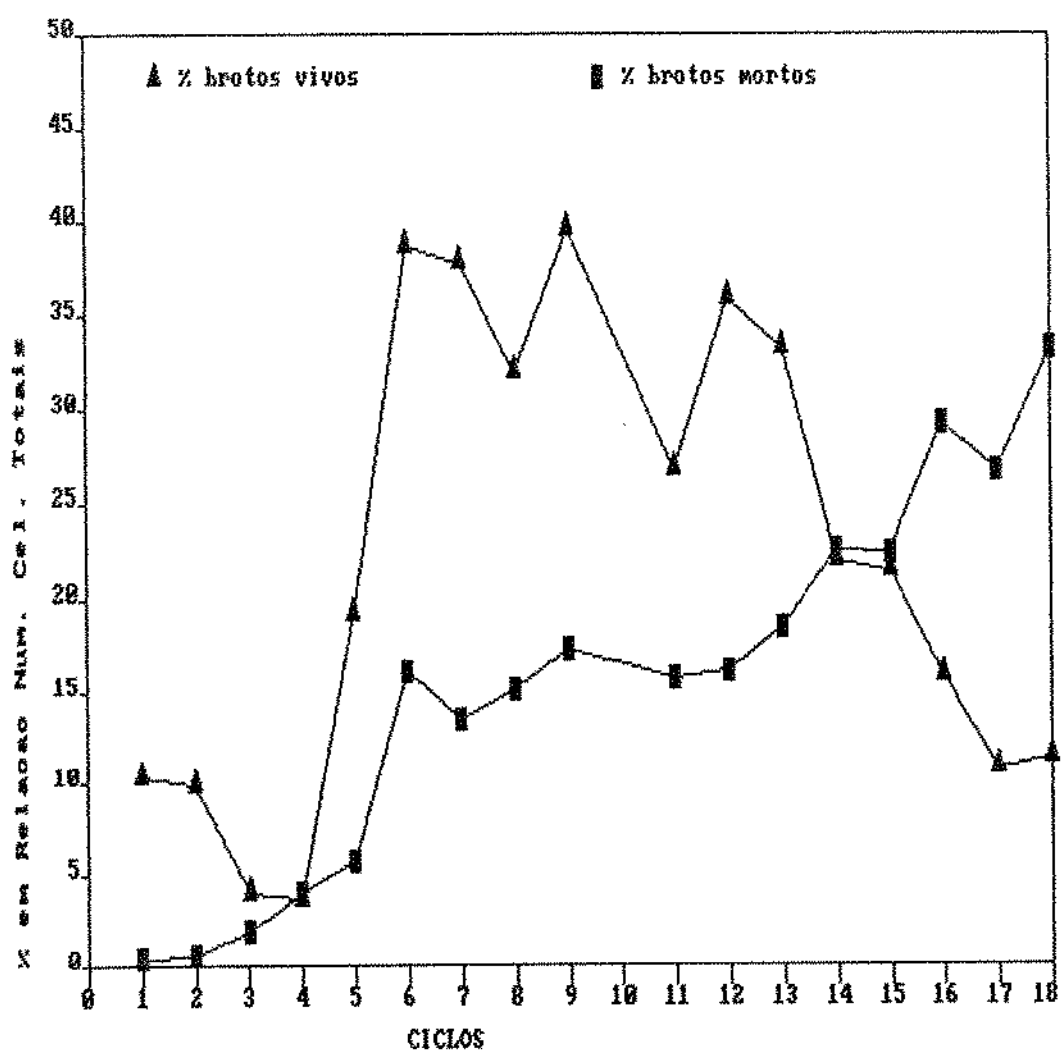


FIGURA 31 - Pocentagem de brotamento de leveduras após 9 horas de fermentação para os 18 ciclos.

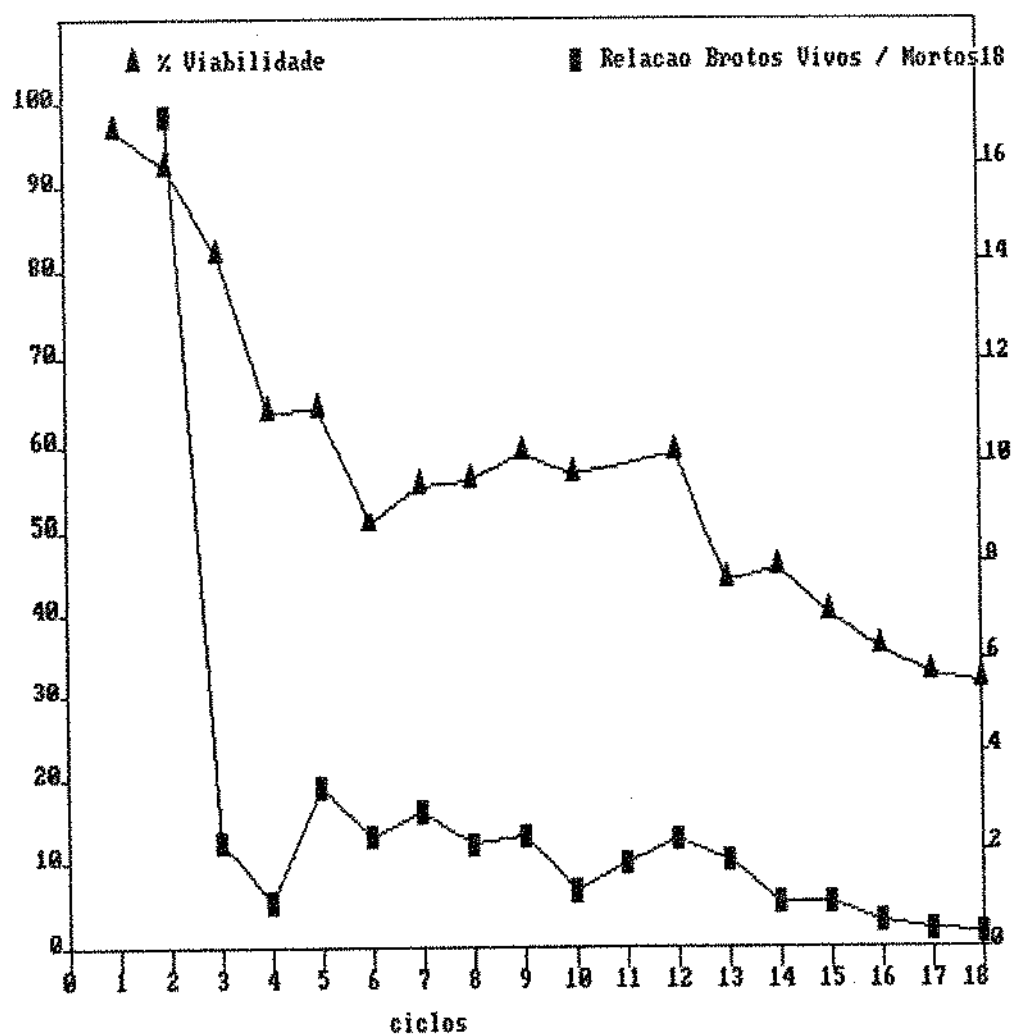


FIGURA 32 - Viabilidade das células de leveduras e relação de brotos vivos/mortos para os 18 ciclos.

A faixa de estabilização, tanto para a viabilidade como para o brotamento das células de leveduras, está intimamente relacionada com a forma de separação das células durante a etapa de centrifugação. Especialmente o brotamento é bastante afetado pelo funcionamento das centrífugas, cuja eficiência de separação é bastante prejudicada quando se usa caldo sem separação de sólidos por decantação (FINGUERUT et al., 1983). Neste experimento a forma de separação das células deve ter levado a alguma perda de viabilidade e brotamento devido exposição da massa celular à dessecação, já que a concentração da massa úmida de células separadas era elevada.

A análise estatística da acidez total do "vinho" em relação a viabilidade e brotamento demonstrou que:

a) Houve correlação entre a acidez total do "vinho" e viabilidade a nível alfa de decisão= 5%. O sinal negativo do coeficiente de correlação indicou que o aumento de acidez foi acompanhado da diminuição da viabilidade das células de leveduras, durante o período final do experimento, conforme os resultados abaixo:

$r = - 0,947$ (entre o 12o e o 17o ciclo)

r = coefic. correlação de "Pearson"

Teste t de "student": $t_{\text{calculado}} = 5,9 > t_{\text{crítico}}_{0,05} = 2,8$

Eq.reta: $y = 140,8 - 17,3 \times x$

onde x = acidez total "vinho" expr. ac.lático (g/l)

y = viabilidade (%) após 9 horas de fermentação

b) Houve correlação entre a acidez total do "vinho" e o quociente entre a porcentagem de brotos vivos e mortos a nível alfa de decisão = 5% na fase final do experimento. O sinal negativo do coeficiente de correlação indicou que o aumento de acidez foi acompanhado da diminuição da relação de brotamento. Isso representou a queda do crescimento das células de leveduras devido ao excesso de acidez, no período entre o 12o e o 17o ciclo, já que o crescimento, neste trabalho, está representado por este índice. Os resultados abaixo comprovam o exposto:

$r = - 0,986$ (entre o 12o e o 17o ciclo)

r = coefic. correlação de "Pearson"

Teste t de "student": $t_{\text{calculado}} = 7,5 > t_{\text{crítico}}_{0,05} = 2,8$

Eq.reta: $y = 8,564 - 1,31 \times x$

onde x = acidez total "vinho" expr. ac.lático (g/l)

y = Rel. de % brot.v/m após 9 horas de fermentação

No presente trabalho foi utilizado o parâmetro brotamento como sensor da reprodução e crescimento das leveduras pelos motivos já expostos anteriormente quanto a produtividade de células de levedura. A relação entre brotos vivos e mortos deixou evidente que a partir do 12o ciclo houve um decréscimo de forma contínua no crescimento até o final do experimento (figura 32), correlacionada com o aumento de acidez. A viabilidade das células

das leveduras também foi comprometida a partir deste ciclo, onde a concentração de acidez total no vinho, expressa em ácido láctico, foi de 4,83 g/l. Concentrações superiores a esse valor, nas condições do trabalho, foram responsáveis pela queda do crescimento e condições vitais da levedura (fermento). Neste ciclo a relação levedura/bactéria foi de 0,87 e o número de bactérias lácticas no inóculo = $8,5 \times 10^8$ cel./ml.

Vários autores detectaram uma queda no crescimento da levedura devido ao ácido láctico na fermentação alcoólica (SAMSON et al., 1955; MAIORELLA et al., 1983; DAESCHEL et al., 1988 e NGANG, 1989), porém existem divergências quanto a concentração de ácido que limita o crescimento. DAESCHEL et al. (1988) observaram uma inibição por ácido láctico a partir de 2,5 g/l, e com 5,0 g/l o crescimento da levedura foi totalmente interrompido em caldo de repolho na fermentação mista de *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus plantarum*. NGANG (1989) observou uma perda de 30% no crescimento com uma concentração de ácido láctico de 5g/l em fermentação alcoólica de açúcar de beterraba. MAIORELLA et al., (1983) constataram um decréscimo de 80% na população de leveduras cultivadas no melo com 40 g/l de ácido láctico. INOUE et al. (1962) em fermentações de "sake", observaram sobrevivência da levedura a concentrações de 20-28g/l deste ácido.

É difícil e impreciso estabelecer uma relação entre os dados de acidez obtidos no trabalho com os da literatura. Os diversos autores apresentaram resultados com grande variação quanto a influência do ácido sobre o crescimento das leveduras e isso foi devido a vários fatores, tais como: densidade da população de leveduras, pressão osmótica do melo, forma do ácido presente no

caldo de fermentação, pH, e outros fatores que podem agir de forma sinérgica ou antagônica com o ácido orgânico.

Quanto a densidade da população e pressão osmótica do meio de fermentação foram observados por NGANG (1989), variações significativas da inibição pela mesma concentração de ácido láctico presente. Quanto menor o número de células de leveduras e quanto maior a pressão osmótica do meio, mais intensa foi a inibição pelo ácido.

A forma não dissociada do ácido orgânico é a mais tóxica pois segundo SAMSON et al. (1955) e CASSID et al. (1987), a entrada na célula é feita por difusão simples, em meio contendo glicose, sendo favorecida por pHs mais baixos. Vários autores também evidenciaram o efeito sinérgico entre os ácidos orgânicos e o etanol, reduzindo de forma mais forte o crescimento da levedura. (PAMPULHA e LOUREIRO, 1989; VIEGAS et al., 1989; TEREZARAMOS e MADEIRA-LOPES, 1990).

3. PRODUÇÃO DE ETANOL

A velocidade média de consumo de açúcar, avaliada pela taxa de consumo de açúcar (P_s), sofreu uma grande queda, se comparados os primeiros 9 ciclos (média de 0,910 g/g.h), faixa onde foram obtidos os melhores resultados, e o 16o ciclo (0,488 g/g.h), com uma diminuição percentual de 53,6% (tabela 42). Este ciclo apresentou o pior resultado na fase entre o 12o e o 18o ciclo, fase onde foram encontrados os piores resultados.

A taxa de consumo de açúcar mostrou-se correlacionada com a produtividade de etanol produzido ao nível alfa

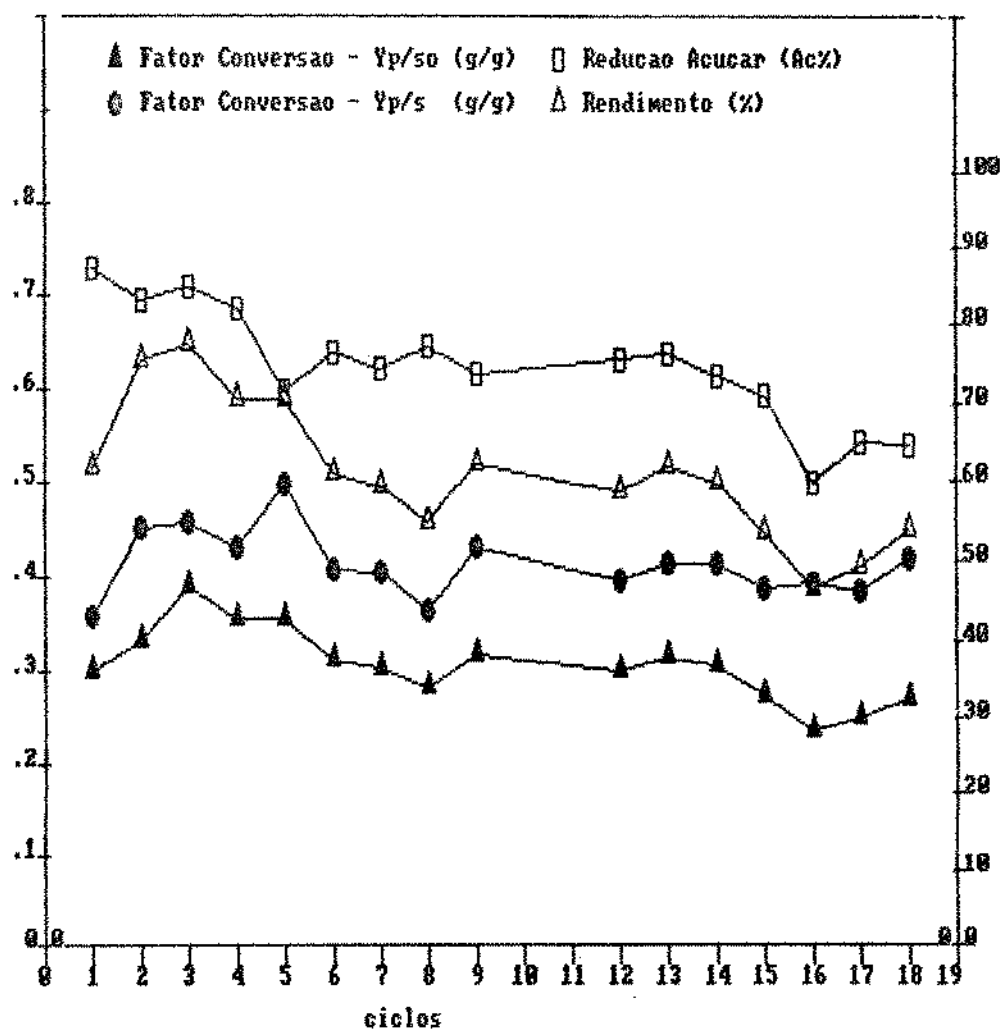


FIGURA 33 - Rendimento, fator de conversão Y_p/s e Y_p/s_o e porcentagem de açúcares totais consumidos, para os 18 ciclos.

de significância 5%, conforme os resultados abaixo:

$$r = -0,980 \text{ (entre o 2o e o 17o ciclo)}$$

r = coefic. correlação de "Pearson"

$$\text{Teste t de "student": } t_{\text{calculado}} = 5,9 > t_{\text{crítico}} 0,05 = 2,8$$

$$\text{Eq.reta: } y = -0,0157 + 0,439 * x$$

onde x = Taxa de consumo de açúcar em g/l.h

y = Produtividade de etanol produzido em g/g.h

Como ao longo dos 18 ciclos não houve grande variação da concentração etanólica, nem inibição pelo substrato e tão pouco alguma alteração nos constituintes nutricionais do meio, já que foi usado o mesmo lote de substrato para a fermentação e nas mesmas condições, essas variações foram atribuídas ao grande aumento de acidez e a consequente perda da velocidade de consumo de açúcar pela levedura. Isso também foi confirmado pelos resultados da leitura de amostras, tomadas com 24 horas nos ensaios de fermentação, que demonstraram que praticamente todo o açúcar foi consumido (ciclos: 12o ao 18o respectivamente, tabelas 24 a 37), indicando portanto, que a célula ainda possuía a capacidade de consumir o açúcar do meio, porém com uma menor velocidade.

Se as condições vitais da levedura foram prejudicadas nos 6 últimos ciclos pelo excesso de acidez, é razoável supor, que isso também afeta-se a capacidade bioquímica da célula em trabalhar de forma harmônica e eficiente, e isso foi indicado pela taxa de consumo de açúcar (tabela 42). Se uma menor quantidade de açúcar foi consumida em 10 horas de fermentação nos últimos ciclos, em relação aos primeiros, era de se esperar também que uma menor quantidade de etanol fosse produzida. Isso foi confirmado pela produtividade de etanol (Pe) que sofreu uma queda per-

centual semelhante a da taxa de consumo de açúcar (53,6%), diminuindo em 53,5% entre a média dos resultados dos primeiros 9 ciclos ($P_{em}=0,377$ g/g.h) e o 16o ciclo com $P_{em}=0,202$ g/g.h (tabela 41 e figura 34). Novamente foi considerado para efeito comparativo o 16o ciclo já que este foi o ciclo de maior acidez no vinho e o menor valor dos parâmetros relativos a produção de etanol e consumo de açúcar. Essa semelhança entre o percentual de queda dessas duas produtividades era esperada, pois houve correlação significativa entre elas. Há coerência nisso, já que a produção de álcool esta diretamente ligada ao consumo de açúcar pela leveza.

O fator de conversão Y_p/s_o apresentou-se igual ou superior a 0,3 até o 14o ciclo. A partir do 15o ciclo sofreu uma queda acentuada correlacionando-se com o aumento da acidez, conforme os resultados estatísticos abaixo:

$$r = -0,971 \text{ (entre o 13o e o 17o ciclo)}$$

r = coefic. correlação de "Pearson"

Teste t de "student": $t_{calculado}=5,9 > t_{crítico_{0,05}}=2,8$

$$\text{Eq.reta: } y = 0,7878 + 0,087 * x$$

onde x = acidez total "vinho" expr. ac.lático, g/l

y = fator de conversão Y_p/s_o .

O sinal negativo do coeficiente de correlação demonstrou que o aumento da acidez correspondeu a diminuição do fator de conversão Y_p/s_o , durante os ciclos finais.

A porcentagem de ART consumido demonstrou 3 nítidas fases: a primeira entre o 1o e o 4o ciclo onde obteve-se valores superiores a 80%; a segunda em que este índice se manteve numa faixa estável entre 72 a 76% entre os ciclos 5o até o 13o. E a

terceira fase onde este índice sofreu uma queda acompanhada do aumento de acidez, conforme os resultados abaixo:

$$r = - 0,92 \text{ (entre o 13o e o 17o ciclo)}$$

r = coefic. correlação de "Pearson"

Teste t de "student": $t_{\text{calculado}} = 4,0 > t_{\text{crítico}}_{0,05} = 2,6$

$$\text{Eq.reta: } y = 161,7 + 15,9 * x$$

onde x = acidez total "vinho" expr. ac.lático, g/l

y = porcentagem de ART consumido em 10 h. de ferm.

Novamente o coef. correlação apresentou sinal negativo e significância ao nível alfa de 5%, indicando que as variáveis em questão estão correlacionadas e de forma inversa, ou seja, o aumento de acidez foi acompanhado de diminuição do açúcar consumido nesta fase final do experimento, concordando com a taxa de consumo de açúcar.

O rendimento (R) apresentou comportamento semelhante ao índice que mede a porcentagem de ART consumido, mantendo-se entre o 2o e o 5o ciclo na faixa entre 71 a 77%. Do 6o até o 13o ciclo manteve-se numa média de 60% e a partir deste último ciclo até o 17o, houve uma correlação inversa com aumento de acidez e perda de rendimento, conforme os resultados estatísticos abaixo:

$$r = - 0,98 \text{ (entre o 13o e o 17o ciclo)}$$

r = coefic. correlação de "Pearson"

Teste t de "student": $t_{\text{calculado}} = 4,0 > t_{\text{crítico}}_{0,05} = 2,6$

$$\text{Eq.reta: } y = 150,8 + 16,5 * x$$

onde x = acidez total "vinho" expr. ac.lático, g/l

y = rendimento (%)

Nesta fase final o rendimento baixou sensivelmente culminando com o valor mais baixo (46,7%) no 18o ciclo.

O fator de conversão Y_p/s_o , a porcentagem de ART consumido e o rendimento (tabela 43 e figura 33) tiveram um comportamento semelhante quanto ao início da inibição pelo ácido. Os tres foram mais fortemente inibidos a partir do 15o ciclo, quando a acidez, expressa em ácido láctico, foi de 6 g/l. A relação levedura/bactéria= 0,5 ,ou seja, 2 bactérias para cada levedura. O número de bactérias foi de $1,2 \times 10^9$ cel/ml no inóculo.

Essa perda do rendimento alcoólico verificada na fase final onde a acidez era elevada (6g/l), também foi verificada por AMORIM e OLIVEIRA (1982), que encontraram uma correlação direta entre bactérias em forma de bastonetes e acidez, e estes se correlacionaram inversamente em relação ao rendimento. Valores de acidez em torno de 5 a 6g/l, expressas em ácido sulfúrico, foram responsáveis por perdas no rendimento alcoólico resultando em valores em torno de 60% em pesquisa feita em usinas.

SERRA et al. (1979), analisando a infecção microbiana em usina produtora de etanol, detectaram perda de 15% no rendimento alcoólico devido a bastonetes gram positivos. Segundo Dolan (cit.em Priest e Pleasants, 1987) se fermentações para produção de "whisky" forem muito contaminadas por lactobacilos (mais do que 10^8 cel./ml.) ocorre redução inaceitável do rendimento alcoólico.

Como o fator de conversão (Y_p/s) foi baseado no cálculo pelo açúcar consumido pela levedura, não foi afetado e não serviu como um bom parâmetro de avaliação do processo com respeito a infecção láctica. Esse parâmetro indicou que o ácido parece ter um efeito inibidor muito maior na velocidade de consumo do substrato, do que na forma de conversão desse último em produto.

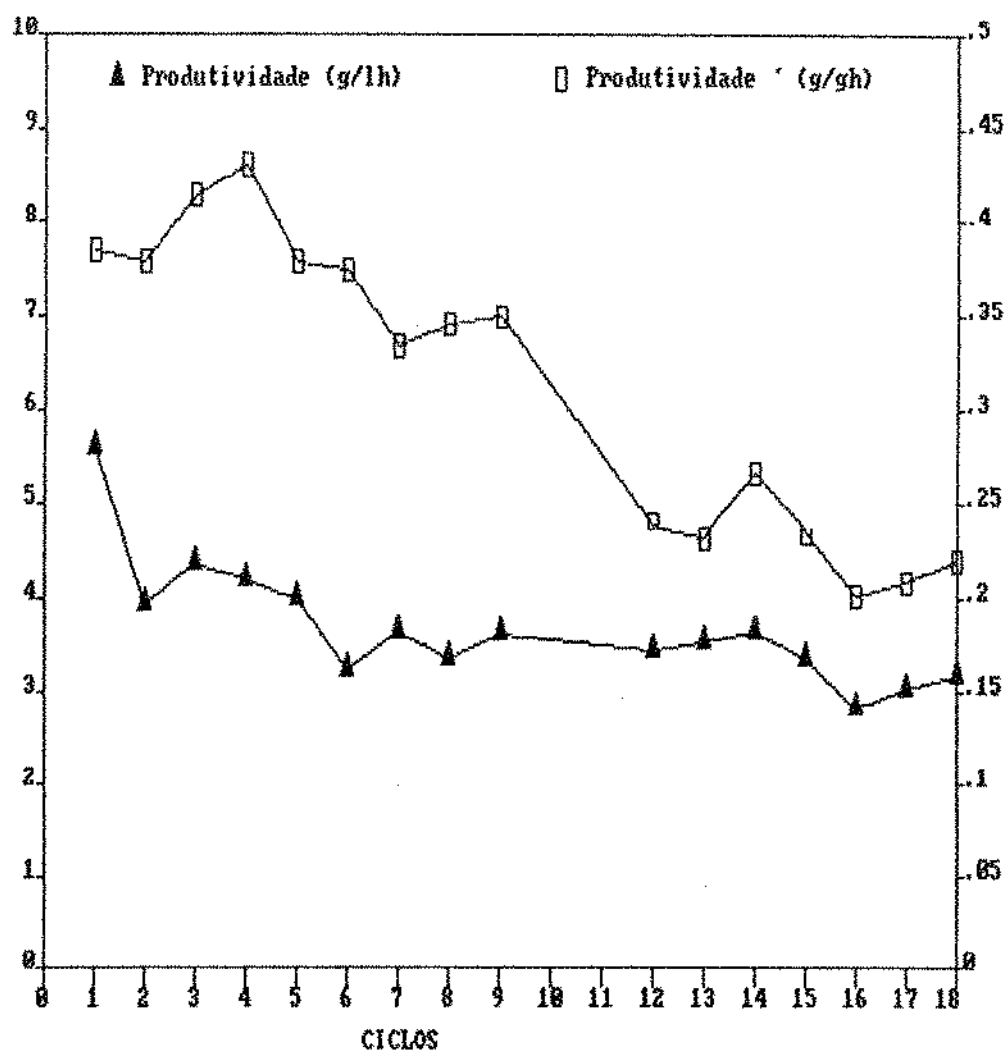


FIGURA 34 - Produtividade de etanol para os 18 ciclos.

Os mesmos fatores que podem influenciar na ação dos ácidos orgânicos sobre as condições vitais da célula de levedura, também atuam sobre a cinética da produção de etanol. O efeito do ácido sobre a produção de etanol é mais complexo do que em relação as características vitais da levedura. A ação do ácido beneficia, até uma certa faixa de concentração, a produção de etanol pela levedura. Isso foi evidenciado por NGANG (1989) com ácido láctico e MAIORELLA (1983) com ácido acético, sendo que este último conseguiu aumentar a produtividade em até 50%, trabalhando com uma concentração limitada de ácido. Acima de uma determinada concentração, o efeito da acidez se inverte causando uma forte inibição da produtividade de etanol, como foi demonstrada no ciclo final deste trabalho.

CONCLUSÕES

1. Os resultados da taxonomia e os dados obtidos da literatura indicam as bactérias lácticas, como o grupo mais frequentemente encontrado e adaptado às condições das dornas de fermentação das destilarias de álcool. O *Lactobacillus fermentum* é uma das bactérias mais comumente encontradas, resistente a concentração de 10% (v/v) de etanol, pode possuir a capacidade de flocular o fermento comercial e, possivelmente, é um dos principais agentes contaminantes causadores dos diversos distúrbios nas dornas das usinas, devido a infecção bacteriana.

2. A acidez total no "vinho" esta inversamente correlacionada com a relação levedura/bactéria e diretamente correlacionada com o número de células de bactérias lácticas, até um certo limite, a partir do qual o aumento do número de bactérias lácticas e a diminuição da relação levedura/bactéria, não correspondem mais ao aumento da acidez total.

3. O quociente entre a acidez total do "vinho" e a relação levedura/bactéria parece ser um bom indicador do efeito da acidez e da contaminação por bactérias lácticas sobre a levedura (fermento) e na produção de etanol.

4. A partir de concentrações superiores a 4,8 g/l no "vinho", expressas em ácido láctico, há uma correlação inversa: entre acidez e a relação entre brotos de leveduras vivos e mortos, e entre acidez e viabilidade das células de leveduras. Nesse trabalho esse índice de acidez é acompanhado de uma relação leveduras/bactérias = 0,87 e o número de bactérias lácticas = $6,5 \times 10^8$

levar a queda do crescimento e das condições vitais das células de leveduras.

5. A taxa de consumo de açúcar e a produtividade de etanol produzido estão correlacionadas e podem sofrer quedas maiores do que 50%, pelo excesso de acidez no sistema, se não houver controle da contaminação. O ácido apresenta uma forte influência na velocidade de consumo de açúcar pela levedura, mas não na forma de conversão do substrato em produto.

6. O rendimento, o fator de conversão Y_p/s_o e a porcentagem de ART consumido correlacionam-se inversamente à acidez total no "vinho" e são fortemente inibidos a partir da concentração de 6,0 g/l, expressa em ácido láctico, o que representa neste trabalho uma relação levedura/bactéria = 0,5 e $1,2 \times 10^9$ cel./ml. no inóculo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIBA, S.; NAGAI, S. e NISHIZAWA, Y. 1976. Fed batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*: a perspective of computer control to enhance the productivity in Baker's Yeast cultivation. *Biotech. Bioeng.*, 18: 1001-1016.
- ALMEIDA, J. R. 1940. Alcool e destilaria. Piracicaba, Nathanael dos Santos. *Mineogr.* vol. 5, pag. 55-85.
- ALMEIDA, S. B. G. 1980. Fermentação alcoólica: ensaios em batelada convencional e em batelada alimentada. Tese de Mestrado. Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro. R.J.
- ALTERTHUM, F.; CRUZ, M.R. M.; VAIRO, M. L. R. e GAMBASSI, D. M. 1984. Efeito dos microorganismos contaminantes da fermentação alcoólica nas microdestilarias. *STAB*, 3(1): 42-49.
- ALTERTHUM, F.; CRUZ, M. R. M.; VAIRO, M. L. e GAMBASSI, D. M. 1985. Influência da penicilina v-ácida no controle das infecções bacterianas na fermentação alcoólica. *Rev. Microbiol.*, 16(2):138-142.
- AMORIM, H.V. e OLIVEIRA, A.J. 1981. Infecção na fermentação: como evitá-la. *Alcool and Açúcar*. 5: 12-14.
- AMORIM, H.V. e OLIVEIRA, A.J. 1982. Infecção, problema sério na produção de álcool. *Anais do Segundo Congresso Nacional da Sociedade de Técnicos Açúcareiros do Brasil*, 4: 158-168.
- ANDREASON, A.A. e STIER, T.J.B. 1954. Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae* II unsaturated fatty acid requirement for growth in defined medium. *J.Cell. Comp. Physiol.* 43: 271-281.

- ANÔNIMO. 1971. Problems in processing deteriorated cane. *The Sugar J.* 34(4):22-24.
- AYALA, H. G.; LIMPIAS, D. B.; DELFINI, A. e GARGIULO, C. A. 1977. Action of some bactericides on raw sugarcane juice. ISSCT, 16th Congress, 3: 2909-2922.
- BARBOUR, E. A. e PRIEST, F. G. 1988. Some effects of *Lactobacillus* contamination in scotch whisky fermentations. *J. Inst. Brew.* 94: 89-92.
- BAYMA, C. 1973. O caldo de cana industrial na fase de defecção. *Brasil Açúcareiro*, LXXXII(4): 373-376.
- BEAUCHAT, L. R. 1983. Influence of water activity on growth, metabolic activities and survival of yeasts and molds. *J. of Food Protection*, 46(2): 135-141.
- BEAVAN, M. J.; CHARPENTIER, C. e ROSE, A. H. 1982. Production and tolerance of ethanol in relation to phospholipid fatty-acyl composition in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 431. *J. Gen. Microbiol.*, 128:1447-1445.
- BEVAN, D. e BOND, J. 1971. Micro-organisms in field and mill - a preliminary survey. *Proc. Ad. Soc. Sugar Cane Technol.*, 38th Conference, 137-143.
- BOUDAREL, M.J. e RAMIREZ, A. 1984. Détermination des différentes souches bactériennes contaminantes du jus de betterave et du mout fermenté en distillerie agricole. *Ind Alim. Agricole*, 101:(1-2), 5-11.
- BRYAN-JONES, G. 1975. Lactic acid bacteria in distillery fermentation. In: CARR, J. G.; CUTTING, C. V. and WHITING, G. C. eds. *Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food*. London, Academic Press, pag. 165-175.

- BUENO NETO, C. L. 1982. Influência inicial de células e do tempo de enchimento da dorna no processo descontínuo alimentado de fermentação alcoólica de mosto de melaço de cana-de-açúcar. Tese de Mestrado. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. S.P.
- BUTTKE, T.M., JONES, S.D. e BLOCH, K. 1980. Effect of sterol side chains on growth and membrane fatty acid composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 144: 124-130.
- BUTTKE, T.M. e PYLE, A.C. 1982. Effects on unsaturated fatty acid deprivation on neutral lipid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 152: 747-756.
- CAMHI, J. D. 1979. A fermentação alcoólica e sua otimização. *Brasil Açucareiro*, XCIV(2): 126-132.
- CASEY, G.P.; MAGNUS, C.A. e INGLEDEW, W.M. 1984. High-gravity brewing: effects of nutrition on yeast composition, fermentative ability, and alcohol production. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 639-646.
- CASEY, G. P.; INGLEDEW, W. M. e STEINKRAUS, K. H. 1986. Ethanol tolerance in yeasts. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 13(3): 219-280.
- CASSIO, F.; LEÃO, G. e van UDEN, N. 1987. Transport of lactate and other short-chain monocarboxylates in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53(3): 509-513.
- CENTRO TECNOLÓGICO COPERSUCAR . 1983a. Controle microbiológico na fabricação de açúcar e álcool. *Boletim Técnico Copersucar*, 22: 2-17.

- CENTRO TECNOLÓGICO COPERSUCAR. 1983b. Manual do controle microbiológico da usina de açúcar e álcool. Série Industrial no 5.
- CIFTCI, T.; CONSTANTINIDES, A. e WANG, S. S. 1983. Optimization of conditions and cell feeding procedures for alcohol fermentation. *Biotech. Bioeng.*, XXV(8): 2007-2023.
- CLAUS, D. e BERKELEY, R. C. W.. 1986. Genus *Bacillus*. In: *Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology* vol. II, Section 13, 1105-1139. SNEATH et alii eds., Williams and Wilkins, Baltimore.
- CORREY, J. E. L. 1978. A review - possible sources of ethanol ante-and post mortem: its relationship to the biochemistry and microbiology of decomposition. *J. Appl. Bacteriol.*, 44(1):1-56.
- CROSS, W. F. 1966. The problem of frozen cane in Argentina. *Sugar J.*, 8: 8-14
- CURRAN, H.R.; ROGER, L.A. e WHITTIER, E.O. 1983. *J. Bacteriol.* 25: 595-621. Citado por SKERMAN, V.B.D. ed., 1969, In: *Abstracts of Microbiological Methods*, 355.
- DAHIYA, D. S.; BARDIYA, M. C.; DHAMIJA, S. S.; SHARMA, S. e TAURO, P. 1980. Alcohol production from cane molasses - effect of fermentation conditions on yeast recycling. *International Sugar J.*, 82(979): 203-206.
- D'AMORE, T. e STEWART, G. G. 1987. Ethanol tolerance of yeast. *Enzyme and Microbiol. Tecnol.*, 9(6): 322-330.
- DAESCHEL, M. A.; FLEMING, H. P. e Mc FELTSERS, R. F. 1988. Mixed culture fermentation of cucumber juice with *Lactobacillus plantarum* and yeasts. *J. Food Science*, 53(3): 863-864.

- DASARI, G., KESHAVERZ, E.; CONNOR, M. A. e PAMMENT, N. B. 1985. A reliable method for detecting the intracellular accumulation of fermentation products: application to intracellular ethanol analysis. *Biotechnol. Letters*, 7(8): 541-546.
- DOMBEK, K. M. e INGRAM, L. O. 1986a. Determination of the intracellular concentration of ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Appl. Environm. Microbiol.*, 51(1): 197-200.
- DOMBEK, K. M. e INGRAM, L. O. 1986b. Magnesium limitation and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52(5): 975-981.
- DOMBEK, K. M. e INGRAM, L. O. 1987. Ethanol production during batch fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*: changes in glycolytic enzymes and internal pH. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53(6): 1285-1291.
- DUNCAN, G. L. e COLMER, A. R. 1964. Coliforms associated with sugarcane plants and juices. *Appl. Microbiol.*, 12(2): 173-177.
- DUNN, I. J.; MOR, J. R. 1975. Variable volume continuous cultivation. *Biotechnol. Bioeng.*, 17: 1805-1822
- EDWARDS, V. H.; GOTTSCHALK, M. J.; NOOJIN, A. Y.; TUTHILL, L. B. e TANNAHILL, A. L. 1970. Extend culture: the growth of *Candida utilis* at controlled acetate concentrations. *Biotech. Bioeng.*, 12: 975-989.
- EGAN, B. T. 1965. The infection process in sour storage rot. *Proc. Qd. Soc. Sugar Cane Technol.*, 32 nd. Conf., 21-24.
- EGAN, B. T. 1968. Post-harvest deterioration losses in sugar cane in Queensland. *Proc. Congress ISSCT*, 13th, 1729-1734.

- ENDO, I. e INQUE, I. 1977. A fundamental research of fed-batch fermentation. *Topics in Biochemical Engineering*, 2(1): 583-588.
- ESSER, K. e KARSCH, T. 1984. Bacterial ethanol production: advantages and disadvantages. *Process Biochem.*, 19(3): 116-121.
- ESSER, K. e SCHMIDT, U. 1982. Alcohol production by biotechnology. *Process Biochemistry*, 17(3): 46-49.
- FAVILLE, L. W. 1947. A study of gum - forming bacteria isolated from cane juice. Louisiana. Thesis (M.S.) Louisiana State University.
- FERRARI, S. E. e RODELLA, A. A. 1977. Ocorrência de dextrana em cana-de-açúcar. *Brasil Açucareiro*, XC(5): 303-306.
- FIECHTER, A.; FUHRMANN, G. F. e KAPPELI, O. 1981. Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. In ROSE, A. H. and MORRIS, J. G. eds. *Advances in Microbial Physiology*. London. Academic Press, 22:123-183.
- FIELDS, M. 1975. Método para o estudo das bactérias termófilas esporulantes com ênfase a solo e esterilização em indústrias de alimentos e saúde. Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia - Campinas, SP.
- FINGUERUT, J.; LUCREDI, H. A. e ROSSELL, C. E. V. 1983. Fermentação alcoólica em usinas cooperadas: evolução e perspectivas. *Boletim Técnico Copersucar*, 23: 8-11.
- FINGUERUT, J.; LUCREDI, H. A.; LEIMER, K. H. e ROSSELL, C. E.V. 1985. Estequiometria da fermentação alcoólica a partir do caldo de cana, *Boletim Técnico Copersucar*, 33: 45-48.

- FINGUERUT, J.; LUCREDI, H.A.; LEIMER, K. H. e ROSSEL, C.E.V. 1986. Controle microbiológico do processo de fermentação alcoólica. Boletim Tecnológico Copersucar, 34: 22 a 26.
- FURLETTI, M. E. M.; OLIVEIRA, M. C. F. L. e ANGELIS, D. F. 1981. Perspectivas do uso de biocidas não convencionais na desinfecção da fermentação alcoólica. Brasil Açucareiro, XCVII(3): 219-223.
- GALLI, Z. F. 1961. II Semana da fermentação alcoólica: fermentação do mel final das usinas de açúcar. Piracicaba, Instituto Zimotécnico, 2: 297-304.
- GALLO, C. R. 1989. Contaminantes bacterianos em mosto e dornas de fermentação alcoólica. In: EGUCHI, S.; YOKOYA, F.; CANHOS, V. P. e GALLO, C. R. eds. Pontos Críticos Microbiológicos em Usinas de Açúcar e Alcool. Campinas, Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello.
- GARVIE, E. I. 1975. Some properties of gas-forming lactic acid bacteria and their significance in classification. In: CARR, J. G.; CUTTING, C. V. and WHITING, G. C. Lactic Acid Bacteria in Beverages and food. London, Academic Press. Section 11, p. 339-349.
- GARVIE, E. I. 1984. Separation of species of the genus Leuconostoc and differentiation of the leuconostocs from the other lactic acid bacteria. Methods in Microbiology. London, Academic Press. v.11, section 16, p. 147-178.
- GARVIE, E. I. 1986. Genus Leuconostoc. In: SNEATH, P. H. A. et alii eds. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore, editora Williams and Wilkins. 90 ed., v. 2, Section 12, p. 1071-1975.

- GUIJARRO, J. M. e LAGUNAS, R. 1984. *Saccharomyces cerevisiae* does not accumulate ethanol against a concentration gradient. *J. Bacteriol.*, 160: 874-878.
- GHOOSE, T. K. e TYAGI, R. D. 1979. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate: batch versus continuous systems. *Biotech. Bioeng.*, 21: 1387-1400.
- HARRIGAN, W. F. e McCANCE, M. E. 1973. *Laboratory Methods in Microbiology*. Academic Press, London, 4 ed.
- HAYASHIDA, S.; DER FENG, D. e HONGO, M. 1974. Function of the concentration alcohol - producing factor. *Agric. Biol. Chem.*, 38(10): 2001-2006.
- HAYASHIDA, S.; DER FENG, D. e HONGO, M. 1975. Physiological properties of yeast cells grown in the proteolipid - supplemented media. *Agric. Biol. Chem.*, 39(5): 1025-1031.
- HONIG, P. 1969. Melazas. In: *Principios de tecnología azucarera*. México, Continental. Vol. 3, pag. 425-575.
- HOSLER, P. e JOHNSON, M. J. 1953. Penicillin from chemically defined media. *Ind. Eng. Chemistry*, 45(4): 871-874.
- INGRAM, L. O. e BUTTKE, J. M. 1984. Effects of alcohols on microorganisms. *Advances in Microbial Physiology*, 25: 253-300.
- INGRAM, M. 1975. The lactic acid bacteria - a broad view. In CARR, J. G.; CUTTING, G. V. and WHITING, G. C. eds. *Lactic Acid Bacteria in Beverages and food*. London, Academic Press. 4th Long Ashton Symposium 1973, 1-13.
- INOUE, T.; TAKAOKA, Y. e HATA, S. 1962. Studies on sake yeasts: on the tolerance of yeast to lactic acid. *J. Ferm. Technol.* 40: 505-511.

- JONES, R. P.; PAMMENT, N. e GREENFIELD, P. F. 1981. Alcohol fermentation by yeasts- the effect of environmental and other variables. *Process Biochemistry*, 16(1): 42-49.
- KAJI, D. A. 1989. Influência da temperatura e Infecção láctica na fermentação alcoólica. Tese de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. UNICAMP, Campinas.
- KANDLER, O. e WEISS, N. 1986. Regular Nonsporing Gram Positive Rods. In: *Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology*. Vol. 11, Section 14, 1208-1234. Sneath et all eds, Williams and Wilkens, Baltimore.
- KELLER, R. e DUNN, I.J. 1978. Fed batch microbiol: models, errors and applications. *J. Appl. Chem. Biotechnology*, 28: 508-514.
- KOCK, A.L. 1970. Turbidity measurements of bacterial cultures in some available commercial instruments, *Anal. Biochem.* 38: 252-259.
- LAFON-LAFOURCADE, S.; GENEIX, C. e RIBEREAU-GAYON, P. 1984. Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeasts and their elimination by yeasts ghosts. *Appl. Env. Microbiol.* 47(6): 1246-1249.
- LAURE, F.; LAFON-LAFOURCADE, S. e RIBEREAU-GAYON, P. 1984. Relationship between the inhibition of alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and the activities of hexokinase and alcohol dehydrogenase. *Biotechnol. Letters*, 6(10): 687-692.
- LEÃO, C. e van UDEN, N. 1982. Effects of ethanol and other alkanols on the glucose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.*, XXIV, 2601-2604.

- LEE, S.S.; ROBINSON, F.M.E. e WANG, H.Y. 1981. Rapid determination of yeast viability. *Biotech. Bioeng. Symp.* 11: 641-649.
- LETOURNEAU, L. e VILLA, P. 1987. *Saccharomyces* yeast growth on beet molasses effects of substrate concentration on alcohol toxicity. *Biotechnol. Letters*, 9(1): 53-58.
- LIM, H. C.; CHEN, B. J. e GREACAN, C. C. 1977. An analysis of extended and exponentially-fed-batch cultures. *Biotech. Bioeng.*, 19: 425-433.
- LIMA, U. A.; GOLDDNI, J. S.; CEREDA, M. P. e SOUZA, L. G. 1974. Ocorrência de microorganismos em caldo bruto, caldo misto e água de embebição em uma usina de açúcar de cana. *Brasil Açucareiro*, 4: 337-343.
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E. e BORZANI, W. 1982. Produção de Etanol. In: LIMA, U. A. et alii eds. *Biotecnologia. Tecnologia das Fermentações*. São Paulo, Edgard Blucher. v. 1, p. 48-68.
- MAGNANI, J. L.; VALLEZI-FILHO, A. e ROSSEL, C. E. 1985. Tecnologia de produção de High Test Molasses. *Boletim Técnico Copersucar* n.29, pg. 12-13.
- MAIORELLA, B. BLANCH, H. W. e WILKE, C. R. 1983. By Product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech. Bioeng.*, XXV, 103-121.
- MAN, J.C.; ROGOSA, M. e SHARPE, M.E. 1960. A medium for the cultivation of *Lactobacillus*. *J. Appl. Bacteriol.* 23: 130-135.
- Mac FADDIN, J.F. 1980. *Biochemical Tests for identification of medical bacteria*. 2nd. Ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Mac MASTER, L. D. e RAVNO, A. B. 1975. Sucrose loss in

diffusion with reference to the thermophilic bacteria and lactic acid. Proc. South African Sugar Technol. Ass. 49: 49-52.

Mac MASTER, L. e RAVNO, A.B. 1977. The occurrence of lactic acid and associated micro-organisms in cane sugar processing. ISSCT - Proceed. 16o Congr. Vol. 3

MAYEUX, P. A. 1960. Some studies on the microbial flora of sugar cane. Louisiana. Teels M.S. Louisiana State University. Citação em SILLIKER et alii (1980).

MAYEUX, J.V. e COLMER, A.R. 1961. Seletive medium for Leuconostoc detection. J. Bacteriol. 81: 1019-1010.

MILLAR, D. G.; GRIFFITHS-SMITH, K; ALGAR, E. e SCOPES, R. K. 1982. Activity and stability of glycolytic enzymes in the presence of ethanol. Biotechnology. Lett. 4(9): 601-606.

MORITZ, V. e MEIRELLES, D. F. 1978. Fermentação em batelada alimentada e sua aplicação a substratos não convencionais para produção de biomassa. Relatório ao CEPG/UFRG.

MOULIN, G.; BOZE, H. e GALZY, P. 1980. Inhibition of alcoholic fermentation by substrate and ethanol. Biotech. Bioeng., 22: 2375-2381.

NAGODAWITHANA, T. W. e STEINKRAUS, K. H. 1975. Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in "Rapid Fermentation". Appl. Environ. Microbiol., 31(2): 158-162.

NEVES, L. B. 1938. Tecnologia da fabricação do álcool. Rev. Bras. Química, 3: 89-134.

NGANG, J.J.E.; LETOURNEAU, F. e VILLA, P. 1989. Alcoholic

- fermentation of beet molasses: effects of lactic acid on yeast fermentation parameters. *Appl. Microb. Biotechnol.* 31: 125-128.
- NORRIS, J.R. e RIBBONS, D.W. 1971. *Methods in microbiology*. Academic Press. N. York. vol. 5A, p. 114-115
- NOVAK, M.; STREHAJANO, P.; MORENO, M. e GOMA, G. 1981. Alcoholic fermentation: on the inhibitory effect of ethanol. *Biotech. Bioeng.*, XXIII, 201-211.
- OLBRICH, H. 1960. *Microorganismos do melaço*. In: *O Melaço*. 3ª ed. Rio de Janeiro, Inst. Açúcar e Alcool., pag. 99-104.
- OLIVEIRA, E.R. (1962) A deterioração dos melaços armazenados. *Brasil Açucareiro*, 80: 12-17.
- ORLA-JENSEN, S. 1919. *The Lactic Acid Bacteria*. Andr. Fre. Host. and Son, Copenhagen.
- PAMPULHA, M.E. e LOUREIRO, V. 1989. Interaction of the effects of acetic acid and ethanol on inhibition of fermentation in *Sacchromyces cerevisiae*. *Biotechnol. Letters*, 11(4): 269-274.
- PEDERSON, C. S. 1938. A bacteriological study of raw cane sugar plants. *J. Bacteriol.* 35: 74-75.
- PEDERSON, C. S. e HUCKER, G. J. 1946. The significance of bacteria in sugar mills. *Proc. Assoc. Technol. Azucar. Cuba*, 20 th Mtg., 225-230.
- PELCZAR Jr., M.J. ed. 1957. *Manual of Microbiological Methods* Soc. Am. Bacteriologists, Committee on Bacteriological Technic. McGraw Hill Book Company, New York.
- PERINGER, P. e BLACHERE, H. T. 1979. Modeling and optimal control of Baker's Yeast production in repeated fed batch culture. *Biotech. Bioeng. Symposium*, 9: 205-213.

- PIRT, S. J. 1974. The theory of fed batch culture with reference to the penicillin fermentation. *J. Appl. Chem. Biotechnol.* 24: 415-424.
- RONDINI, M. A. T. 1985. Isolamento, caracterização e identificação de bactérias contaminantes de dornas de fermentação nas destilarias de etanol. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 92p. Tese Mestrado. Univ. São Paulo.
- SAMSOM, F.E.; KATZ, A.M. e HARRIS, D.L. 1955. Effects of acetate and other short-chain fatty acids on yeast metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* 54: 406
- SERRA, G. E.; CEREDA, M. P.; FERES, R. J. F.; BERTOZO, M. T. e VICENTE, A. L. 1979. Contaminação da fermentação alcoólica "floculação do fermento". *Brasil Açucareiro*, XCIII(6): 336-341.
- SILLIKER, J. H.; ELLIOTT, R. P.; BAIRD-PARKER, A. C.; BRYAN, F.L.; CHRISTIAN, J. H. B.; CLARK, D. S.; Jr. OLSON, J. C. e ROBERTS, T. A. 1980. *Microbial Ecology of Foods. Food Commodities by The International Commission on Microbiological Specifications for Foods.* USA, Academic Press, p.778-789.
- SILVA, N. da. 1988. Influência do resfriamento em torre sobre amicrobiota do caldo de cana no processo de produção de álcool. Tese de Mestrado. Fac. Eng. Alimentos - UNICAMP - CAMPINAS - SP.
- SOUZA, L.G.; GOLDONI, J. S.; e EIRA, A. F. 1977. Microorganismos em melaço armazenado. *Brasil Açucareiro*, 4: 204-206.
- SPECK, M.L. 1978. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.* Am. Public Health. Assoc. Washington-DC
- STRATFORD, M. e KEENAN, M.H.J. 1988. Yeast flocculation:

- quantification. *Yeast* 4: 107-115.
- STUPIELLO, J.P. e HORII, J. 1981. Condução da fermentação alcoólica. *Saccharum*, 17: 43-46.
- STUPIELLO, J.P. 1982. Qualidade de cana-de-açúcar para fabricação de açúcar e álcool. *Açúcar e Álcool*, nº 2: 28-32.
- SUMMER, J.B. 1924. The estimation of sugar in diabetic urine using dinitrosalicylic acid. *J. Biol. Chem.* 62:(2) p. 287-290.
- TEREZA-RAMOS, M. e MADEIRA-LOPES, A. 1990. Effects of acetic acid on the temperature profile of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Letters*. 12(3): 229-234
- THOMAS, D.S.; KOSSAK, J.A. e ROSE, A.H. 1978. Plasma membrane composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microb.* 117: 239-245.
- TILBURY, R.A. 1975. Occurrence and Effect of Lactic Acid Bacteria in the sugar industry. In: *Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food*. Acad. Press. N.Y. p. 177-191.
- TRILLI, A. et al. Estimation of productivities in repeated fed batch cephalosporin fermentation. *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, 27: 219-224
- VEGA, J.L.; CLAUSEN, E.C. e GADDY, J.L. 1987. Acetate addition to an immobilized yeast column for ethanol production. *Biotec. Bioeng.* 29: 429-435
- VEGA, J.L.; NAVARRO, A.R.; CLAUSEN, E.C. e GADDY, J.L. 1987. effects on inoculum size on ethanol inhibition modeling and other fermentation parameters. *Biotech. Bioeng.* 29: 633-638.
- VIEGAS, G.A.; ROSA, M. F.; SÁ-CORREIA, I. e NOVAIS, J.M. 1989. Inhibition of yeast growth by octanoic and decanoic acids

produced during ethanolic fermentation. Appl. Environ. Microb.
55(1): 21-28.

- WELLES, J. B. e BLANCH, H. W. 1978. The effect of discontinuous feeding on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech. Bioeng.*, 18: 129-132.
- YOSHIDA, F.; YAMANE, T. e NAKAMOTO, K. 1973. Fed batch hydrocarbon fermentation with colloidal emulsion feed. *Biotech. Bioeng.*, 15: 257-270.
- ZINES, D. D. e ROGERS, P. L. 1971. A chemostat study of ethanol inhibition. *Biotech. Bioeng.*, 13: 293-308

APÊNDICE

NOMECLATURA

ART : açúcares totais calculados como glicose
ARTc : açúcares totais consumidos
ARTr : açúcares totais residuais
ARTa : açúcares totais adicionados
ART: massa de açúcares totais em gramas
S : concentração de ART (g/l)
So : concentração de ART no mosto de alimentação (g/l)
Nb ou nb: número de células bacterianas por mililitro
NI ou ni: número de células de leveduras por mililitro
Mb: gramas de células bacterianas por litro
MI: gramas de células de leveduras por litro
P : concentração de produto (g/l)
Pe : produtividade de etanol em 10 h. de fermentação (g/l.h)
Pem: produtividade de etanol em 10 h. de fermentação (g/g.h)
Pxi: produtividade de células de levedura em 10 h. (g/l.h)
Pxb: produtividade de células de bactérias em 10 h. (g/l.h)
Ps : produtividade de açúcar consumido em 10 h. (g/g.h)
R : rendimento (%)
Yp/s: fator de conversão de substrato consumido em produto (g/g)
Yp/so: fator de conversão do substrato inicial em produto (g/g)
V : volume em litros
t : tempo em horas
te : tempo de enchimento em horas
u : taxa específica de crescimento
um : taxa específica máxima de crescimento

V : taxa específica de produção de etanol

V_m : taxa específica máxima de produção de etanol

TABELA 2 - Características morfológicas e bioquímicas das cepas isoladas.

Simbolos utilizados:

+ = positivo

- = negativo

(+)= fracamente positivo

++= fortemente positivo

0 = não verificado

Crescimento em meio

t = turbidez uniforme

líquido

d = meio não turvo

l = sedimento liso

f = sedimento floculento

Características das colônias

Forma

P= puntiforme

C= circular

l= irregular

Elevação

F= plana

C= convexa

Margem

P= perfeita

l= irregular

Morfologia

B= bastonete

C= coco

CB= cocobacilo

Arranjo

l= isolado

P= pares

C= cadeias

O/F glicose

O= oxidativo

F= fermentativo

OF= oxidativo e fermentativo

Litmus milk

A= acidificação C=coagulação R=redução

D= digestão

TABELA 2- Características morfológicas e bioquímicas das cepas isoladas.

	culturas											
testes	1	2	3	4	5	6	7	8	10	11	12	
pH da amostra	4.1	3.3	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	
crescimento em meio líquido(MRS)	ti	ti	ti	df	tf	ti	tf	ti	ti	ti	tf	
caract.da colônia	PCI	PCI	PCI	PCI	PCI	PCI	PFI	PCI	CPP	PCI	PCI	
pigmentação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
morfologia	B	B	B	CB	B	B	B	B	B	CB	B	
arranjo	IP	IP	IP	C	IPC	IC	I	IP	IPC	IPC	I	
motilidade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
esporos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
oxid./ferm. da glicose	F	F	F	F	F	F	F	F	O	F	F	
gás a partir de glicose	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	
LITMUS MILK	-	-	-	-	-	ACRD	-	-	-	-	-	
cresc.e caract. em etanol a 7%	-	+TL	+TL	+TL	+IF	+TL	O	+TL	O	O	+TF	
10%	-	-	+TF	+TF	-	+TL	O	-	O	O	-	
crescimento 15 C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
crescimento 45 C	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	
floculação do fermento	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	
acúcares:												
ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
celobiose	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	
rafinose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
lactose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
sacarose	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	
melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
manose	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	

TABELA 2 - Continuação

testes	culturas										
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
pH da amostra	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	4.1	4.1
crescimento em meio líquido(MRS)	tf	tf	tl	tl	tf	tf	tl	tl	tl	tl	tl
caract.da colônia	P	P	CCP	CCP	CCP	CCP	CCP	P	CCP	P	P
pigmentação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
morfologia	B	B	B	B	B	CB	B	B	C	B	B
arranjo	I	I	IC	IPC	P	IPC	IPC	IPC	IP	IP	I
motilidade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
esporos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
oxid./ferm.											
da glicose	O	F	F	F	F	F	F	F	O	F	F
gás a partir de glicose	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Litmus Milk	-	-	-	-	-	-	ACRD		-	-	-
cresc.e caract. em etanol a 7%	O	+TL	O	O	+TF	+TL	O	+TL	+TL	+TL	O
10%	O	+TF	+F	O	O	-	-	O	+T	+L	+L
crescimento 15 C	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
crescimento 45 C	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
floculação do fermento	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+
acúcares:											
ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
celobiose	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
rafinose	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+
arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
lactose	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
sacarose	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
manose	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+

TABELA 2 - Continuação

testes	culturas										
	24	25	26	27	28	29	30	31	31'	32	33
pH da amostra	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	3.3
crescimento em meio líquido(MRS)	tl	tl	tl	ll	tf	tl	tl	tl	tf	tl	tl
caract.da colônia	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
pigmentação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
morfologia	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
arranjo	IP	I	I	I	I	IP	I	I	I	I	I
motilidade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
esporos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
oxid./ferm. da glicose	F	F	F	F	O	F	F	O	O	O	F
gás a partir de glicose	O	+	+	+	+	+	+	+	+	O	+
litmus milk	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cresc.e caract. em etanol a 7%	O	+L	+L	+F	+F	+F	+F	+F	(+)	O	+L
10%	O	+L	+L	+F	+F	+F	+F	+F	-	O	+L
crescimento 15 C	O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
crescimento 45 C	O	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
floculação do fermento	-	-	-	+	+	-	+	+	+	O	O
acúcares:											
ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
celobiose	O	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
rafinose	O	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
arabinose	O	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
sacarose	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
manose	O	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

TABELA 2 - Continuação

testes	culturas									
	34	35	37	38	39	40	41	42	43	44
pH da amostra	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	3.3	3.9	3.9	3.9	3.9
crescimento em meio líquido(MRS)	tl	tl	ll	tl	tl	tf	tl	tl	tl	tl
caract.da colônia	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
pigmentação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
morfologia	B	B	B	B	B	B	B	B	B	CB
arranjo	I	IP	IP	I	I	I	IP	IP	I	IPC
motilidade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
esporos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
oxid./ferm.										
da glicose	O	F	F	F	F	O	F	F	-	F
gás a partir de glicose	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
litmus milk	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AR
cresc.e caract. em etanol a 7%	O	+L	+L	+F	+L	+F	+F	+F	+F	+L
10%	O	-	-	+F	+L	+F	+F	-	+F	-
crescimento 15 C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
crescimento 45 C	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
floculação do fermento	+	+	+	-	+	+	+	O	O	+
acúcares:										
ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
celobiose	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+
rafinose	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
lactose	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
sacarose	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
manose	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+