

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

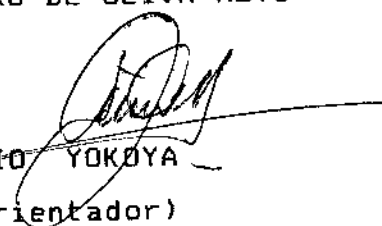
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ESTUDO DE DIFERENTES FATORES QUE INFLUENCIAM O
CRESCIMENTO DA POPULAÇÃO BACTERIANA CONTAMINANTE
DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA POR LEVEDURAS.

Parar

*Este exemplar corresponde a redação final
da tese defendida por Pedro de Oliva
Neto e aprovada pela comissão julgadora
em 05.06.95.*

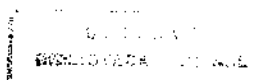
PEDRO DE OLIVA NETO


EUMIO YOKOYA

(orientador)

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universida-
de Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Ciências
de Alimentos.

- 1995 -



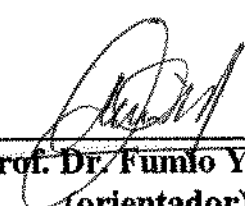
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

OL48e	Oliva Neto, Pedro de
	Estudo de diferentes fatores que influenciam o crescimento da população bacteriana contaminante da fermentação alcoólica por levedura / Pedro de Oliva Neto. -- Campinas, SP : [s.n.], 1995.
	Orientador: Fumio Yokoya.
	Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.
	1. Inibição. 2. Crescimento. 3. Lactobacilo. 4. Contaminação (Tecnologia). 5. Fermentação alcoólica. I. Yokoya, Fumio. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

UNIDADE	33C
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	OL48e
V.	Ed.
TRAB.	02/24970
ACC.	433195
	☐ ☐ ☒ ☐
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	30/06/95
N.º CIPD	

CM-00071542-3

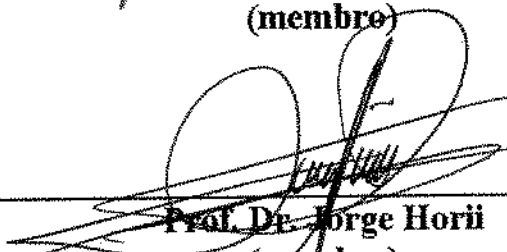
BANCA EXAMINADORA



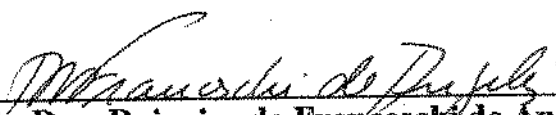
Prof. Dr. Fumio Yokoya
(orientador) -



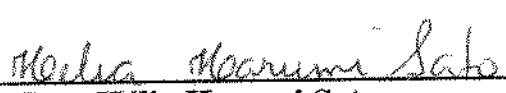
Prof. Dr. Gil Eduardo Serra
(membro)



Prof. Dr. Jorge Horii
(membro)



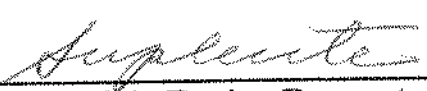
Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis
(membro)



Profa. Dra. Hélia Hamuri Sato
(membro)



Prof. Dr. Vanderlei Perez Canhos
(membro)



Profa. Lúcia Regina Durrant
(membro)

À minha querida esposa e companheira Patricia.

AGRADECIMENTOS

A grande força divina que sempre nos ilumina o caminho a ser seguido, e nos fortalece constantemente nos dando energia para enfrentar os problemas.

Ao grande e fiel amigo e orientador Prof. Dr. Fumio Yokoya, pelo seu exemplo de ação reta, digna, justa e perseverante na busca da verdade, veiculada pelo seu trabalho incansável, que sempre nos serviu de modelo.

Aos professores Gil Eduardo Serra, Jorge Horii, Dejanira de Franceschi de Angelis, Hélia Harumi Sato, Vanderlei Perez Canhos e Lúcia Regina Durrant, pela atenciosa revisão da tese e as valiosas sugestões apresentadas.

À técnica Rosinha do laboratório de Microbiologia da FEA-UNICAMP, pela colaboração permanente no desenvolvimento do trabalho

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

À FAPESP pelo apoio financeiro na fase inicial do trabalho e à CAPES, que através do programa de bolsas de pesquisa, apoiou a fase intermediária e final do trabalho.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABELAS	IV
RESUMO	XI
SUMMARY	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. Microflora bacteriana na indústria sucro-alcooleira.	2
2.2. Aspectos metabólicos das bactérias lácticas.	4
2.3. Efeito de compostos orgânicos no estímulo do crescimento das bactérias lácticas.	8
2.4. Efeito das bactérias contaminantes na indústria sucro-al- cooleira.	11
2.4.1 Efeito no rendimento industrial.	11
2.4.2 Efeito de ácidos orgânicos nas leveduras do processo.	13
2.4.3 Floculação do fermento.	15
2.5. Métodos de controle bacteriano na indústria sucro-alcooleira.	16
2.5.1 Utilização de antibióticos na fermentação alcoólica indu- trial.	16
2.5.2 Tratamento ácido do fermento.	18
2.5.3 Biocidas usados na produção de etanol.	18

3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1. Desenvolvimento do meio de cultivo para bactérias láticas..	22
3.2. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI).....	22
3.3. Testes de fermentação alcoólica por leveduras na presença e <i>Lactobacillus fermentum</i>	25
3.4. Testes de aplicação do Desfloc imobilizado em alginato de cálcio	29
3.5. Avaliação dos requerimentos nutricionais de <i>Lactobacillus</i> <i>fermentum</i>	29
3.6. Cálculo da eficiência alcoólica e análise estatística.....	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1. Avaliação de parâmetros da fermentação alcoólica com a adi- ção inicial de <i>L. fermentum</i>	32
4.2. Avaliação de fatores envolvidos no estímulo do crescimento de bactérias láticas na fermentação alcoólica.	36
4.2.1 Efeito da adição de nutrientes	36
4.2.1.1 Adição de 10 g/l de extrato de levedura.	36
4.2.1.2 Adição de diversas concentrações de extrato de levedura.	37
4.2.1.3 Efeito da adição de aminoácidos e inoculação inicial do contaminante.	43
4.2.1.4 Efeito de vários nutrientes no cultivo puro de <i>L.</i> <i>fermentum</i>	49
4.2.2 Efeito da velocidade de centrifugação, lavagem do fermento e duração do ensaio de fermentação	59
4.2.2.1 Efeito da duração do ensaio de fermentação	59
4.2.2.2 Efeito da lavagem do fermento.	63
4.2.2.3 Efeito da velocidade de centrifugação do fermento	66
4.3 Estudo de desinfetantes para controle bacteriano da fermenta- ção alcoólica.	71

4.3.1	Seleção do desinfetante a ser testado na fermentação alcoólica.	71
4.3.2	Avaliação do uso de 1800 mg/l de Desfloc imobilizado com e sem adição de extrato de levedura	81
4.3.3	Avaliação do uso de diversas concentrações de Desfloc imobilizado.	85
4.3.4	Aplicação do Desfloc imobilizado com potencializador em diversas concentrações de extrato de levedura.	88
5.	CONCLUSÕES	95
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
7.	APÊNDICE	113

ÍNDICE DE FIGURAS

I

FIGURA 1 - Viabilidade e número de leveduras no inóculo no teste de avaliação dos parâmetros da fermentação (média de 3 repetições).	34
FIGURA 2 - Porcentagem de brotamento das leveduras, número de bactérias viáveis e pH do vinho no teste de avaliação dos parâmetros da fermentação (média de 3 repetições).	34
FIGURA 3 - Viabilidade e brotamento das células de leveduras no teste da adição de 10 g/l de extrato de levedura na fermentação alcoólica (média de 4 repetições).	38
FIGURA 4 - Número de células de leveduras e bactérias viáveis no teste da adição de 10 g/l de extrato de levedura na fermentação alcoólica (média de 4 repetições).	38
FIGURA 5 - Acidez e pH no vinho delevurado no teste de adição de 10 g/l de extrato de levedura na fermentação alcoólica (média de 4 repetições).	39
FIGURA 6 - Viabilidade das células de leveduras no teste da adição de diversas concentrações de extrato de levedura na fermentação (média de 2 repetições).	40
FIGURA 7 - Porcentagem de brotamento das células de leveduras no teste da adição de diversas concentrações de extrato de levedura na fermentação (média de 2 repetições).	40
FIGURA 8 - Acidez e pH do vinho delevurado no teste da adição de diversas concentrações de extrato de levedura na fermentação (média de 2 repetições).	41
FIGURA 9 - Viabilidade (média de 2 repetições) e número de leveduras (média de 3 repetições) no teste da adição de aminoácidos e inoculação inicial do contaminante.	46

FIGURA 10 - Porcentagem de brotamento das células de leveduras no teste da adição de aminoácidos e inoculação inicial do contaminante (média de 2 repetições).	46
FIGURA 11 - Número de bactérias no teste da adição de aminoácidos e inoculação inicial do contaminante (média de 3 repetições).	47
FIGURA 12 - Média da acidez e pH do vinho no teste da adição de aminoácidos e inoculação inicial do contaminante (média de 3 repetições).	47
FIGURA 13 - Viabilidade das células de leveduras no teste da duração do ensaio de fermentação (média de 2 repetições).	61
FIGURA 14 - Porcentagem de brotamento das células de leveduras no teste da duração do ensaio de fermentação (média de 2 repetições).	62
FIGURA 15 - Acidez e pH do vinho no teste da duração do ensaio de fermentação. (média de 2 repetições).	62
FIGURA 16 - Viabilidade das células de leveduras no teste da lavagem do fermento (média de 2 repetições).	64
FIGURA 17 - Porcentagem de brotamento das células de leveduras no teste da lavagem do fermento (média de 2 repetições).	64
FIGURA 18 - Acidez e pH do vinho no teste do efeito da lavagem do fermento (média de 2 repetições).	65
FIGURA 19 - Viabilidade e brotamento (média de 2 repetições) das leveduras no teste do efeito da centrifugação do fermento.	67
FIGURA 20 - Acidez e pH do vinho no teste do efeito da centrifugação do fermento (média de 2 repetições).	67
FIGURA 21 - Viabilidade e número de leveduras no teste da avaliação do uso de 1800 mg/l de Desfloc imobilizado com e sem a adição de extrato de levedura (média de 2 repetições).	83

FIGURA 22 - Brotamento das leveduras no teste da avaliação do uso de 1800 mg/l de Desfloc imobilizado com e sem a adição de extrato de levedura (média de 2 repetições).	83
FIGURA 23 - Número de leveduras no teste da avaliação do uso de 1800 mg/l de Desfloc imobilizado com e sem a adição de extrato de levedura (média de 2 repetições).	84
FIGURA 24 - Acidez e pH do vinho no teste da avaliação do uso de 1800 mg/l de Desfloc imobilizado com e sem a adição de extrato de levedura (média de 2 repetições).	84
FIGURA 25 - Viabilidade das leveduras no teste da avaliação de diversas concentrações de Desfloc imobilizado.	86
FIGURA 26 - Brotamento das leveduras no teste da avaliação de diversas concentrações de Desfloc imobilizado.	87
FIGURA 27 - Acidez e pH do vinho no teste da avaliação de diversas concentrações de Desfloc imobilizado (média de 2 repetições).	87
FIGURA 28 - Viabilidade das leveduras no teste da aplicação do Desfloc com potencializador em diversas concentrações de extrato de levedura.	91
FIGURA 29 - Porcentagem de brotos vivos das células de leveduras no teste da aplicação do Desfloc com potencializador em diversas concentrações de extrato de levedura.	92
FIGURA 30 - Porcentagem de brotos mortos das células de leveduras no teste da aplicação do Desfloc com potencializador em diversas concentrações de extrato de levedura.	92
FIGURA 31 - Acidez do vinho no teste da aplicação do Desfloc com potencializador em diversas concentrações de extrato de levedura.	93

FIGURA 32 - pH do vinho no teste da aplicação do Desfloc com potencializador em diversas concentrações de extrato de levedura.	93
---	----

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 - Formulações dos meios de cultivo a base de caldo de cana desidratado, quantidades expressas em g/l de água destilada, pH final 6,5.	23
TABELA 2 - Viabilidade das células de leveduras (%) no teste de avaliação de alguns parâmetros da fermentação alcoólica com adição inicial de <i>L. fermentum</i>	113
TABELA 3 - Porcentagem de brotos vivos das células de leveduras no teste de avaliação de alguns parâmetros da fermentação alcoólica com adição inicial de <i>L. fermentum</i>	114
TABELA 4 - Porcentagem de brotos mortos das células de leveduras no teste de avaliação de alguns parâmetros da fermentação alcoólica com adição inicial de <i>L. fermentum</i>	115
TABELA 5 - Número de células de leveduras no inóculo de cada ciclo, expressos em u.f.c./ml $\times 10^7$, no teste de avaliação de alguns parâmetros da fermentação alcoólica com adição inicial de <i>L. fermentum</i>	116
TABELA 6 - Número de células de bactérias lácticas no inóculo de cada ciclo, expressos em u.f.c./ml $\times 10^7$, no teste de avaliação de alguns parâmetros da fermentação alcoólica com adição inicial de <i>L. fermentum</i>	117
TABELA 7 - pH do vinho delevurado no final de cada ciclo, no teste de avaliação de alguns parâmetros da fermentação alcoólica com adição inicial de <i>L. fermentum</i>	118

TABELA 8 - Resumo das faixas de resultados referentes aos parâmetros avaliados no tratamento controle de 4 ensaios de fermentação.	119
TABELA 9 - Viabilidade das células de leveduras (%) com a adição de 10 g/l de extrato de levedura no mosto. ...	120
TABELA 10 - Porcentagem de brotos vivos das células de leveduras com a adição de 10 g/l de extrato de levedura no mosto.	121
TABELA 11 - Porcentagem de brotos mortos das células de leveduras com a adição de 10 g/l de extrato de levedura no mosto.	122
TABELA 12 - Número de células de leveduras no inóculo de cada ciclo, expressos em u.f.c./ml $\times 10^7$, no teste de avaliação da adição de 10 g/l de extrato de levedura no mosto.	123
TABELA 13 - Número de células de bactérias lácticas no inóculo de cada ciclo, expressos em u.f.c./ml $\times 10^7$, no teste de avaliação da adição de 10 g/l de extrato de levedura no mosto.	125
TABELA 14 - Acidez do vinho delevurado, expressa g/l ácido láctico no teste de avaliação da adição de 10 g/l de extrato de levedura no mosto.	126
TABELA 15 - pH do vinho delevurado no final de cada ciclo, no teste de avaliação da adição de 10 g/l de extrato de levedura no mosto.	127
TABELA 16 - Viabilidade das células de leveduras (%) no teste do efeito da inoculação inicial do contaminante e adição de aminoácidos no mosto.	128
TABELA 17 - Porcentagem de brotos vivos das células de leveduras no teste do efeito da inoculação inicial do contaminante e adição de aminoácidos no mosto.	130
TABELA 18 - Porcentagem de brotos mortos das células de leveduras no teste do efeito da inoculação inicial	

do contaminante e adição de aminoácidos no mosto.	132
TABELA 19 - Número de células de leveduras no inóculo de cada ciclo, expressos em u.f.c. $\times 10^7$ /ml., no teste do efeito da inoculação inicial do contaminante e adição de aminoácidos no mosto.	134
TABELA 20 - Número de células de bactérias lácticas no inóculo de cada ciclo, expressos em u.f.c. $\times 10^7$ /ml., no teste do efeito da inoculação inicial do contaminante e adição de aminoácidos no mosto.	136
TABELA 21 - Acidez do vinho delevurado, expressa g/l ácido láctico no teste do efeito da inoculação inicial do contaminante e adição de aminoácidos no mosto.	138
TABELA 22 - pH do vinho delevurado no teste do efeito da inoculação inicial do contaminante e adição de aminoácidos no mosto.	140
TABELA 23 - Aminoácidos totais no vinho delevurado, expressos em mg/l de leucina, no teste do efeito da inoculação inicial do contaminante e adição de aminoácidos no mosto.	142
TABELA 24 - Avaliação do Crescimento de bactérias lácticas e Saccharomyces cerevisiae em meio de cultivo a base de caldo de cana-de-açúcar desidratado (rapadura), após 72 horas de incubação a 30°C.	50
TABELA 25 - Avaliação do crescimento de Lactobacillus fermentum em meio de cultivo a base de caldo de cana-de-açúcar desitratado (rapadura), adicionado de vários nutrientes, após 72 horas de incubação a 30°C.	52
TABELA 26 - Avaliação do crescimento de Lactobacillus fermentum em meio contendo caldo de cana-de-açúcar desidratada (rapadura), sais e vários conjuntos de aminoácidos.	55
TABELA 27 - Avaliação do crescimento de Lactobacillus fermentum em meio de cultivo contendo caldo de cana-de-açúcar desidratado (rapadura), adicionado de conjuntos com	

16 aminoácidos removendo-se um dos 17 relacionados.	56
TABELA 28 - Curva de crescimento de <i>Lactobacillus fermentum</i> em diferentes composições de meio de cultivo a base de caldo de cana-de-açúcar desidratado.....	58
TABELA 29 - Viabilidade das células de leveduras (%) na avaliação do efeito do tempo de fermentação.....	143
TABELA 30 - Porcentagem de brotos vivos das células de leveduras na avaliação do efeito da duração do ensaio de fermentação.....	144
TABELA 31 - Porcentagem de brotos mortos das células de leveduras na avaliação do efeito da duração do ensaio de fermentação.	144
TABELA 32 - Acidez do vinho delevurado, expressa g/l ácido láctico, na avaliação do efeito da duração do ensaio de fermentação.	145
TABELA 33 - pH do vinho delevurado no final de cada ciclo, na avaliação do efeito da duração do ensaio de fermentação.	145
TABELA 34 - Aminoácidos totais no vinho delevurado, na avaliação do efeito da duração do ensaio de fermentação.	146
TABELA 35 - Viabilidade das células de leveduras (%) com lavagem do fermento.	147
TABELA 36 - Porcentagem de brotos vivos das células de leveduras com lavagem do fermento.	148
TABELA 37 - Porcentagem de brotos mortos das células de leveduras com lavagem do fermento.	148
TABELA 38 - Acidez do vinho delevurado, expressa g/l ácido láctico, com lavagem do fermento.	149
TABELA 39 - pH do vinho delevurado no final de cada ciclo, com lavagem do fermento.	150
TABELA 40 - Viabilidade e brotamento das células de leveduras na avaliação do efeito da velocidade de centrifugação do fermento na microbiota fermentativa. ..	151

TABELA 41 - Acidez do vinho delevurado, expressa g/l ácido láctico, na avaliação do efeito da velocidade de centrifugação do fermento na microbiota fermentativa.	151
TABELA 42 - pH do vinho delevurado no final de cada ciclo, na avaliação do efeito da velocidade de centrifugação do fermento na microbiota fermentativa. ...	152
TABELA 43 - Concentração Mínima Inibitória, de diversos produtos para bactérias lácticas e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , pH do meio 6,5.	72
TABELA 44 - Concentração Mínima Inibitória, em ug/ml, de formulações comerciais para bactérias lácticas e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , pH do meio 6,5.	73
TABELA 45 - Concentração Mínima Inibitória, de diversos agentes para bactérias lácticas e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , pH do meio 4,5.	74
TABELA 46 - Concentração Mínima Inibitória, de formulações comerciais para bactérias lácticas e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , meio com pH 4,5.	79
TABELA 47 - Viabilidade das células de leveduras (%) na avaliação do uso de 1800 mg/l do biocida Desfloc na fermentação.	153
TABELA 48 - Porcentagem de brotos vivos das células de leveduras na avaliação do uso de 1800 mg/l do biocida Desfloc na fermentação.	154
TABELA 49 - Porcentagem de brotos mortos das células de leveduras na avaliação do uso de 1800 mg/l do biocida Desfloc na fermentação.	155
TABELA 50 - Número de células de leveduras no inóculo de cada ciclo, na avaliação do uso de 1800 ppm do biocida Desfloc na fermentação.	156
TABELA 51 - Número de células de bactérias lácticas no inóculo de cada ciclo, avaliação do uso de 1800 mg/l do	

biocida Desfloc na fermentação.	157
TABELA 52 - Acidez do vinho delevurado, expressa em g/l de ácido lático, na avaliação do uso de 1800 mg/l do biocida Desfloc na fermentação.	158
TABELA 53 - pH do vinho delevurado no final de cada ciclo, na avaliação do uso de 1800 mg/l do biocida Desfloc na fermentação.	159
TABELA 54 - Açúcares totais (ART - g/l) o vinho delevurado ao final de 10 horas de fermentação, na avaliação do uso de 1800 mg/l do biocida Desfloc na fermentação.	160
TABELA 55 - Açúcares totais (ART - g/l) no mosto ao final de 10 horas de fermentação, na avaliação do uso de 1800 mg/l do biocida Desfloc na fermentação.	161
TABELA 56 - Concentração de etanol no vinho delevurado após 10 horas de fermentação, na avaliação do uso de 1800 mg/l do biocida Desfloc na fermentação.	162
TABELA 57 - Eficiência alcoólica, na avaliação do uso de 1800 mg/l do biocida Desfloc fermentação.	163
TABELA 58 - Viabilidade das células de leveduras (%) no teste de determinação da atividade do Desfloc na fermentação alcoólica em diversas concentrações.	165
TABELA 59 - Porcentagem de brotos vivos e mortos das células de leveduras no teste de determinação da atividade do Desfloc na fermentação alcoólica em diversas concentrações.	166
TABELA 60 - Acidez do vinho delevurado, expressa em g/l de ácido lático, no teste de determinação da atividade do Desfloc na fermentação alcoólica em diversas concentrações.	167
TABELA 61 - pH do vinho delevurado no final de cada ciclo, no teste de determinação da atividade do Desfloc na fermentação alcoólica em diversas concentrações.	170

TABELA 62 - Viabilidade das células de leveduras (%) no teste do Desfloc imobilizado com potencializador e a adição de diversas concentrações de extrato de levedura.	173
TABELA 63 - Porcentagem de brotos vivos das células de leveduras no teste do Desfloc imobilizado, com potencializador e a adição de diversas concentrações de extrato de levedura.	175
TABELA 64 - Porcentagem de brotos mortos das células de leveduras no teste do Desfloc imobilizado, com potencializador e adição de diversas concentrações de extrato de levedura.	177
TABELA 65 - Acidez (expressa g/l ácido láctico) e pH do vinho delevurado do tratamento controle, no teste do Desfloc imobilizado, com potencializador e adição de diversas concentrações de extrato de levedura.	179
TABELA 66 - Acidez do vinho delevurado, expressa g/l ácido láctico, no teste do Desfloc imobilizado, com potencializador e adição de diversas concentrações de extrato de levedura.	180
TABELA 67 - pH do vinho delevurado no final de cada ciclo, no teste do Desfloc imobilizado, com potencializador e adição de diversas concentrações de extrato de levedura.	182

RESUMO

Neste trabalho foi realizado o estudo da fermentação alcoólica do HTM (high test molasses) por leveduras de panificação contaminada com *Lactobacillus fermentum* CCT 1407, através do processo "fed-batch" com reciclo de células, visando simular as condições industriais. O estudo de inibidores do crescimento de *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Saccharomyces cerevisiae* foi feito através da técnica de macrodiluição em caldo para determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) do crescimento. O mais promissor dos produtos analisados foi selecionado e testado no modelo de fermentação, com a adição de extrato de levedura para favorecer o crescimento do contaminante.

Os resultados indicaram que o estudo da população mista, leveduras e bactérias lácticas, simulou o mecanismo de infecção bacteriana da fermentação. Após 4 a 7 ciclos de fermentação de 20 horas cada, ocorreu o rápido crescimento da população bacteriana inoculada no primeiro ciclo e, após 8 a 12 ciclos, a inibição das leveduras foi proeminente, provocada pelo aumento da acidez. O crescimento bacteriano foi estimulado com a adição de extrato de levedura (1%) ou um conjunto de 17 aminoácidos. A morte das leveduras foi acelerada pelo excesso de acidez no vinho (15 g/l).

Testes de cultivo puro de *Lactobacillus fermentum* CCT 1407 em caldo de cana a 4% confirmaram que aminoácidos, quando complementados no meio, foram essenciais para o crescimento das bactérias, e não sais, vitaminas ou açúcares como afirmaram alguns pesquisadores. Os aminoácidos devem ser os principais componentes presentes no extrato de levedura que estimulam o crescimento das bactérias lácticas durante a fermentação. Dentre os aminoácidos complementados, a leucina, isoleucina e valina foram essenciais para o crescimento bacteriano. Ácido glutâmico, alanina, cisteína, treonina, triptofano, fenilalanina, tirosina e metionina mostraram efeito estimulador do crescimento.

A quantidade de extrato de levedura parece ser crítica no estímulo do crescimento. Concentrações acima de 600 mg/l mostraram notável

aumento do crescimento bacteriano

A duração do ciclo de fermentação e a velocidade de centrifugação foram fatores importantes que influenciaram o crescimento da população bacteriana na fermentação alcoólica. Ciclos com 20 horas foram mais estimuladores do crescimento bacteriano, do que os de 12 horas. Baixas velocidades de centrifugação do fermento (870 X g) favoreceram mais o desenvolvimento das bactérias contaminantes comparadas com altas velocidades (5000 X g).

- Os seguintes resultados foram encontrados com respeito a CMI em *Lactobacillus fermentum* e *Leuconostoc mesenteroides* no meio a base de caldo de cana a 4% em pH 4,5: clindamicina 0,050 - 0,40 ug/ml, penicilina V ácida 0,050 - 0,20 ug/ml, sulfito de sódio 10,0 - 40,0 ug/ml e formaldeído 11,5 - 23,0 ug/ml. Dentre as formulações comerciais os ativos bromofenato com CMI de 9 - 18 ug/ml, tiocianato 1,20 - 5,0 ug/ml, e o Desfloc 0,25 - 0,50 ug/ml. A concentração de 75 mg/l de Desfloc (triclorocarbanilida) imobilizado em alginato de cálcio, e combinado com lauril sulfato de sódio (1,67 a 5,00 mg/l) controlaram de forma eficaz o crescimento de *L. fermentum* na fermentação alcoólica conduzida em escala de laboratório.

SUMMARY

In this work, the alcoholic fermentation study of HTM (high test molasses) by baker's yeast contaminated with *Lactobacillus fermentum* CCT 1407 was carried out by fed-batch and cell recycle process, aiming to simulate the industry conditions.

The growth inhibitors study of *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Saccharomyces cerevisiae* was done by macrodilution broth technic of Minimal Inhibition Concentration (MIC) of growth. The most promising compound was selected, and it was tested in fermentation model with added yeast extract to stimulate contaminant growth.

The results indicated that study of yeast and lactic acid bacteria population simulated the bacterial infection mechanism of fermentation. After 4 to 7 fermentation cycles of 20 hours each, the inoculated bacterial population started to grow very rapidly and after 8 to 12 cycles, the yeast inhibition by increased acidity was prominent.

The bacterial growth was stimulated with addition of yeast extract (1%) or a group of 17 amino acids. The death of yeast was accelerated by excess of acidity of wine (15 g/L).

Tests of pure culture by *Lactobacillus fermentum* CCT 1407 in cane broth (4%) confirmed that amino acids added on the medium, were essential for bacterial growth, and not salts, vitamins or sugars as presumed by some investigators. The amino acids should be the main components found in yeast extract that stimulate the growth of lactic acid bacteria during fermentation. Amongst added amino acids, leucine, isoleucine and valine were essential for bacterial growth. Glutamic acid, alanine, cysteine, threonine, thiptophane, phenylalanine, tyrosine and methionine showed stimulating effect on growth.

The amount of yeast extract seems to be critical on bacterial stimulation. Concentration above 600 mg/l showed noticeable increase on bacterial growth.

The period of fermentation cycle and speed of centrifugation were important factors that influenced bacterial population growth in the alcoholic fermentation. Cycles of 20 hours were more stimulant of bacterial growth than 12 hours. Low speed centrifugation (870 X g) stimulated more contaminant growth as compared to high speed (5000 X g). Following results were shown in regard to MIC on *Lactobacillus fermentum* and *Leuconostoc mesenteroides* with cane broth medium (4%) on pH 4.5: clindamicin 0.050-0.40 ug/ml; V acid penicilin 0.050-0.20 ug/ml; sodium sulfite 10-40 ug/ml and formaldeide 11.5-23 ug/ml. Among the commercially formulated products, the active bromofenate showed MIC of 9-18 ug/ml; tiocianate 1.2-5.0 ug/ml and Desfloc 0.25-0.50 ug/ml. Amount of 75 mg/l of Desfloc (triclorocarbanilide) entrapped in calcium alginate and combined with sodium lauryl sulphate (2 mg/l) controlled effectively, the *Lactobacillus fermentum* growth on alcoholic fermentation carried out in laboratory.

1. INTRODUÇÃO

A infecção bacteriana da fermentação alcoólica consiste numa grande limitação à otimização do processo devido a problemas causados pelos contaminantes, especialmente na etapa de fermentação, tais como: consumo de açúcar e etanol pelos contaminantes, morte das células de levedura por toxinas lançadas no meio fermentado (ALTERTHUM et al., 1985); perdas de células de levedura no fundo das dornas ou na centrífuga causada pela floculação do fermento, devido a produção de goma por bactérias (ALMEIDA, 1940; GALLI, 1961; SERRA et al., 1979), ou floculação pelo contato entre bactérias floculentas e leveduras (YOKOYA e OLIVA-NETO, 1991), e queda de rendimento alcoólico pela acidez do "vinho" causada por bactérias produtoras de ácido (AMDRIM & OLIVEIRA, 1982; OLIVA-NETO & YOKOYA, 1994).

Dentre os contaminantes mais frequentes nas dornas e mais resistentes ao etanol, destacam-se as bactérias lácticas, especialmente o gênero *Lactobacillus* (ALTERTHUM et al., 1984, 1985; GALLO, 1989; KAJI, 1989).

Gastos com insumos para o controle bacteriano da produção de etanol são imprecindíveis elevando o custo de fabricação. Nesse sentido, poucas e limitadas tecnologias são disponíveis para a resolução definitiva desse problema. Dada a importância das bactérias contaminantes do processo, é necessário conhecer os fatores que estimulam o seu crescimento durante o processo fermentativo, além de buscar novas tecnologias para o controle do contaminante na fermentação alcoólica industrial. Para isso o trabalho foi dividido em tres etapas: na primeira foi estudado o cultivo misto de leveduras contaminadas com bactérias no processo fermentativo; na segunda foi avaliado o efeito de alguns importantes fatores que estimulam o crescimento bacteriano na fermentação; e na terceira foi feita a seleção de um produto químico, a partir de diversos produtos testados em etapa anterior, visando sua aplicação no controle da fermentação alcoólica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Microflora bacteriana na indústria sucro-alcooleira.

Desde a cana-de-açúcar no campo até a etapa de fermentação alcoólica nas dornas das destilarias, ocorre uma seletiva mudança da microflora contaminante onde efeitos como pH, temperatura, condições atmosféricas e produtos inibidores presentes no substrato, influem diretamente na seleção dos microrganismos que melhor se adaptarão.

DULCAN & COLMER (1964) isolaram os seguintes microrganismos a partir da cana-de-açúcar: *Leuconostoc*, *Bacillus subtilis*, *Aerobacter cloacae*, *A. aerogenes*, *Escherichia coli* e *Lactobacillus plantarum*.

BEVAN & BOND (1971) identificaram *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas* na cana-de-açúcar intacta e, *Leuconostoc*, *Xanthomonas* e *Aerobacter* após 2 horas do corte mecanizado.

LIMA et. al. (1974) identificaram em caldo bruto, misto e água de embebição as seguintes bactérias: *Leuconostoc dextranicum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Aerobacter aerogenes*, *Bacillus coagulans*, *B. circulans*, *B. megaterium* e *Pseudomonas incognita*. TILBURY (1975) analisou a deterioração de caldo de cana e encontrou como as mais frequentes: *Leuconostoc mesenteroides*, *L. dextranicum* e *Lactobacillus plantarum*.

SILVA (1988) estudou o caldo de cana previamente clarificado e pasteurizado. Houve um predomínio de *Lactobacillus* (38%), seguido de bactérias pertencentes à família Micrococcaceae (23%), *Leuconostoc* (12%), leveduras (12%), *Bacillus* (3%) e membros da família Enterobacteriaceae. As cepas de lactobacilos foram predominantemente heterofermentativas (98%) e termodúricas (79%). As espécies mais frequentes foram *L. fermenti/reuteri* (47%), *L. confusus* (18%), *L. viridescens* (11%), *L. brevis/buchneri* (4%) e *L. plantarum* (2%).

Os contaminantes da fermentação alcoólica com capacidade infectante são restritos a poucos gêneros. Isso se deve ao fato desse ambiente ser altamente seletivo permitindo o desenvolvimento apenas dos microrganismos resistentes ao etanol e a pH baixo.

NEVES (1938), ALMEIDA (1940) e GALLI (1961) relacionaram fermentações paralelas à fermentação alcoólica a microrganismos contaminantes: a fermentação acética - *Acetobacter* e *Pseudomonas*, a fermentação láctica - *Lactobacillus* e *Streptococcus*, a fermentação butírica - *Clostridium* e a produção de goma dextrana - *Leuconostoc mesenteroides* e *levana* - *Bacillus*, *Aerobacter* e *Streptococcus*. *Sporolactobacillus inullinus* foi relacionado a uma grave infecção onde a bactéria era resistente ao tratamento com ácido sulfúrico (SERRA et al. 1979).

Trabalhos mais recentes apontam uma microflora do ambiente fermentativo de bactérias Gram positivas, predominantemente, e composta, pelos gêneros *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Leuconostoc*, sendo esse último menos comum. RODINI (1985) verificou que bastonetes esporulados (*Bacillus*) correspondiam a 62% da microflora do mosto fermentado, seguindo de *Lactobacillus* (3%) e *Leuconostoc* (1,5 %).

GALLO (1989) isolou e identificou os seguintes grupos: *Leuconostoc* (*L. mesenteroides* e *L. dextranicum*); *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. confusus*); *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. coagulans*); *Micrococcus* (*M. lylae*); *Streptococcus* (*S. lactis*) e *Enterobacter* (*E. aerogenes*). Houve um predomínio dos grupos *Lactobacillus* e *Bacillus*.

Leuconostoc, apesar de contaminar a fermentação alcoólica (oriundo do caldo de cana), raramente chega a causar grandes infecções. Isso é devido a sua relativa baixa resistência ao etanol. KAJI (1989) simulou a fermentação mista entre leveduras (*S. cerevisiae*) e as bactérias *Lactobacillus fermentum* e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. Apenas os lactobacilos puderam ser recuperados através da semeadura em placa. A morte do *Leuconostoc* foi atribuída ao efeito inibitório do etanol, que a 3% foi capaz de reduzir em 50% a velocidade específica máxima de crescimento e, em concentrações superiores a 6% houve a interrupção total do crescimento.

OLIVA-NETO (1990) também encontrou um predomínio de contaminantes do grupo *Lactobacillus* após isolamento em meio rico (MRS - Difco), a

partir de amostras de "leite de levedura" em usinas do Estado de São Paulo. Os resultados taxonômicos demonstraram que *L. fermentum* foi a bactéria predominante (62%), seguida de *L. murinus* (9%), *L. vaccinostercus* (9%), *L. plantarum* (2%) e *Leuconostoc sp.* (2%). A microflora mostrou-se resistente ao etanol, 64% resistiram a 10% v/v em teste de cultivo isolados. O autor simulou o processo "Fed-Batch" com reciclo de células, inoculando uma cepa de *L. fermentum* junto com as leveduras (fermento Fleishmann), durante 18 ciclos consecutivos e, após o término dos últimos ciclos, o fermento ficou seriamente comprometido e os lactobacilos cresceram copiosamente, demonstrando a sua forte capacidade competitiva às condições do meio.

2.2 Aspectos metabólicos das bactérias lácticas.

As bactérias lácticas compreendem um grupo bastante heterogêneo de organismos que são distribuídos amplamente na natureza e tem sido isoladas de várias fontes: seres humanos, animais, plantas, produtos a base de leite, vinhos e ensilagens (ORLA-JENSEN, 1919; ROGOSA, 1974). Entretanto muitas espécies parecem ter se adaptado às condições ambientais específicas e, geralmente, não foram encontradas fora de seu habitat especializado (LONDON, 1976). O metabolismo dessas bactérias explica essa seletividade ambiental.

Bioquimicamente, não possuem o ciclo de Krebs e a cadeia respiratória clássica, o que as limita a ambientes de baixa concentração de oxigênio (microaerofilia), ou mesmo ausência total (BRYAN-JONES, 1975).

STRITTMATER (1959) evidenciou o papel primário das oxidases terminais ligadas a flavinas na atividade oxidativa das bactérias lácticas. Essas enzimas flavoproteicas constituem o sistema responsável pelo transporte do oxigênio durante a oxidação de vários substratos.

As bactérias lácticas são acidófilas, limitando-se a ambientes de pH relativamente baixos, crescendo numa faixa ótima de pH 5,5 a 6,2 mas também a valores menores que 5,0. O fato deste grupo apresentar

requerimentos nutricionais complexos, restringe-os a ambientes ricos do ponto de vista nutricional. Dentre os nutrientes necessários para o crescimento estão: aminoácidos, peptídeos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sais, ácidos graxos ou ésteres de ácidos graxos e carboidratos fermentecíveis. Por esta razão os meios de cultivo para lactobacilos e leuconostoc são ricos e complexos, contendo extratos orgânicos principalmente ricos em vitaminas e peptídeos (KANDLER & WEISS, 1986).

Cada espécie apresenta requerimentos nutricionais característicos. No caso dos lactobacilos são necessárias as vitaminas: pantotenato de cálcio e niacina para a grande maioria; riboflavina para *L. delbrueckii*, *L. helveticus* e *L. casei*; tiamina é necessária para o crescimento dos heterofermentativos (*L. plantarum*, *L. fermentum* e *L. brevis*). As vitaminas B12, timidina e biotina são muito pouco exigidas entre os lactobacilos (KANDLER & WEISS, 1986).

Muitos lactobacilos requerem folato e o consumo envolve ATP ou algum outro intermediário de ligação fosfato (HENDERSON et al. 1979). *L. delbrueckii* requer fosfato de piridoxamina (Mc NUTT & SNELL, 1950) e timidina (KITAY et al. 1950).

Leuconostoc requer ácido nicotínico, tiamina, pantotenato de cálcio e biotina para todas as espécies. Cobalamina e ácido p-amino benzóico não são requeridos por nenhuma espécie (GARVIE, 1986).

Em relação ao metabolismo de carboidratos, as bactérias lácticas são consideradas sacarolíticas. Uma grande diferenciação foi feita (KANDLER & WEISS, 1986) entre os lactobacilos baseada nas características clássicas de subgêneros de ORLA-JENSEN (1919), e tres grupos foram definidos. O grupo I - lactobacilos obrigatoriamente homofermentativos que fermentam hexose quase exclusivamente a ácido láctico pela via Embden-Meyerhof, e as pentoses e gluconato não são fermentados. O grupo II - lactobacilos facultativamente heterofermentativos que fermentam hexoses como os do grupo I, exceção a poucas espécies que produzem outros ácidos em condições limitadas de glicose, pentoses são fermentadas produzindo ácido acético e láctico via fosfocetolase indu-

zível. O grupo III -lactobacilos obrigatoriamente heterofermentativos fermentam hexoses a ácidos láctico e acético (etanol) e CO₂, pentoses são fermentadas a ácido láctico e acético. Muitos carboidratos podem ser fermentados variando entre as espécies.

Para *Leuconostoc*, ramnose, melezitose, inulina, amido, glicerol, sorbitol e inositol não são fermentados. Algumas espécies produzem goma a partir de sacarose e manitol a partir de frutose (GARVIE, 1986).

Tanto *Leuconostoc* como *Lactobacillus* requerem uma grande variedade de aminoácidos e os requerimentos variam com a linhagem. *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* constituem uma exceção requerendo somente ácido glutâmico e valina (GARVIE, 1986).

Pequenas lesões genéticas no genoma bacteriano são responsáveis por requerimentos de aminoácidos em lactobacilos. Genes essenciais para biossíntese da maioria dos nutrientes parece estar presente no genoma de *L. casei* S1 e muitos deles falham na produção de proteínas funcionalmente ativas devido a uma ou poucas mutações deletéricas (MORISHITA et al. 1974, 1981).

Os seguintes aminoácidos foram considerados essenciais (MORISHITA et al. 1981) para o crescimento de *L. plantarum*, *L. helveticus*, *L. casei* e *L. acidophilus*: isoleucina (Ile), leucina (Leu), valina (Val), ácido glutâmico (Glu), fenilalanina (Phe), triptofano (Trp), metionina (Met), exceto para *L. casei*, treonina (Thr), exceto para *L. plantarum* e *L. casei*, tirosina (Tyr), ácido aspártico (Asp) e arginina (Arg), exceto para *L. plantarum*.

BARTON-WRIGHT (1952) considera para *L. arabinosus*, após comparação com diversos trabalhos, os seguintes aminoácidos essenciais: Leu, Val, Ile, Glu, Met, cisteína (Cys) e triptofano (Trp). Os não essenciais são glicina (Gly), hidroxiprolina, nor Val e nor Leu. Os estimulantes ou essenciais são Phe, Thr, Tyr, Arg e Lys. Eles concordam que todos esses aminoácidos devem estar presentes para o máximo crescimento da bactéria. Alguns trabalhos indicam que Asp, histidina (His), alanina (Ala), serina (Ser) e prolina (Pro) são acessórios ou estimulantes para o crescimento desses organismos.

HUTCHINGS e PETERSON (Cit. em BARTON-WRIGHT -1952) trocaram a caseína por Leu, Val, Glu, Asp, Ser, Trp, Lys, Arg, Phe e Tyr, no meio de cultivo obtendo o crescimento de *L. helveticus*.

Para *L. casei* os aminoácidos essenciais são Leu, Ile, Val, glutamina (Gln), asparagina (Asn), Glu, Phe, Arg, Lys, Trp, Tyr e Phe (STROBEL et al., 1989).

COLLAR et al. (1992) relacionou aminoácidos que foram consumidos durante a fermentação da massa do trigo inoculando-se bactérias lácticas. *L. brevis* consumiu Leu, Ile, Lys, Glu, Asp, ornitina (Orn), Pro, Phe e Met, detectados através da diminuição desses aminoácidos na massa de trigo.

O transporte ativo de aminoácidos é normalmente o mais utilizado pelas bactérias lácticas. Pelo menos 5 transportadores estão envolvidos no transporte de Gln, Asn, Glu/Asp (mesmo carregador), Phe ou aminoácidos de cadeia ramificada. Esses últimos parecem ter o mesmo transportador e Leu é consumida mais rapidamente que Val e Ile. Dos 10 aminoácidos requeridos para o crescimento de *L. casei* energizado com glicose, apenas Glu, Leu, Phe, Asp são consumidos rapidamente. O consumo de Leu por *L. casei* é completamente inibido pelo excesso de Val e Ile e, similar excesso de Asp inibe completamente o consumo de Glu (STROBEL et al., 1989).

Em *Streptococcus lactis* ML3 e *Streptococcus cremoris* Wg2 o consumo de glutamato e glutamina são mediados pelo mesmo sistema transportador, o qual tem 30 vezes mais afinidade por Gln do que por Glu a pH 6,0, o transporte é feito pela forma protonada dependendo apenas do pH intracelular, requerendo ATP e não pelo sistema de força próton motiva (POOLMAN et al., 1987). Aminoácidos neutros (Ser, Ala e Gly) tem sido estudados em *S. lactis* ML3 (THOMPSON, 1976) e *S. faecalis* (ASGUAR et al., 1973) e o transporte é dirigido pelo sistema de força próton motiva, com alteração do pH externo.

Em *L. casei* o transporte de Leu e Phe decresce rapidamente quando o pH é aumentado para 7,5 devido a inibição da força próton-motiva. Porém os aminoácidos Gln, Asn e Glu, são transportados rapidamente em

pH 7,7, embora o sistema de força próton-motiva esteja totalmente desativado. Semelhante ao *Streptococcus*, esses aminoácidos não são transportados pelo sistema de força próton-motiva, mas por um sistema de transporte dirigido por moléculas transportadoras com ligação de fosfato (STROBEL et al., 1989).

A capacidade de acumular vários aminoácidos em *L. arabinosus* é decrescida mais severamente pela deficiência de vitamina B₆, e em menor grau por biotina e ácido pantotênico. Isso parece estar associado a síntese anormal da parede celular a qual leva a um sistema de transporte não usual, sensível a fatores osmóticos (HOLDEN, 1964).

2.3. Efeito de compostos orgânicos no estímulo do crescimento das bactérias lácticas.

Os extratos orgânicos que participam nas formulações de meios de cultivo para o crescimento de bactérias lácticas foram bastante estudados nas décadas de 40 a 60, e representam a base das informações sobre a nutrição desse grupo. A partir desse período poucas contribuições tem sido feitas nesse sentido.

A participação do extrato de levedura no meio foi comprovada (FENEY & STRONG, 1941), levando ao aumento acentuado na taxa de crescimento de *Lactobacillus casei*. Na ausência do suprimento desse extrato, pouco ou nenhum crescimento bacteriano foi observado e Asn e Gln foram capazes de substituir o extrato de levedura. No ano seguinte esses autores identificaram a Asn como estimuladora do crescimento de vários substratos.

SMITH (1943) verificou que substâncias desconhecidas presentes no extrato de levedura eram essenciais para o crescimento de *Streptococcus lactis*. Estas substâncias não eram vitaminas conhecidas, não puderam ser substituídas por uma mistura de 23 aminoácidos, não eram precipitáveis por vários sais, eram insolúveis em solventes lipídicos e sua atividade foi destruída a 210° C.

HALVORSON & MUEDEKING (1947) compararam as taxas de fermentação de *L. casei* em meio sintético e em meio a base de extrato de levedura. Segundo os autores, vitaminas do complexo B e bases nitrogenadas (purinas e pirimidinas) não tiveram efeito no crescimento quando adicionadas no meio sintético.

A peptona foi comprovada ser estimuladora de *L. casei* por POLLACK & LINDNER (1943). IKAWA & O'BARR (1956) relataram uma grande variedade de substâncias orgânicas (extratos de levedura, fígado, carne, malte, caseína, triptona e insulina), estimuladoras do crescimento de *L. delbrueckii*, sendo os extratos de levedura e fígado os mais ativos. Produtos de degradação de ácidos ribonucleicos e peptídeos presentes na digestão enzimática de proteínas foram considerados estimuladores do crescimento, quando foram feitas purificações dos extratos. Dos compostos puros testados, ácidos uridílicos e citidílicos foram os mais ativos promotores de crescimento. Uridina e citidina foram menos ativos.

A hidrólise ácida parcial da caseína estimulou o crescimento de *L. delbrueckii* e a adição de peptídeos de His e Ser duplicaram o crescimento quando adicionados ao meio de cultivo (PETERS et al., 1953; PRESCOTT et al., 1953).

Mc ANELLY & SPECK (1957) trabalhando com *L. casei* e SPECK et al. (1958) com *S. lactis*, determinaram que peptídeos presentes nos extratos de pâncreas, fígado e levedura eram os responsáveis pelo estímulo do crescimento bacteriano.

DAHIYA & SPECK (1963) identificaram a adenina como fator estimulante do crescimento de *S. lactis* e *S. cremoris* em leite.

WEINMAN et. al. (1964) determinaram um fator de crescimento para *L. bulgaricus* denominado GBF, quando cultivado em meio basal semi-sintético. Extrato de levedura e de fígado foram as melhores fontes de GBF. Esse fator foi estável ao tratamento térmico a pH 2,5 a 11 e a exposição prolongada a luz. Ele foi destruído a pH 1,0 e formou um único componente em cromatografia em papel. Foram testados adenina, ácido ribonucleico, digestão alcalina de RNA e Mg^{++} em experimentos

individuais, porém a resposta do estímulo do crescimento foi bem inferior aos extratos de levedura e de fígado. Os autores não conseguiram identificar o composto ativo do GBF.

O extrato de levedura foi fracionado em Sephadex G-25 em 7 frações por SELBY-SMITH et al. (1975). As frações mais estimuladoras do crescimento de *S. lactis* C10 continham 70% de nitrogênio amínico, uma ampla variedade de aminoácidos e pequena soma de peptídeos. Os aminoácidos foram os maiores responsáveis pelo estímulo do crescimento bacteriano; as bases adenina, guanina, uracila, xantina e constituintes inorgânicos também contribuíam na estimulação, porém em menor grau.

Na fermentação do vinho, embora o crescimento de leveduras provavelmente inibe bactérias maloláticas pela produção de substâncias inibitórias ou remoção de nutrientes (RIBEREAU-GAYON et al., 1975), o crescimento bacteriano é estimulado por leveduras nos estágios finais do ciclo de crescimento. É provável que nutrientes são retornados ao vinho pela excreção e/ou autólise das leveduras. O termo excreção refere-se ao desprendimento de compostos do citoplasma da célula da levedura viva, que ocorre durante o consumo de açúcares após a conclusão do brotamento (DELISE & PHAFF, 1961). Células de leveduras excretam aproximadamente 1/3 do nitrogênio total absorvido na forma de aminoácidos, peptídeos, purinas, pirimidinas, etc. JOSLYN (1955) descreveu esse fenômeno com uma hidrólise enzimática intracelular dos constituintes protoplásmicos.

BEELMAN et al. (1982) estudaram as interações entre leveduras e bactérias durante a fermentação do vinho. Curvas de crescimento de bactérias (*Leuconostoc oenos*) e leveduras (*Saccharomyces*), a partir de culturas puras e mistas, indicaram que o crescimento ativo de um inibia o outro. A autólise das leveduras foi estimuladora do crescimento das bactérias maloláticas. Segundo os autores, o menor crescimento das bactérias em cultura mista, em relação ao cultivo puro, pode ter sido devido a ausência ou carência de aminoácidos.

2.4 Efeito das bactérias contaminantes na indústria sucro-alcooleira.

A indústria sucro-alcooleira sofre o efeito do crescimento de contaminantes que causam perdas de açúcar ou desviam para outros compostos, em lugar do etanol. Esses compostos representam prejuízos no rendimento industrial, podendo também causar problemas de ordem operacional, ou inibir a levedura produtora de etanol.

2.4.1 Efeito no rendimento industrial.

As perdas devido a contaminação microbiana vão desde a colheita até o processo fermentativo, de forma cumulativa, levando ao prejuízo global da indústria.

Longos períodos de armazenamento da cana levam a perdas de açúcar significativas e, também, ao aumento de contaminantes químicos e biológicos que contribuem negativamente em etapas posteriores do processo. O período máximo de estocagem depende de fatores ambientais, porém nenhuma evidência de dextrana (produto da ação de deterioradores) tem sido encontrada em cana-de-açúcar cortada com 10 horas (ANÔNIMO, 1971). Para isso é necessário um planejamento agrícola adequado conciliando a parte agrícola com o setor industrial, minimizando o tempo de permanência da cana a ser processada.

EGAN (1968) verificou que a deterioração da cana cortada com mais de um dia é muito rápida, encontrando valores de 6 a 11 % de perdas de açúcar por finais de semana, além do aumento de goma. TILBURY (1975) demonstrou que ocorre um elevado aumento de bactérias (10^5 a 10^7 cel./ml. de caldo) nos dois primeiros dias de estocagem da cana, estabilizando-se nos dias subsequentes. O mesmo autor (1970;1972) estimou uma perda média diária de 4,75% de açúcar recuperável por dia entre corte e moagem na Jamaica.

A produção de goma por microrganismos tem contribuído para perdas de açúcar e dificuldade operacionais. Essa perda, devido a produção de dextrana, pode alcançar valores próximos a 3 kg/ton em unidades

industriais (TANTOI, 1952).

TILBURY et al. (1977) e AYALA et al. (1977) consideram que o *L. mesenteroides* é o principal agente formador de goma, porém outros grupos estão associados: *Bacillus*, *Aerobacter*, *Streptococcus* (GALLI, 1961); *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae* (DUNCAN & COLMER, 1964). As espécies *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* e *B. polymyxa* também podem produzir gomas levana ou dextrana (CLAUS & BERKELEY, 1986). SILVA (1988) analisando o caldo de cana encontrou cepas de *Leuconostoc* (*L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* e subsp. *dextranicum*) e *Lactobacillus confusus* produtores de goma.

Vários autores constataram a presença de fermentações paralelas a fermentação alcoólica devido a contaminantes. Esses agentes causam perdas no rendimento fermentativo, através da produção de ácidos (acético, láctico e butírico) e gomas dextrana e levana (NEVES, 1938; ALMEIDA, 1940; GALLI, 1961).

SERRA et al. (1979) relataram perdas de 15% no rendimento fermentativo devido a contaminantes bacterianos, e AMORIM & OLIVEIRA (1981) estabeleceram uma correlação inversa entre acidez fixa do vinho e rendimento alcoólico, sendo encontrados os piores valores (60%) para uma acidez do vinho entre 5 a 6 gramas de ácido sulfúrico/litro.

ALTERTHUM et al. (1984) também demonstraram queda no rendimento fermentativo na faixa de 14 a 90% do teórico, quando a concentração de bactérias na fermentação atingiu níveis de 10^8 a 10^9 cel./ml. CRUZ et al. (1985) verificaram quedas de 10 a 40% no rendimento, associados a níveis de 10^7 a 10^8 cel./ml.

OLIVA-NETO (1990) e OLIVA-NETO & YOKOYA (1994) demonstraram a influência negativa de *L. fermentum* na fermentação alcoólica por leveduras (fermento Fleischmann) pelo processo de batelada alimentada com reciclo de células. Os lactobacilos dominaram o processo a partir do 8º ciclo chegando a níveis de 10^9 cel./ml. nos ciclos finais. Houve uma diminuição acentuada no rendimento fermentativo chegando até a 46,7% (em relação ao teórico), e a produtividade de etanol diminuiu 53,5% em relação a média dos ciclos iniciais. Essa diminuição na ati-

vidade catalítica do fermento foi atribuída a acidez que chegou a níveis acima de 6,0 g/l, expressos em ácido láctico.

2.4.2 Efeito de ácidos orgânicos nas leveduras do processo.

A ação inibitória de ácidos orgânicos sobre leveduras depende de vários fatores tais como: tipo e concentração do ácido e das leveduras usadas, sinergismo com outros produtos e pressão osmótica do meio.

SAMSON et al. (1955) estudaram o efeito inibitório de ácidos orgânicos sobre as células de leveduras e concluíram que causa uma ação bactericida e de inibição da taxa de crescimento de leveduras; depende do tipo de ácido, a ação inibitória é aumentada com o aumento do comprimento da cadeia, não há ação inibitória significativa com relação as formas das cadeias n- ou iso, necessitando de grupo polar; ocorre uma redução da ação inibitória quando o grupo hidroxila ou carbonila é introduzido na parte hidrocarboneto da molécula, e foi demonstrada a reversibilidade do efeito do ácido sobre a levedura, diminuindo a ação inibitória com a simples lavagem das células.

Segundo MAIORELLA et al. (1983), o ácido acético é solúvel nos lipídeos da membrana celular e inibe por interferência química o transporte de fosfato através da membrana. O ácido fórmico tem uma solubilidade lipídica similar ao ácido acético, sendo provável que o mecanismo de inibição seja idêntico. Já o ácido láctico como contém uma hidroxila extra, é muito menos solúvel em lipídeos do que os outros dois e a inibição ocorre em concentrações mais elevadas (10-40 g/l).

O transporte simultâneo "symport" do próton-lactato foi demonstrado por CASSIO et al. (1987) para o acúmulo de lactato no interior da célula de *S. cerevisiae* com estequiometria 1:1. A taxa de acúmulo de lactato no interior da célula depende da variação de pH de um lado para outro da membrana. Esse sistema também foi demonstrado para acetato, propionato e piruvato.

A forma não dissociada do ácido láctico pode entrar na célula de levedura por difusão simples. Contudo ocorre um aumento exponencial da permeabilidade da membrana ao ácido com o aumento do pH (CASSIO et al.

1987). PAMPULHA & LOUREIRO (1989) confirmaram que para o ácido acético, ocorre um maior efeito tóxico sobre a fermentação de *S. cerevisiae* devido ao aumento do pH.

O tipo de levedura também pode apresentar diferenças quanto ao efeito da acidez. Estudos com leveduras presentes em "saque" mostraram que estas, além de serem resistentes ao etanol, são também ao ácido láctico (20-28 g/l). DAESCHEL et al. (1988) trabalhando com cultivo misto de leveduras (*Saccharomyces*) e *L. plantarum* obtiveram a inibição completa do crescimento das leveduras em concentrações de 5,0 g/l de ácido láctico.

O efeito da pressão osmótica do meio e tamanho do inóculo na inibição de leveduras pelo ácido láctico foi estudado por NGANG et al. (1989), em cultivo a base de melão de beterraba para produção de etanol. 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 nos ensaios com ácido láctico. Para os casos de maior pressão osmótica essa taxa foi inibida a partir de 2,5 g/l de ácido láctico. Aumentando o tamanho do inóculo de leveduras diminui o efeito do ácido láctico.

PAMPULHA & LOUREIRO (1989) demonstraram que o ácido acético potencializa o efeito inibidor do etanol sobre as leveduras. Isso também foi demonstrado para ácidos octanóico e decanóico produzidos pelas leveduras (VIEGAS et al. 1989). Concentrações acima de 1% (v/v) de ácido acético diminuem a tolerância ao etanol adicionado e estreitam a faixa de temperatura para o crescimento de *S. cerevisiae* de 3-42°C. para 19-26°C. (TEREZA-RAMOS & MADEIRA-LOPES, 1990).

O aumento da produção de etanol pela acidez moderada foi obtido por vários autores sendo atribuído à inibição do crescimento celular (VEGA et al., 1987; ESSIA-NGANG et al., 1989; GUTIERREZ et al., 1991).

Em um processo de produção de etanol por células imobilizadas com concentração de 0,1 M. de ácido acético, VEGA et al. (1987) conseguiram uma maior produtividade em etanol e decréscimo no rendimento celular.

2.4.3 Floculação do fermento.

A floculação do fermento causa prejuízos ao processo fermentativo, tais como: 1) dificuldades operacionais devido a entupimentos de tubulações e centrífugas; 2) dificuldades ao combate do contaminante do processo, já que ele é retornado ao sistema junto com o fermento, levando ao aumento do gasto com ácido sulfúrico e desinfetantes; 3) gastos excessivos com anti-espumantes; 4) perdas de leveduras na centrífuga e fundo de dorna e 5) perdas no rendimento alcoólico devido ao consumo de açúcar pelo contaminante (AMDRIM & OLIVEIRA, 1982; JOLLY & PRAKASH, 1987; YOKOYA & OLIVA-NETO, 1991; OLIVA-NETO & YOKOYA, 1994).

A origem da floculação das células de leveduras pode ser devida a várias causas que podem ou não estarem relacionadas.

A presença de leveduras selvagens floculantes pode ser responsável pela floculação nas destilarias (YOKOYA, 1989), sendo amplamente estudadas e a metodologia de trabalho desenvolvida (STRATFORD & KEENAN, 1988; STRATFORD et al., 1988).

A produção de polissacarídeos como a dextrana pode causar o bloqueio das centrífugas nas destilarias devido a floculação do fermento, e parte dessa goma (50%) não é eliminada no processo de clarificação (JOLLY & PRAKASH, 1987).

Bactérias podem ser adsorvidas à parede das leveduras e causar a floculação do fermento. SERRA et. al. (1979) observaram que bactérias esporuladas (*Bacillus*) eram capazes de flocular o fermento e não eram resistentes ao tratamento ácido e, *Sporolactobacillus inulinus* além de flocular o fermento era resistente a pHs 1,9 a 2,0. Segundo os autores a presença de cápsula proteica de natureza gelatinosa, acarretou a fixação das bactérias as células de leveduras. YOKOYA & OLIVA-NETO (1991) comprovaram a capacidade de floculação do fermento por certas linhagens de *L. fermentum*. O tratamento térmico ou por protease causaram a destruição da propriedade floculadora da bactéria. A relação entre a massa de leveduras e bactérias, assim como a

faixa de pH necessários para ocorrer a floculação foram determinados. A presença de íons cálcio foi necessária para que ocorresse a floculação. O efeito de íons metálicos, carboidratos e tratamentos enzimáticos na floculação do fermento por cepas floculentas de *L. fermentum* também foi investigado por SANTOS & YOKOYA (1993). Os autores sugerem que componentes da parede celular da bactéria, resíduos de manana das células de leveduras e íons divalentes estão envolvidos nesse tipo de floculação.

2.5. Métodos de controle bacteriano na indústria sucro-alcooleira.

2.5.1 Utilização de antibióticos na fermentação alcoólica industrial

Vários trabalhos foram realizados nas décadas de 50 e 60 visando a utilização da penicilina como desinfetante da fermentação alcoólica, resultando no uso industrial desse produto com meios de origem amilácea (DAY et al. 1954) e com mosto proveniente de cana-de-açúcar (BORZANI & AQUARONE, 1957).

BORZANI (1957) verificou que o emprego da penicilina como desinfetante na fermentação alcoólica de mosto de milho promoveu um aumento de 17,2% no etanol produzido, e uma redução de 65% na acidez total do mosto fermentado. AQUARONE (1959) verificou que 500 U/l de penicilina no mosto de melão de cana originava vinhos mais ricos em etanol e menos ácidos, o que foi comprovado por MENEZES (1980) utilizando concentrações de 500-1000 U/l.

Uma das limitações para o uso contínuo da penicilina na indústria consiste na seletividade das bactérias cada vez mais resistentes e, também, na alteração do equilíbrio natural da microflora contaminante, uma vez que as bactérias Gram negativas, de uma forma geral, não são afetadas por esse agente. Uma pesquisa feita por CRUZ et al. (1985) indicou que com a adição de 500 U/l de penicilina-V-ácida no mosto, inoculado por duas linhagens de bactérias Gram positivas isoladas de destilarias, apenas uma mostrou-se sensível à droga.

Alguns trabalhos foram realizados utilizando a combinação de antibióticos como penicilina e tetraciclina (AQUARONE, 1960), e associa-

ções entre penicilina e cloranfenicol (AQUARONE, 1968).

A utilização individual de outros antibióticos também foi feita como tetraciclina no mosto de melão (AQUARONE, 1950), cloranfenicol (AQUARONE, 1959; AQUARONE & BRAZZACH, 1960 e 1963) e clorotetraciclina (TORLONI, 1958), porém sem o sucesso do emprego industrial da penicilina.

Novos antibióticos poderão ser utilizados futuramente. A nisina hoje esbarra no seu elevado custo para utilização na fermentação alcoólica. Consiste num polipeptídeo de 34 resíduos de aminoácidos, com funções de antibiótico e bacteriocina, tem se mostrado efetiva no controle de bactérias lácticas contaminantes da fermentação da cerveja. Dos Gram positivos testados por OGDEN & TUBB (1985), 92% dos lactobacilos e pediococos foram sensíveis a esse produto. A membrana celular parece ser o sítio primário de ação da nisina, alterando a permeabilidade e, com isso, ocorre a liberação de produtos intracelulares de baixo peso molecular, tais como íons e aminoácidos, causando prejuízo na regeneração do ATP. Altas concentrações de nisina (> 1000 U/ml) provocam a inibição da síntese da mureína (OGDEN & WAITES, 1986).

Outros antibióticos apresentam eficácia na redução do crescimento de bactérias lácticas porém tem sido relacionados apenas a área de saúde. BAYER et al. (1978) determinaram a concentração mínima inibitória de crescimento (CMI) e mínima bactericida (CMB) de 40 lactobacilos. A penicilina, ampicilina, clindamicina e cefalotina foram os mais ativos com 95% a 100% das linhagens inibidas.

O estudo da ação de 5 cefalosporinas em 43 lactobacilos revelou que que cefaloridina, cefazolina e cefamandole foram os mais ativos agentes inibidores do crescimento e bactericidas, especialmente em intervalos de 24 horas de incubação. A períodos mais longos o efeito bactericida sofreu significante declínio (BAYER et al. 1979).

DUTTA & DEVRIESE (1981) estudaram onze agentes promotores de crescimento em animais pelo método de diluição em agar contra 113 lactobacilos isolados de porcos, gatos e frangos. Virginiamicina (já usada na produção de etanol), oleandomicina, lincomicina, tilosina e car-

badox obtiveram os menores CMI e menor resistência bacteriana.

SWENSON et al. (1990) determinaram a susceptibilidade de 85 linhagens incluindo os gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus* a 24 agentes antimicrobianos. Nenhum dos microrganismos foi resistente a imipenem, minociclina, cloranfenicol, gentamicina ou daptomicina.

2.5.2 Tratamento ácido do fermento.

Segundo AQUARONE (1976) mais de 90% das indústrias de fermentação alcoólica utilizavam ácido sulfúrico e fenóis halogenados como controladores dos contaminantes e esses métodos foram considerados antieconômicos. Atualmente a lavagem ácida do fermento continua sendo o principal método de controle não só dos contaminantes, mas principalmente, da floculação do fermento.

Segundo BOVI & MARQUES (1983) o tratamento com ácido sulfúrico é feito reduzindo o pH do fermento diluído em água a uma faixa entre 2,0 a 3,0 e, as vezes pH até inferior a 2,0 com prejuízo na viabilidade das células de leveduras. O fermento é mantido na cuba e são adicionados ácido sulfúrico e água, em constante agitação. O tempo de permanência do fermento durante o tratamento é variado (até 3 horas). Quanto maior for esse tempo maior será a redução da viabilidade celular.

SIMPSON & HAMMOND (1989) estudaram a resposta de lavagem ácida em leveduras de cervejaria e concluíram que: 1) as leveduras são altamente resistentes às condições de acidez, mas o aumento de temperatura e a concentração de etanol diminuem a sua capacidade de resistência; 2) os ácidos fosfórico, cítrico e sulfúrico, e o persulfato de amônio podem ser usados eliminando as bactérias contaminantes da suspensão de leveduras. 3) O persulfato de amônio pode modificar as propriedades de floculação das leveduras.

2.5.3 Biocidas usados na produção de etanol.

O uso principal dos biocidas para produção de etanol tem sido na desinfecção de moendas. Porém, vários produtos químicos são utilizados no controle biológico da fermentação, geralmente associados a lavagem

ácida do fermento e, as vezes, também a antibióticos.

Os fenóis halogenados tiveram um importante papel como desinfetante na fermentação alcoólica industrial. GAI (1945) e ALMEIDA & LIMA (1953) estudaram o efeito do pentaclorofenol e pentaclorofenato de sódio, e obtiveram uma melhora na fermentação alcoólica com a inibição de bactérias contaminantes.

SATO et al. (1980) demonstraram que o uso do hexaclorofeno (4 mg/l) ou cloranfenicol (3 mg/l) resultaram em maiores rendimentos em álcool (10 a 12% superiores ao sem tratamento), e menos acidez do vinho em relação ao controle, sendo que o primeiro também demonstrou eficácia na recuperação de mostos contaminados.

Derivados de triazina (fenol não clorado) foram estudados por BRAUNBECK (1988) e não foi constatado o efeito acumulativo em tres ciclos fermentativos. Houve uma diminuição da viabilidade das leveduras (*S. cerevisiae*) mas não afetou o rendimento alcoólico.

RODINI (1989) verificou a ação da penicilina e pentaclorofenol em bactérias do gêneros *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* e

Acinetobacter. Este último cresceu em concentrações de até 40 ppm de penicilina e 100 ppm de pentaclofenol. As bactérias dos outros gêneros testados foram resistentes a 40 ppm de penicilina e foram eliminadas por 100 ppm de pentaclorofenol. Esses resultados são atípicos em relação as dosagens usadas na prática industrial (5-15 ppm) e trabalhos de outros autores já citados, podendo estar associados a resistência dos microrganismos ou a metodologia empregada.

O fenol não clorado Quimatec MA inibiu o brotamento das células de leveduras indicando ser tóxico para elas na concentração de 40 ppm. Esse produto proporcionou um aumento no rendimento da fermentação sendo atribuído ao controle do brotamento das leveduras pelo biocida (BRAUNBECK et al. 1989).

Apesar da grande eficiência dos fenóis clorados atualmente eles estão proibidos para uso na produção de açúcar e álcool devido a sua forte toxicidade e poder cumulativo.

Dentre quatorze biociadas selecionados em testes de laboratório para avaliação da redução de perda de açúcar na moenda, os produtos a base de quaternário de amônia indicaram serem os mais efetivos com possibilidade de redução da taxa de perda de açúcar acima de 58% (TIL-BURY et al. 1977). Porém, quando foram feitos testes industriais, o tratamento com produto a base de biguanida polimérica resultou em maior economia de açúcar. Esses resultados apontam a diferença entre testes laboratoriais e a prática industrial, demonstrando a importância de métodos em escala laboratorial que simulem as condições industriais.

CEREDA et al. (1981) propuseram um nova metodologia para avaliação de desinfetantes usados na fermentação alcoólica. O método foi adaptado a partir do método oficial da A.O.A.C. para desinfetantes e do método de diluição em tubos empregado na avaliação de antibióticos. Vários desinfetantes utilizados na indústria alcooleira foram testados e, os mais eficazes foram os produtos a base de quaternários de amônia e fluoretos, seguidos dos organo-sulfurosos e os menos eficazes - os ditiocarbamatos.

BRAUNBECK (1988) e ROSALES (1989) também demonstraram o efeito positivo do quaternário de amônia no controle bacteriano da fermentação alcoólica. Esse último autor detectou diminuição nas contagens de *Bacillus subtilis*, através da combinação de penicilina e compostos quaternários de amônia. Foram testadas formulações a base de 2(tiocianometil) benzotiazol (30%) e, esse composto (5%) associados com 2 hidroxietil 2,3 dibromopropionato (25%). Essa última formulação se mostrou viável para uso industrial melhorando o rendimento fermentativo (FURLETTI et al., 1981).

OLIVEIRA et al. (1982) estudaram o desempenho do Busan 881 (Buckmann Lab.) como controlador da infecção na fermentação alcoólica em mosto de cana-de-açúcar, inoculando culturas de bactérias existentes no vinhoto. Esse produto foi mais eficiente quando colocado na fase inicial do processo fermentativo, obtendo maior teor alcoólico e menor acidez em relação ao controle. Estudos sobre a ação desse biocida

(ROSALES et al. 1983), com dosagem de até 440 ppm, não demonstraram variações estatisticamente significativas do índice de viabilidade das leveduras. Concentrações de 1100 ppm do produto apresentaram prejuízos no processo fermentativo. Os mesmos autores testaram esse produto dois anos depois nas concentrações de 20 e 30 ppm e obtiveram índices de viabilidade das células de leveduras superiores a 94%, demonstrando novamente a não interferência do produto sobre a levedura.

Experimentos com formulações a base de carbamatos (dimetilditio-carbamato de sódio - 15% e etilenobisditio-carbamato de sódio - 15%) foram realizados com sucesso na dosagem de 17,8 ppm no tratamento do caldo de moenda de cana-de-açúcar, evitando a perda de 0,82% de açúcar produzido, justificando o uso desses produtos no controle da contaminação microbiana (ONNA & KASHIMOTO, 1989).

A pesquisa de formas alternativas de controle dos contaminantes na indústria sucro-alcooleira tem sido limitada, o que dificulta a diminuição do custo de fabricação do etanol. Radiações gama foram utilizadas por VAN ZELLER et al. (1984) na estocagem de xarope de cana-de-açúcar. Os autores demonstraram que após 105 dias de armazenamento do produto, houve perdas de 15% de açúcar na testemunha, enquanto que as perdas no xarope irradiado com dosagem de 10 Kgy foram de apenas 1%.

O uso do ultrassom no tratamento da água de torre de resfriamento (usina Santo Antonio - SP), mostrou-se eficaz no controle microbiológico, diminuindo os custos com anti-corrosivos e biocidas usados de forma convencional (MASSON & BALBO-NETTO, 1991).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenvolvimento do meio de cultivo para bactérias lácticas.

A escolha do meio para o crescimento de bactérias lácticas e leveduras foi feito através de testes de diversas formulações (TABELA 1), utilizando-se caldo de cana desidratado como constituinte básico e realizando-se cinco repetições.

Os microrganismos utilizados no teste foram: *Saccharomyces cerevisiae* CCT 0472, *Leuconostoc mesenteroides* CCT 0367 e *Lactobacillus fermentum* CCT 1400, isolados de destilarias de álcool; além das linhagens *Leuconostoc mesenteroides* CCT 0582 e *Lactobacillus fermentum* CCT 0559, ambas do ATCC (American Type Culture Collection).

A inoculação das culturas foi feita de acordo com a técnica de SMITH (1943), através de culturas com 24 a 48 horas de incubação, obtidas após crescimento em meio líquido Man, Rogosa e Sharpe (MRS) - Difco. A transferência para o meio teste foi feita, assepticamente, com 0,01 ml da suspensão de células crescidas em 24 horas. Os tubos inoculados foram incubados em estufa 30° C. e as leituras efetuadas nos tempos de 24 e 72 horas. As culturas que cresceram sofreram novas transferências para o meio teste pelo menos 5 vezes. A diluição resultante dessas transferências removeria qualquer contaminação de substâncias do meio original. O crescimento foi medido através da leitura da absorbância (KOCK, 1970) a 600 nm em espectrofotômetro (Baush and Lomb mod. Spectronic 20).

3.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI).

A técnica empregada para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) foi baseada na adaptação do método de macrodiluição em caldo (JONES et al., 1985) utilizando o meio com a formulação de nº 3 (TABELA 1), ao invés do meio Muller-Hinton,

TABELA 1 - Formulações dos meios de cultivo a base de caldo de cana desidratado (rapadura), quantidades expressas em g/l de água destilada, pH final 6,5.

componentes	formulações						
	1	2	3	4	5	6	7
Rapadura	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0
Peptona	10,0	10,0	-	-	-	10,0	10,0
Extr. carne	-	-	-	-	-	-	2,50
Extr. levedura	5,00	5,00	5,00	-	-	-	5,00
Citr. Amônia	2,00	2,00	-	-	2,00	2,00	2,00
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,205	-	-	-	0,205	0,205	0,205
MnSO ₄ · H ₂ O	0,056	-	-	-	0,056	0,056	0,056
Na ₂ HPO ₄	2,00	-	-	-	2,00	2,00	2,0

com pHs 4,5 e 6,5, corrigidos com HCl 0,1 N ou NaOH 0,1N . O inóculo também foi adaptado sendo utilizadas as cepas descritas no item 3.1, com padronização do crescimento seguindo a técnica (padrão McFarland nº 0,5) . Os testes foram executados com 3 repetições e a incubação foi feita a 30^o. C., com leituras de turbidez a 600 nm (espectrofotômetro Baush and Lomb mod. Spectronic 20) entre 15 e 24 horas.

A seleção dos produtos testados foi feita com base naqueles utilizados industrialmente, além de outros agentes descritos em literatura. Foram escolhidos os antibióticos penicilina V-ácida (Squibb), cefamandole (Sigma) e clindamicina (Upjohn); a enzima lisozima (Sigma), os sais fosfato de sódio monobásico P.A. (Eci-bra), sulfato de cobre 5 H₂O P.A. (Vetec), sulfito de sódio P.A. (B. Herzog), tripolifosfato de sódio P.A. (Cinética Química Ltda.) e nitrito de sódio P.A. (MB Lab. Quím.). Os ácidos sórbico P.A. (Fluka, AG) e fólico P.A. (ICN Pharm.), tanino (Sigma). Os surfactantes quaternário de amônio (Indústrias Químicas Araújo) e lauril sulfato de sódio (Hoechst).

Dos biocidas foram testados o etileno bis-ditiocarbamato de manganês e zinco (Dithane-Mancozeb), 3-metil 4-cloro fenol (Preventol CMK - Bayer), 2 benzil 4 clorofeno (Preventol BP - Bayer), o-fenil fenol (Preventol o-extra - Bayer), benzil álcool mono polihemiformol (Preventol D2 - Bayer), bromofenato (Biopen 400 - Aquatec), organosulfuroso (Biopen 320 - Aquatec), tiocianato (Busan 110 - Buckmann), dimetilditiocarbamato (Busan 85 - Buckmann Lab.), metilditiocarbamato (Busan 40 - Buckmann Lab.), 2 cloro acetamida (Sigma), formaldeído P.A. (Cinética Química Ltda.), triclorocarbanilida (Bayer).

3.3 Testes de fermentação alcoólica por leveduras na presença de *Lactobacillus fermentum*.

Os testes de fermentação foram conduzidos através de bateladas sucessivas com reciclo de células em frascos de centrífuga de 1 litro com tampa rosqueável, contendo um volume de 500 ml. de mosto constituído de "high test molasses" (HTM) a 18° Brix (item 3.3.1) e 200ml. de suspensão de inóculo (3.3.2). Após os frascos serem alimentados, eles foram levemente rosqueados e incubados com agitação orbital a 150 rpm (rpm= rotações por minuto) a 30°C. Cada ciclo fermentativo tinha duração de 20 horas, exceto o teste de avaliação do efeito do tempo de fermentação que foi feito em 12 horas. Após o término da fermentação o vinho era centrifugado a 2200 X g (g= força gravitacional) por 30 minutos, em centrífuga refrigerada (International Equip. Mod. B-20A), exceto no teste onde foram testados os efeitos das velocidades de centrifugação 870 X g e 5000 X g. Em seguida o inóculo era preparado para um novo ciclo e alimentado com mosto. O tratamento controle foi realizado com 2200 X g e 20 horas de fermentação.

Os ensaios de fermentação foram feitos em duplicatas ou triplicatas dependendo do teste e o tratamento controle foi realizado em todos os ensaios, exceto no teste de lavagem do fermento onde os tratamentos (controle, lavagem e lavagem e extrato de levedura) foram submetidos a um tempo de ensaio de 12 horas; e no teste da velocidade de centrifugação do fermento que foi realizada com 870 X g ou 5000 X g, e não com 2200 X g como nos tratamentos controle.

A técnica de reciclagem do fermento através da centrifugação foi escolhida para este trabalho, pois permite simular o processo intermitente praticado na indústria, e fornece resultados mais próximos da prática industrial, já que do contrário, com apenas um único ciclo, não seria possível observar importantes transformações bioquímicas e microbiológicas que ocorrem no processo in-

dustrial.

3.3.1 - Preparo e alimentação do mosto

Para o preparo do mosto utilizou-se "high test molasses" (HTM), de forma a obter uma concentração 18° Brix. Suplementou-se o mosto com 1,0 g/l de sulfato de amônia como fonte de nitrogênio e o pH corrigiu-se para 5,5 com HCl 0,1N. Procedeu-se desta forma para o tratamento controle e todos os ensaios fermentativos, exceto nos testes onde foram testados o efeito de compostos nutricionais, os quais foram complementados.

Dentre os nutrientes complementados estão: o extrato de levedura (0,075 a 10 g/l) ou o conjunto dos seguintes aminoácidos puros: Conforme descrição do meio sintético para bactérias lácticas (DIFCO, 1984): dl-Ala (0,400 g/l), l-Arg (0,484 g/l), l-Asp (0,200 g/l), l-Lys (0,100 g/l), l-Glu (0,600 g/l), Gly (0,200 g/l), l-Hys (0,124 g/l), dl-Phe (0,200 g/l), l-Pro (0,200 g/l), dl-Ser (0,100 g/l), dl-Thr (0,400 g/l), dl-Trp (0,080 g/l), l-Tyr (0,200 g/l), dl-Val (0,500 g/l), l-Leu (0,250 g/l), dl-Ile (0,500 g/l), dl-Met (0,400 g/l), l-Hys (0,200 g/l) e l-Cys (0,100 g/l).

Alimentou-se o mosto em duas etapas, adicionando-se 250 ml por frasco no início da fermentação e, após 2 horas de fermentação, completava-se com mais 250 ml. em cada frasco. Este procedimento evitou a inibição pelo substrato que ocorre com concentrações acima de 150 g/l (JONES et al. 1981).

3.3.2 Preparo do inóculo

O inóculo para o 1o. ciclo foi preparado para cada frasco, com 35g de massa úmida de fermento Fleischmann e, 2 g de massa úmida de *Lactobacillus fermentum* CCT 1407 obtida de cultivo de 24 horas, ambos misturados e diluídos com água destilada para um volume final de 200 ml., exceto no teste onde foi avaliado o efeito

da adição do contaminante, quando foi introduzido apenas o fermento. Nos ciclos seguintes o inóculo foi obtido da massa centrifugada do ciclo anterior ressuspensa em água destilada até completar o volume de 200ml. O tratamento controle referente a todos os ensaios de fermentação foi realizado com o inóculo obtido da mistura de fermento e *Lactobacillus fermentum* acima descrita.

3.3.3 Contagem de leveduras e bactérias.

A partir de amostras de 6 ml do inóculo de cada ciclo foram feitas contagens de leveduras e bactérias utilizando-se a técnica de plaqueamento (SPECK, 1978) com os respectivos meios: agar de contagem padrão - PCA (Difco) mais cloranfenicol e tetraciclina 0,01% cada, e o meio agar MRS (Difco) com actidiona 0,01%.

3.3.4 Análise da acidez e pH.

Através da coleta de 10ml de vinho delevurado no final da fermentação foram realizadas as análises de pH e acidez total. O pH foi medido potenciometricamente (Corning Scientific Instruments, mod. 110) e a acidez total (a soma da acidez produzida, do mosto e a do inóculo), pela titulação com NaOH 0,1 N padronizado (AOAC, 1984). Os resultados da acidez foram expressos em g/l de ácido láctico calculado pela seguinte equação:

$$\text{acidez} = \frac{\text{ml. NaOH } 0,1\text{N} \times 9,008 \times \text{fator correção NaOH}}{\text{volume amostra (ml)}}$$

3.3.5 Análise de viabilidade e brotamento das leveduras.

A viabilidade e brotamento das células de leveduras foram determinadas a partir de vinho levedado com 10 horas de fermentação, através da contagem microscópica em câmara de Neubauer pela técnica de coloração com azul de metileno (LEE et al. 1981). Os resultados da viabilidade e brotamento foram ambos expressos em porcentagem em relação ao número total de células contadas.

3.3.6 Análise de Açúcares Totais.

A determinação da concentração de açúcares totais (ART) foi feita a partir de amostras de 10 ml de vinho centrifugado, após a coleta, retiradas após 10 horas de fermentação. A hidrólise foi feita misturando 1 ml. da amostra com 1 ml. de HCl 2N em banho-maria a 100°C. durante 5 minutos. Depois de resfriada, 1 ml de NaOH 2N foi adicionado. ART foi determinado pelo método de redução do ácido dinitrossalicílico (Miller, 1959).

3.3.7 Análise de etanol.

Para determinação de etanol, amostras de vinho centrifugado foram retiradas após 10 horas de fermentação. A concentração de etanol foi determinada por cromatografia gasosa (CG Instrumentos Ltda. - São Paulo, mod. CG 37 D) com coluna Porapak Ps e integrador CH 20. As condições de operações foram: fluxo de gas (nitrogênio) = 30 ml/min.; temperatura de vaporização e do detector 210°C.; temperatura da coluna = 122°C.; atenuação = 2; intervalo eletrométrico = 10^{-1} A/mV. A curva de calibração foi obtida por padronização externa com solução de etanol.

3.3.8 Determinação quantitativa de aminoácidos.

A determinação de aminoácidos totais foi feita com amostras de vinho deleiturado no término da fermentação através da técnica de cromatografia em papel, revelação com ninidrina e eluição em álcool etílico 99,5 GL. A análise quantitativa da mistura aminoácidos-ninidrina eluída foi realizada através de espectrofotometro Baush and Lomb- modelo Spectronic 20 (DABRAL et al., 1989).

3.4 Testes de aplicação do Desfloc imobilizado em alginato de cálcio.

O Desfloc (biocida formulado com o agente 3,4,4' tricloro-carbanilida) foi imobilizado com as concentrações de 20 g de alginato de sódio e 20 g de Desfloc em 1000 ml de água destilada. Essa mistura foi adicionada gota a gota em uma solução de 20 g/l de CaCl_2 sob agitação. As partículas sólidas formadas permaneceram 24 horas na solução de CaCl_2 a fim de se compactarem. Em seguida, as mesmas foram lavadas com água destilada e armazenadas em geladeira, umidecidas, até a execução do teste.

A adição do potencializador (lauril sulfato de sódio) foi feita na mistura inóculo e mosto, no início da fermentação, em concentrações de 5,0 mg/l nos primeiros 5 ciclos tratados, e 1,67 mg/l nos demais.

3.5 Avaliação dos requerimentos nutricionais de *Lactobacillus fermentum*.

Para a formulação do meio de cultivo basal dos testes de avaliação dos requerimentos nutricionais foi utilizado caldo de cana-de-açúcar desidratado (rapadura) a 4% em água destilada, acrescido dos sais minerais e diversos nutrientes:

- extrato de levedura, triptona, peptona e ácido casamínico - 1% cada.
- vitaminas (DIFCO, 1984): piridina (2 ug/ml), ácido nicotínico (2,0 ug/ml), tiamina (1,0 ug/ml), pantotenato de cálcio (1,0 ug/ml), ácido para-amino-benzóico (0,20 ug/ml) e ácido fólico (0,020 ug/ml).
- aminoácidos - ídem aos já relacionados no item 3.3.1
- sais (MAN et al., 1960): $MnSO_4 \cdot 1 H_2O$ (0,629 g/l), $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ (2,33 g/l), acetato de sódio (57,1 g/l) e citrato de amônia (22,9 g/l).

A formulação do meio foi feita adicionando-se cada nutriente teste no meio basal e esterilizando-se a 121°C/10 min (DIFCO, 1984).

A inoculação foi feita com culturas crescidas entre 24 a 48 horas de *Lactobacillus fermentum* CCT 1400, 1407 e 0559, seguindo dois procedimentos. Para a maioria dos testes de avaliação dos fatores nutricionais foi utilizado o método de transferências sucessivas (SMITH, 1943) descrito no item 1, com leituras de 18 e 24 horas. O segundo método consistiu de lavagens da suspensão de células por três vezes, assepticamente, com solução salina 0,9% estéril. Após a centrifugação em condições refrigeradas (International Equip. Mod. B20-A) as suspensões bacterianas foram padronizadas seguindo o padrão McFarland nº 0,5 de absorbância (JONES et al, 1985). Os testes foram executados com 3 repetições. A incubação foi feita a 30°C e a leitura de turbidez foi feita, com assepsia, em até 50 horas. O crescimento foi medido através da leitura da turbidez a 600 nm em espectrofotômetro (Baush and Lomb mod. Spectronic 20) em ambos os procedimentos acima citados.

3.6. Cálculo da Eficiência da Fermentação Alcoólica e Análise Estatística.

3.6.1 Cálculo da Eficiência da Fermentação Alcoólica (E).

A Eficiência da Fermentação Alcoólica (E) é dada pela seguinte fórmula:

$$E = \frac{Ce_{10} * Vv}{Ce \text{ teórica} * Vs}$$

onde: $Ce \text{ teórica} = 0,511 * So$.

So = concentração de açúcares totais (ART) no substrato, expresso em g/l de glicose.

Ce_{10} = concentração de etanol no vinho após 10 horas de fermentação, expresso em g.

0,511 = coeficiente de conversão estequiométrica da massa de glicose em etanol.

Vv e Vs = Volume do vinho centrifugado e do mosto em litros, respectivamente.

3.6.2 Análise Estatística.

Os resultados dos tratamentos executados nos testes de fermentação foram analisados estatisticamente através do programa estatístico Graphpad InStat (Rutgers University). Foram utilizados os testes de análise de variância - ANOVA (One Way Analysis of Variance) e o teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer, quando tratava-se de mais de três conjuntos de dados, e o teste t não pareado, quando apenas dois conjuntos de médias eram analisadas. Quando o programa recomendava testes não paramétricos, eram feitos os testes de Mann-Whitney entre dois conjuntos de dados, e o teste Kruskal-Wallis para três conjuntos ou mais. O nível de significância adotado pelo programa é de 5%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação de parâmetros da fermentação com a adição inicial de *L. fermentum*.

Para caracterizar a influência das bactérias lácticas na fermentação alcoólica foi desenvolvida uma técnica, onde a fermentação do HTM (high test molasses) por leveduras de panificação foi contaminada inicialmente por *Lactobacillus fermentum* e os parâmetros foram avaliados ao longo de sucessivos ciclos fermentativos. A viabilidade das leveduras (TABELA 2 e FIGURA 1) sofreu uma queda inicial característica, devido a adaptação às condições do processo ao etanol. Após essa queda, houve um período de estabilização (em torno de 80%), sofrendo uma segunda queda após o 9º ciclo. Houve diferença significativa entre as médias do 2º e 3º ciclos (92,1%), e o 4º, 5º e 6º (83,7%), em relação aos tres últimos (77,6%), com $P < 0,0001$ (análise de variância e teste de Tukey-Kramer).

A média da porcentagem de brotos vivos (TABELA 3 e FIGURA 2), entre o 2º e 5º ciclos (8,08%) e os tres últimos ciclos (2,89%), revelou uma diminuição significativa, com $P < 0,001$ (análise de variância e Tukey-Kramer). Entre os brotos mortos (TABELA 4 e FIGURA 2) houve um aumento significativo entre o 2º e 6º ciclo (1,15%) e os tres últimos (1,86%), no teste de análise de variância e Tukey-kramer ($P < 0,05$).

O número de leveduras também sofreu diminuição nos ciclos finais (TABELA 5 e FIGURA 1). O log da média do número de células de leveduras no inóculo apresentou diminuição significativa, entre o 5º e 7º ciclos (9,08) e os ciclos finais (8,945) com $P < 0,01$ (Kruskal-Wallis e teste de Dunn). Em relação as bactérias (TABELA 6 e FIGURA 2) houve uma queda ($P < 0,05$) entre os tres primeiros (8,724) e os tres ciclos seguintes (8,598), e um aumento entre o 7º e 10º ciclos (8,667), acen- tuando-se nos ciclos finais (8,828).

As médias do pH (TABELA 7 e FIGURA 2) no 3º e 4º ciclos (3,45) e 5º ao 7º ciclos (3,42) foram significativamente maiores que entre o 11º ao 13º ciclos (3,30) (análise de variância e Tukey-Kramer-

$P(0,0001)$.

A análise dos resultados do tratamento padrão com adição de levedura e bactéria (controle) de alguns ensaios de fermentação estão reunidos na TABELA B. Cada variável foi agrupada em duas fases, na primeira houve queda e na segunda, houve um elevado crescimento das bactérias e o consequente aumento da acidez. A viabilidade das leveduras sofreu uma queda inicial e, em seguida, um período de estabilização (segunda fase) entre 44 a 90%, sofrendo uma segunda queda nos ciclos finais. Comportamento semelhante foi observado no índice de brotos vivos que se estabilizou entre 2 a 14% na segunda fase. A taxa de brotos mortos aumentou na segunda fase (1,13 a 7,72%), principalmente nos ciclos finais.

O número de células de leveduras no inóculo ficou entre 48 a 150 $\times 10^7$ u.f.c./ml. na primeira fase e diminuiu para 23,0 a 124 $\times 10^7$ u.f.c./ml. na fase seguinte. A população de bactérias sofreu queda acentuada na primeira fase, variando entre o máximo de 159 $\times 10^7$ e mínimo de 15 $\times 10^7$ u.f.c./ml. Na segunda fase, houve um aumento das bactérias de 24 $\times 10^7$ (mínimo) para 186 $\times 10^7$ u.f.c./ml. (máximo).

A acidez e pH mostraram-se relacionados ao comportamento bacteriano. A acidez apresentou valores máximo e mínimo na primeira fase, respectivamente, 6,19 e 3,12 g/l, e na segunda, chegou a 7,20 g/l, tendo nessa fase os maiores valores nos ciclos finais. O pH na primeira fase sempre foi superior a 3,00, e na segunda oscilou entre 2,81 a 3,64, com os menores valores nos ciclos finais.

O efeito inibidor da acidez orgânica sobre o metabolismo das leveduras foi analisado comparando-se a fermentação com e sem controle bacteriano. Houve diferença significativa das médias da viabilidade das leveduras (ANOVA $P(0,0001)$ e Tukey-Kramer $P(0,001)$ nos últimos ciclos (TABELA 47) com 47,1% (controle) e 87,9% (tratamento com desinfetante). A queda na eficiência da fermentação alcoólica ficou evidenciada quando comparadas as médias entre o 6º e 8º ciclos, na presença de extrato de levedura no mosto (55,4%), em relação ao tratamento com um desinfetante e extrato de levedura (66,9%).

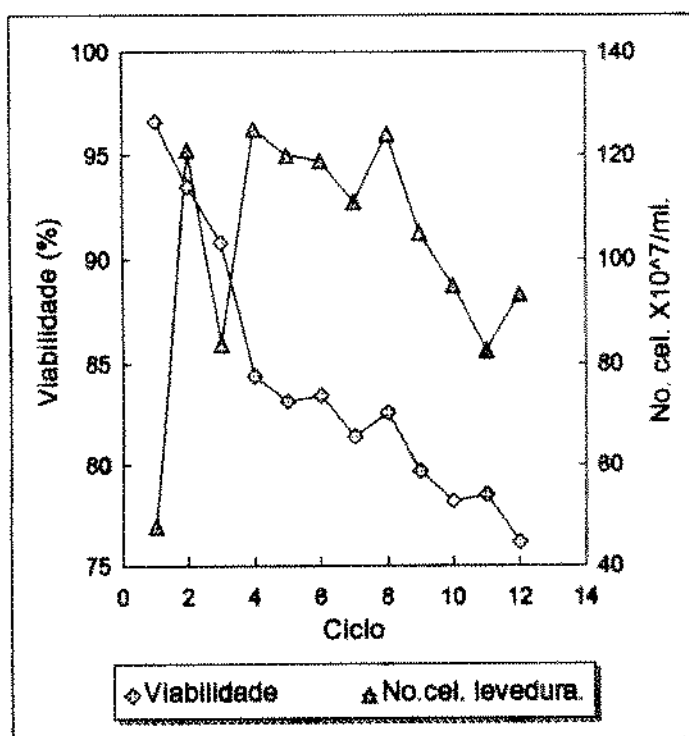


FIGURA 1 - Viabilidade e número de leveduras no inóculo no teste de avaliação dos parâmetros da fermentação (média de 3 repetições).

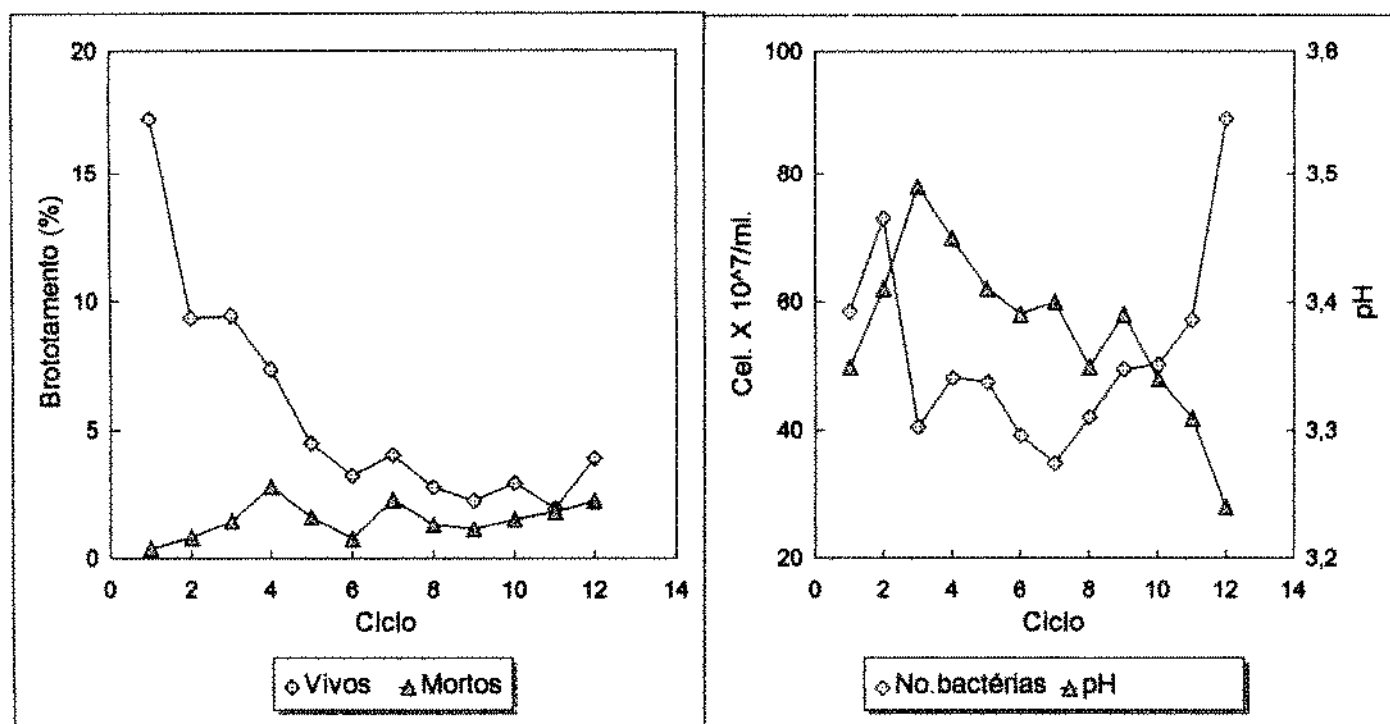


FIGURA 2 - Porcentagem de brotamento das leveduras, número de bactérias viáveis e pH do vinho no teste de avaliação dos parâmetros da fermentação (média de 3 repetições).

Houve um significativo aumento da eficiência da fermentação alcoólica (ANOVA $P(0,0001)$ e Tukey-Kramer ($P(0,001)$) no tratamento com desinfetante e extrato de levedura.

O efeito prejudicial de ácidos orgânicos sobre as leveduras foi constatado por vários autores. MAIORELLA et al. (1983) constataram um decréscimo de 80% na população de *Saccharomyces cerevisiae* crescidos em meio sintético com 40 g/l de ácido láctico. O cultivo misto de *Saccharomyces cerevisiae* com *Lactobacillus plantarum* na fermentação de suco de repolho revelou uma inibição total do crescimento das leveduras quando a acidez era de 5,0 g/l (DAESHEL et al., 1988).

Vários fatores influenciam no efeito da acidez orgânica sobre as leveduras, tais como a pressão osmótica do meio, o tipo do ácido, o tamanho da população e adaptação das leveduras a esse ambiente. Diferentes linhagens de leveduras de produção de "sake" sobrevivem a concentrações acima de 20 g/l de ácido láctico (INDUE et al., 1962). Melão com pressão osmótica de 1,3 inibiu em 30% o crescimento de leveduras e 20% para pressão de 0,6, concentrações superiores a 10g/l de ácido láctico e pressão osmótica baixa, levaram a uma forte queda na produção de álcool (ESSIA-NGANG et al., 1989).

OLIVA-NETO (1990) e OLIVA-NETO & YOKOYA (1994) testaram a fermentação alcoólica de HTM (high test molasses) por leveduras de panificação, pelo processo "fed-batch", na presença de *L. fermentum*. O comportamento das bactérias e das leveduras foi muito semelhante ao encontrado neste trabalho e os níveis de acidez láctica acima de 5,0 g/l foram atribuídos ao aumento dos lactobacilos na segunda fase, sendo responsáveis pela inibição do crescimento das leveduras. O efeito da acidez e do etanol combinados podem causar uma forte inibição do metabolismo das leveduras (PAMPULHA & LOUREIRO, 1989; VIEGAS et al. 1989; TEREZA-RAMOS & MADEIRA-LOPES, 1990) e, provavelmente, foram os responsáveis pela inibição da viabilidade e brotamento das leveduras nos ciclos iniciais no presente trabalho. Na fase final dos ensaios de fermentação, onde as leveduras já estavam mais adaptadas ao etanol, o fator responsável pela segunda queda das condições vitais das leveduras

foi atribuído ao aumento acentuado da acidez provocado pelo crescimento das bactérias.

4.2. Avaliação de fatores envolvidos no estímulo do crescimento de bactérias lácticas na fermentação alcoólica.

A infecção bacteriana da fermentação alcoólica pode ser estimulada por vários fatores: qualidade da cana, tempo de estocagem da cana a ser moída, assepsia na moenda e tratamento do caldo e fatores operacionais (temperatura nas dornas, centrifugação do fermento, tempo de fermentação e tratamento do fermento centrifugado). Outros fatores menos evidentes, porém importantes, são os nutrientes liberados pelas próprias leveduras durante a fermentação, que podem estar associados a permanência dos contaminantes no processo.

4.2.1. Efeito da adição de nutrientes.

4.2.1.1 - Adição de 10 g/l de extrato de levedura.

A adição de alta concentração de extrato de levedura no início da fermentação (10 g/l) trouxe como consequência uma queda acentuada na população de leveduras, sinalizada pelo índice de viabilidade que chegou a valores inferiores a 5%, juntamente com a porcentagem de brotos vivos no 4º e 5º ciclos (TABELAS 9 e 10 e FIGURA 3), e brotos mortos com média de 23,0% no 4º ciclo. (TABELA 11 e FIGURA 3). O número de células viáveis (TABELA 12 e FIGURA 4) também foi muito baixo, praticamente zero nestes dois ciclos, restabelecendo-se lentamente nos ciclos finais. A população bacteriana que no tratamento controle não ultrapassou 175×10^7 u.f.c./ml. ao longo dos 9 ciclos, chegou a 679×10^7 u.f.c./ml. no 6º ciclo (TABELA 13 e FIGURA 4). Comportamento semelhante ocorreu com a acidez, que também chegou a valores extremos como 14,5 g/l, no 5º ciclo, contra menos da metade (6,89 g/l) no tratamento controle (TABELA 14 e FIGURA 5). O pH também estava associado ao aumento da acidez e número de bactérias já que o menor valor $\text{pH}=2,10$, ocorreu no tratamento com extrato de levedura no 5º e 6º ci-

clos, contra pHs entre 2,61-2,88, nestes ciclos, no tratamento controle (TABELA 15 e FIGURA 5).

4.2.1.2 Adição de diversas concentrações de extrato de levedura.

Várias concentrações de extrato de levedura foram testadas na fermentação alcoólica a fim de determinar o efeito quantitativo desse produto na estabilização da fermentação, já que 10 g/l afetou drasticamente o processo.

A FIGURA 6 mostra o efeito do extrato de levedura com concentrações de 0,60 a 5,0 g/l causando a queda rápida e acentuada da viabilidade das células de leveduras, com 16% para o tratamento com 0,60 g/l e menos que 5% para concentrações superiores. Os tratamentos com 0,20 g/l e controle apresentaram viabilidades de aproximadamente 50%. A reprodução das leveduras também foi seriamente afetada após 4 ciclos, quando não havia mais brotos vivos e uma taxa de 35% de brotos mortos (FIGURA 7).

Quanto à acidez do vinho (FIGURA 8), houve um aumento proporcional à quantidade de extrato de levedura adicionada na fermentação. Exceto para o tratamento com 0,20 g/l, que praticamente não apresentou diferenças em relação ao controle, os demais tratamentos causaram um aumento muito acentuado da acidez do vinho.

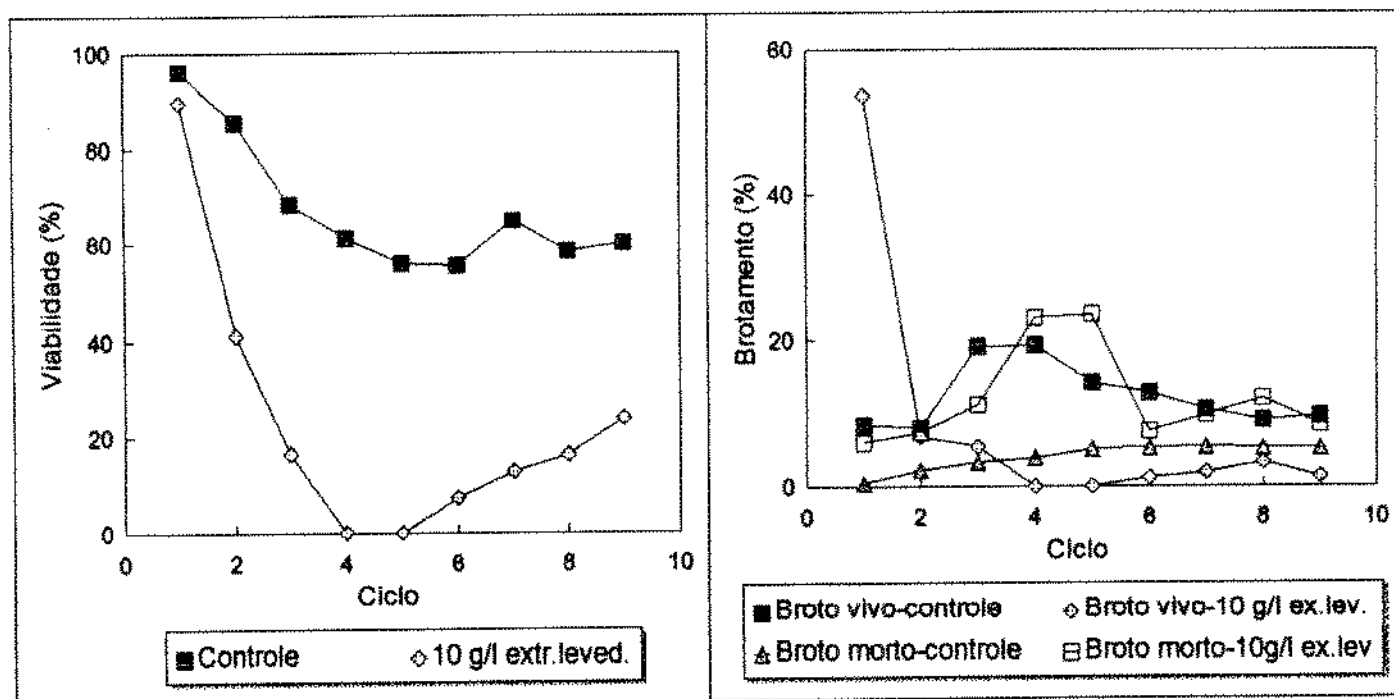


FIGURA 3 - Viabilidade e brotamento das células de leveduras no teste da adição de 10 g/l de extrato de levedura na fermentação alcoólica (média de 4 repetições).

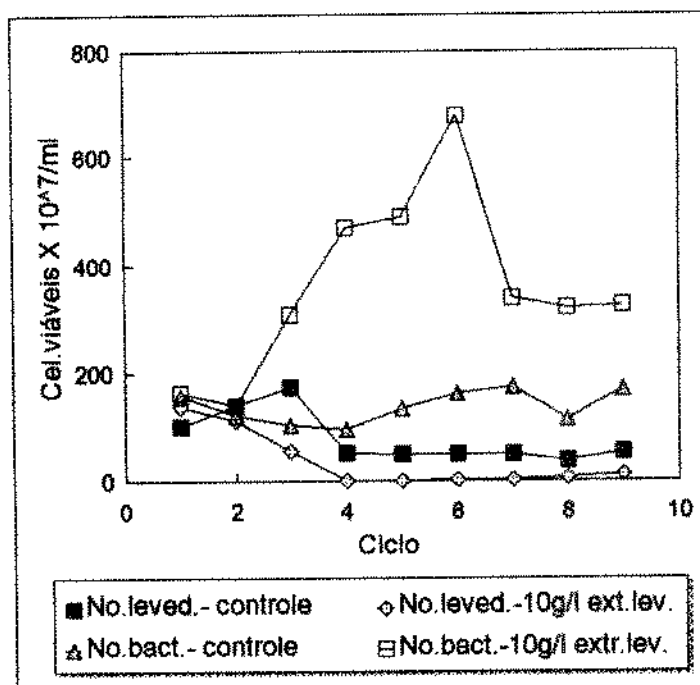


FIGURA 4 - Número de células de leveduras e bactérias viáveis no teste da adição de 10 g/l de extrato de levedura na fermentação alcoólica (média de 4 repetições).

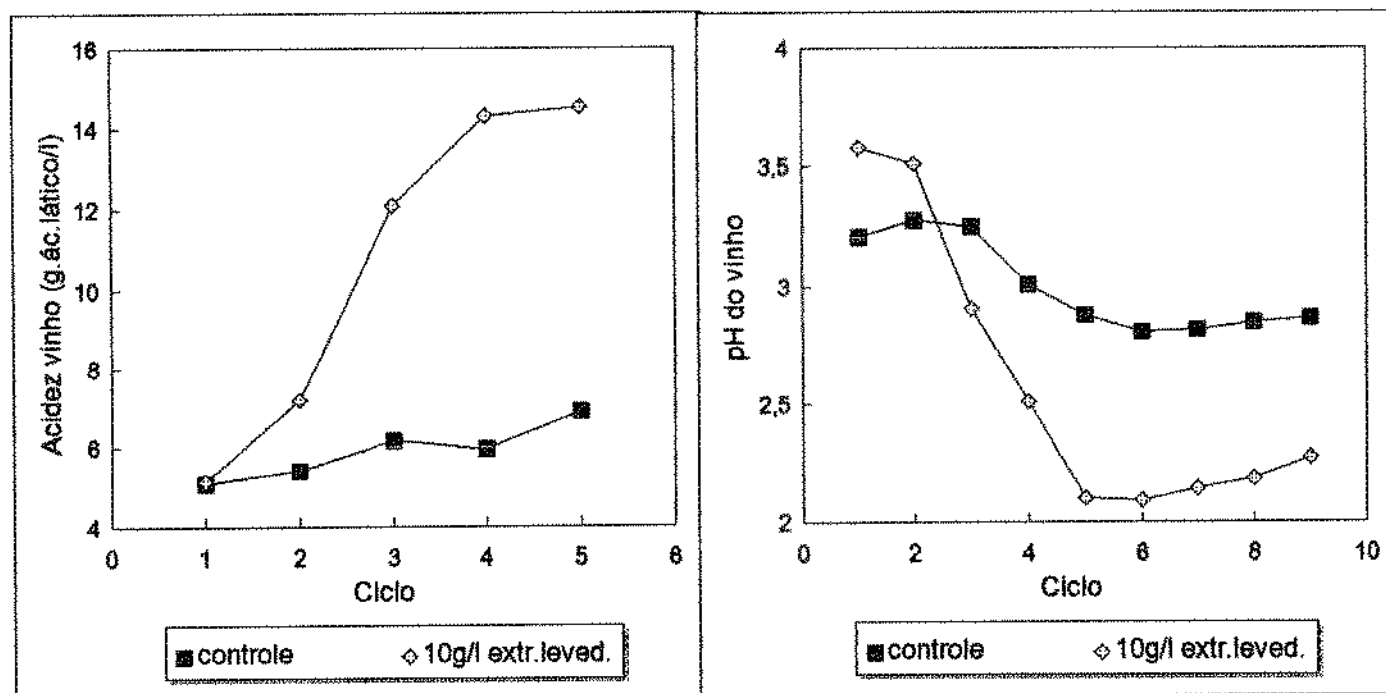


FIGURA 5 - Acidez e pH no vinho delevurado no teste de adição de 10 g/l de extrato de levedura na fermentação alcoólica (média de 4 repetições).

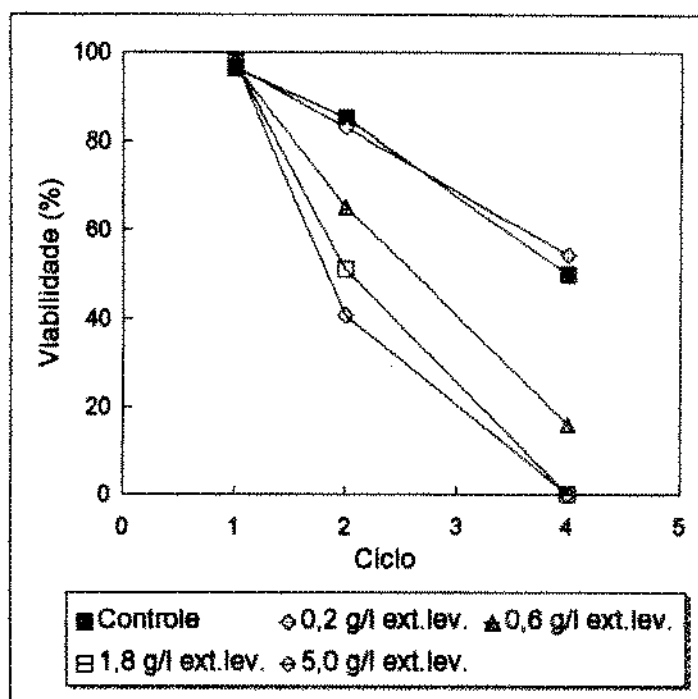


FIGURA 6 - Viabilidade das células de leveduras no teste da adição de diversas concentrações de extrato de levedura na fermentação (média de 2 repetições).

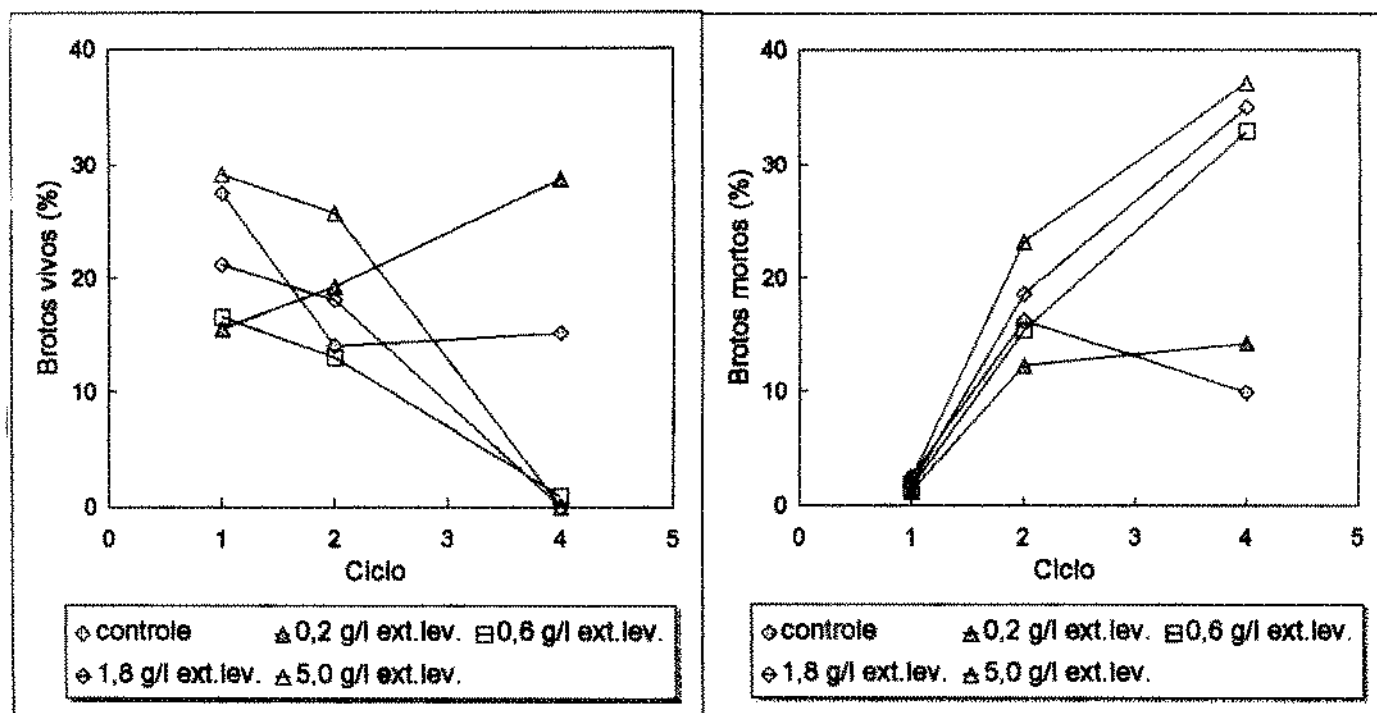


FIGURA 7 - Porcentagem de brotamento das células de leveduras no teste da adição de diversas concentrações de extrato de levedura na fermentação (média de 2 repetições).

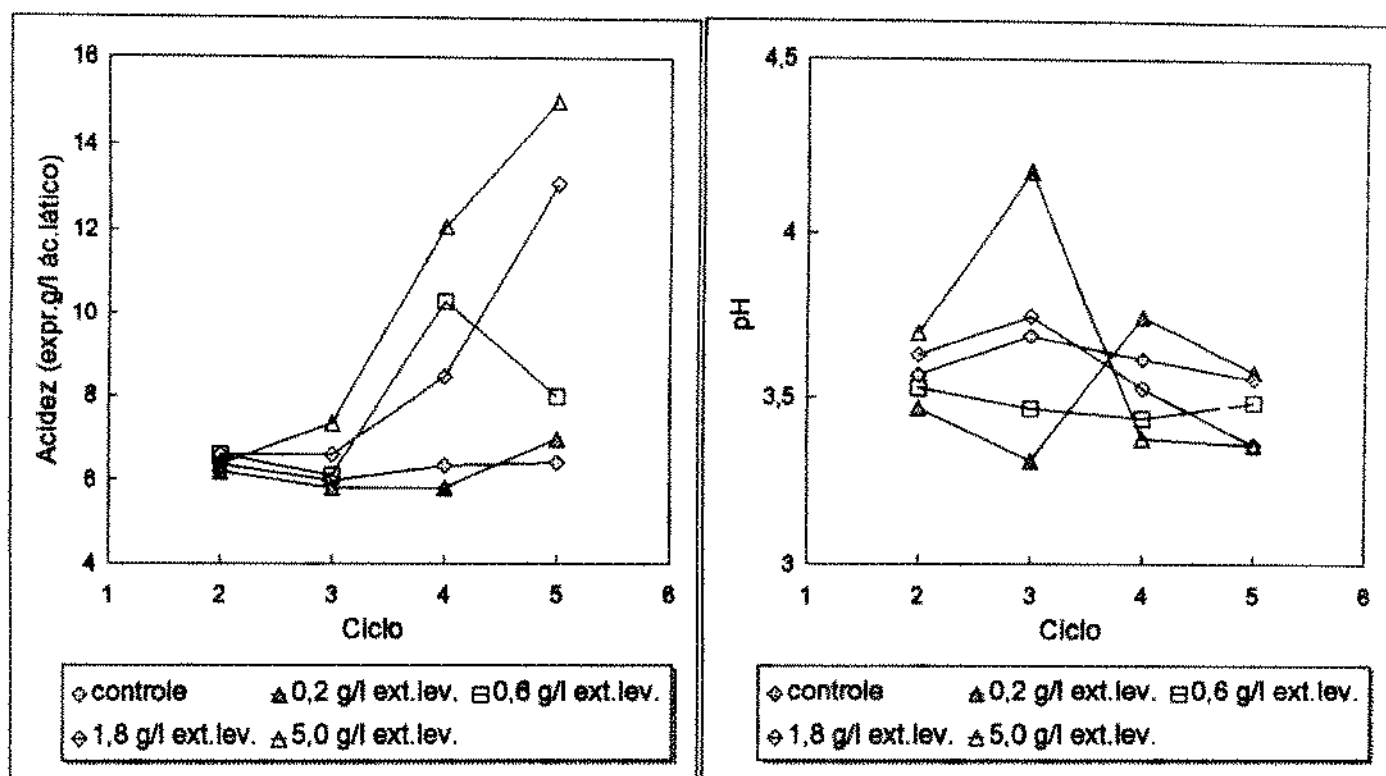


FIGURA 8 - Acidez e pH do vinho de levurado no teste da adição de diversas concentrações de extrato de levedura na fermentação (média de 2 repetições).

A análise de variância (ANOVA) entre os tratamentos foi significativa ($F=11,0$ e $P=0,0002$). O teste de Tukey-Kramer revelou que a média do 49 e 59 ciclos para o controle (6,37g/l) em relação aos tratamentos com 0,200 mg/l (6,39 g/l) e 0,60 g/l (8,24 g/l) não foram significativos ($P>0,05$). A comparação entre o controle e os tratamentos com 1,8 e 5,0 g/l (respectivamente médias de 10,7 e 13,6 g/l) foram significativas ($P<0,05$).

O pH do vinho (FIGURA 8) sofreu diminuição proporcionalmente ao aumento da adição de extrato de levedura, com a diferença mais acentuada entre o 49 e 59 ciclos, com as médias do controle (3,59) e o tratamento com 5,0 g/l (3,37) estatisticamente significativos (Tukey-Kramer com $P<0,05$ e ANOVA com $P=0,0037$).

A relação antagônica verificada entre as populações de bactérias e leveduras durante a fermentação alcoólica, também ocorre na fabricação do vinho. Segundo KING & BEELMAN (1986) as leveduras inibem inicialmente o crescimento das bactérias que ocorre numa segunda etapa. O rápido crescimento bacteriano causa forte inibição das leveduras devido a metabólitos produzidos pelas bactérias, especialmente ácidos orgânicos.

A produção de etanol também foi comprometida pela presença de bactérias estimuladas pelo extrato de levedura no vinho. A TABELA 57 demonstra a diferença entre as médias da eficiência da fermentação alcoólica no ciclos finais (79 e 89 ciclo) com e sem adição de 10 g/l de extrato de levedura. Houve uma diferença significativa entre as médias do controle (73,8%) e o tratamento com extrato de levedura (55,4%) com $P<0,001$ (Teste de Tukey-Kramer).

A comparação entre as médias de açúcares totais (TABELA 54) presentes no vinho centrifugado após dez horas de fermentação, demonstrou que houve diferença significativa entre o controle (7,31 g/l) e o tratamento com extrato de levedura (8,95 g/l) com $P<0,001$ (Teste de Tukey-Kramer) nos ciclos finais (79 e 89). O aumento do açúcar residual no vinho tratado com extrato de levedura foi acompanhado também do aumento de acidez (médias do 79 e 89 ciclos), de 7,05 g/l no controle

contra 16,2 g/l no tratamento com extrato de levedura (TABELA 52), demonstrando que o efeito da acidez orgânica, além de afetar as características vitais das leveduras, afeta também o consumo do açúcar pela levedura e a consequente produção de etanol. Vinhos tratados com o desinfetante Desfloc (TABELA 54), mesmo na presença de 10,0 g/l de extrato de levedura, apresentaram açúcar residual relativamente baixo (média do 79 e 89 ciclos = 2,82 g/l).

4.2.1.3 Efeito da adição de aminoácidos e inoculação inicial do contaminante.

Se o extrato de levedura estimula o crescimento das bactérias lácticas e nele estão presentes, dentre outros nutrientes, uma grande soma de aminoácidos, esses podem ser os responsáveis pelo estímulo do crescimento dessas bactérias durante a fermentação, já que elas são exigentes do ponto de vista nutricional.

Apesar do estímulo das bactérias pelas leveduras ter sido estudado a tempos atrás, permanecem dúvidas sobre o mecanismo envolvido.

Alguns trabalhos apontam fatores nutricionais presentes no mosto, provenientes da autólise das leveduras durante o processo de fermentação, como sendo os responsáveis pelo estímulo do crescimento bacteriano (BEELMAN et al., 1982; SELBY SMITH et al., 1975). Contraditoriamente, a baixa concentração de etanol também é apontada como o principal responsável pelo estímulo das bactérias lácticas no cultivo misto com leveduras (KING & BEELMAN, 1986). Os principais fatores nutricionais citados são: aminoácidos e peptídeos (FEENEY & STRONG, 1941; SPEACK et al., 1958; SELBY-SMITH et al., 1975), bases nitrogenadas (IKAWA & O BARR, 1956; WEINMAN et al. - 1964), açúcares hidrolizados pela levedura (LAFON-LAFOUCADE et al., 1983; ESSIA-NGANG et al., 1992).

A adição de um conjunto de aminoácidos puros foi testada na fermentação e demonstrou o favorecimento do crescimento do contaminante em relação as leveduras do processo. A viabilidade das células de leveduras foi sempre inferior no tratamento com aminoácidos (TABELA 16 e FIGURA 9). Houve diferença significativa das médias de viabilidade das leveduras (ANOVA $F = 192,9$, $P < 0,0001$ e Tukey-Kramer c/ $P(0,05)$ entre o

controle (69,9%) e o tratamento com aminoácidos (32,3%), comparando-se os ciclos finais (7º ao 9º ciclo). O tratamento sem adição do contaminante foi superior ao controle (77,5%) com $P < 0,05$ (Tukey-Kramer)

O brotamento das leveduras também foi afetado pela adição de aminoácidos na fermentação. Apesar da comparação das médias de brotos vivos (TABELA 17 e FIGURA 10) entre o controle (7,83%) e o tratamento com aminoácidos (7,40%), do 7º ao 9º ciclo, não ter apresentado diferenças significativas (ANOVA $F = 13,7$; $P = 0,0847$ e Tukey-Kramer $c/ P > 0,05$), a porcentagem de brotos mortos (TABELA 18 e FIGURA 10) foi significativamente inferior no controle (3,58%) em relação ao tratamento com aminoácidos (13,2%), ANOVA com $F = 116,6$, $P < 0,0001$ e Tukey-Kramer com $P < 0,001$. O tratamento sem contaminantes (1,69%) foi inferior ao controle (Tukey-Kramer com $P < 0,001$) quanto aos brotos mortos.

O número de leveduras também foi afetado pela adição de aminoácidos na fermentação (TABELA 19 e FIGURA 9). A média do logaritmo do número de leveduras do controle (8,690) em relação ao tratamento com aminoácidos (8,161), do 7º ao 9º ciclo, demonstrou que houve uma queda significativa das células viáveis de leveduras devido ao tratamento com aminoácidos (Kruskal-Wallis $KW = 11,54$ e $P = 0,0031$, e teste de Dunn $c/ P < 0,05$). Não houve diferença significativa entre o tratamento sem contaminante (8,699) e o controle com relação ao números de células viáveis ($KW = 11,5$; $P > 0,05$).

Fenômeno inverso ao das leveduras foi constatado para o crescimento bacteriano nos tres ciclos finais (TABELA 19 e FIGURA 11), com o log da média de 9,012 para o controle e 9,750 para o tratamento com aminoácidos (ANOVA $F = 27,3$ e $P < 0,0001$; Tukey-Kramer $P < 0,01$), demonstrando o forte estímulo do crescimento das bactérias na presença de aminoácidos no meio. O tratamento sem contaminante (8,427) foi significativamente mais baixo (Tukey-Kramer - $P < 0,05$) que o controle.

Quanto a média da acidez do vinho entre o 7º e 9º ciclos (TABELA 21 e FIGURA 12), houve um aumento significativo (ANOVA $c/ F = 628,32$ e $P < 0,0001$) no tratamento com aminoácidos (14,9 g/l) em relação ao controle (6,17g/l) e, uma diminuição significativa entre este último e o

tratamento sem contaminante (4,75 g/l) no teste de Tukey-Kramer ($P<0,001$). A média do pH (TABELA 22 e FIGURA 12) nestes mesmos ciclos foi significativamente inferior (ANOVA $F=51,8$, $P<0,0001$; Tukey-Kramer $P<0,001$) no tratamento com aminoácidos (3,410) em relação ao controle (3,97). O tratamento sem adição de bactérias apresentou pH mais elevado (4,158) do que o controle (Tukey-Kramer $P<0,001$). Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos no plaqueamento, quanto maior o número de células bacterianas viáveis, maior a produção de ácidos

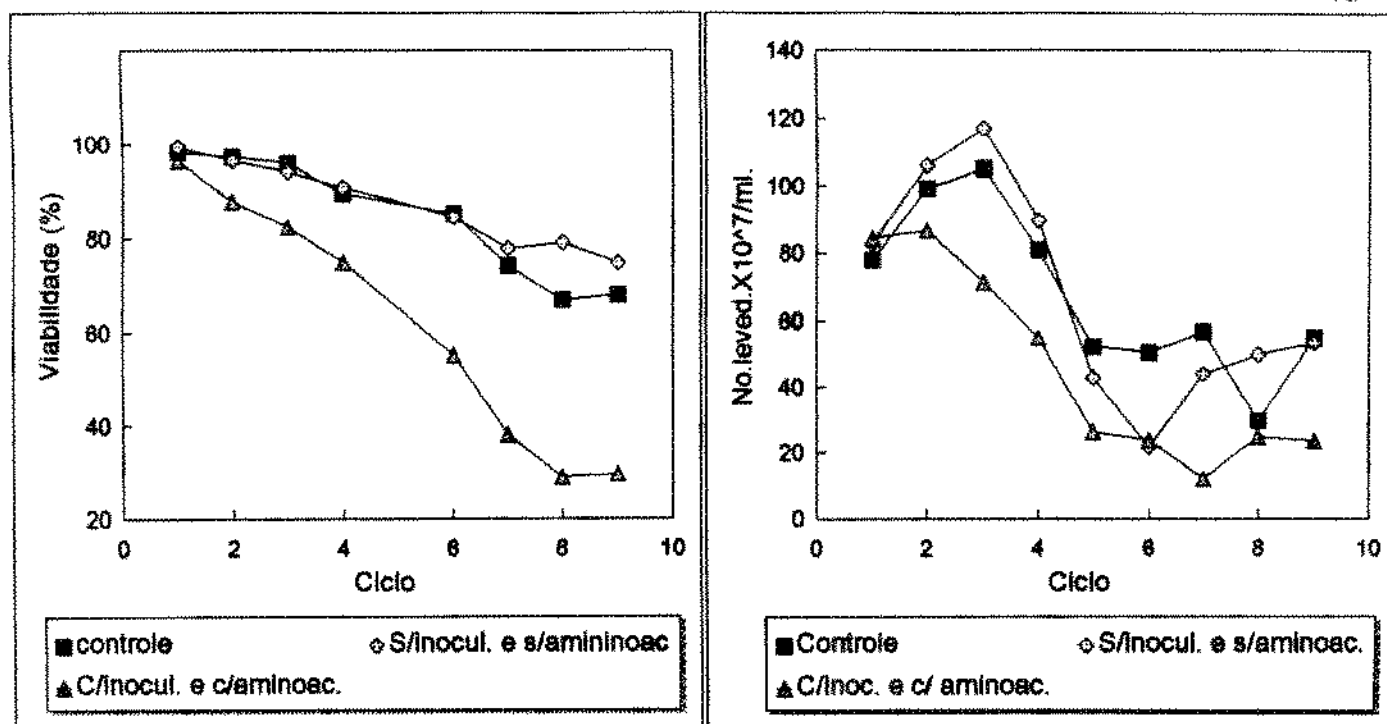


FIGURA 9 - Viabilidade (média de 2 repetições) e número de leveduras (média de 3 repetições) no teste da adição de aminoácidos e inoculação inicial do contaminante.

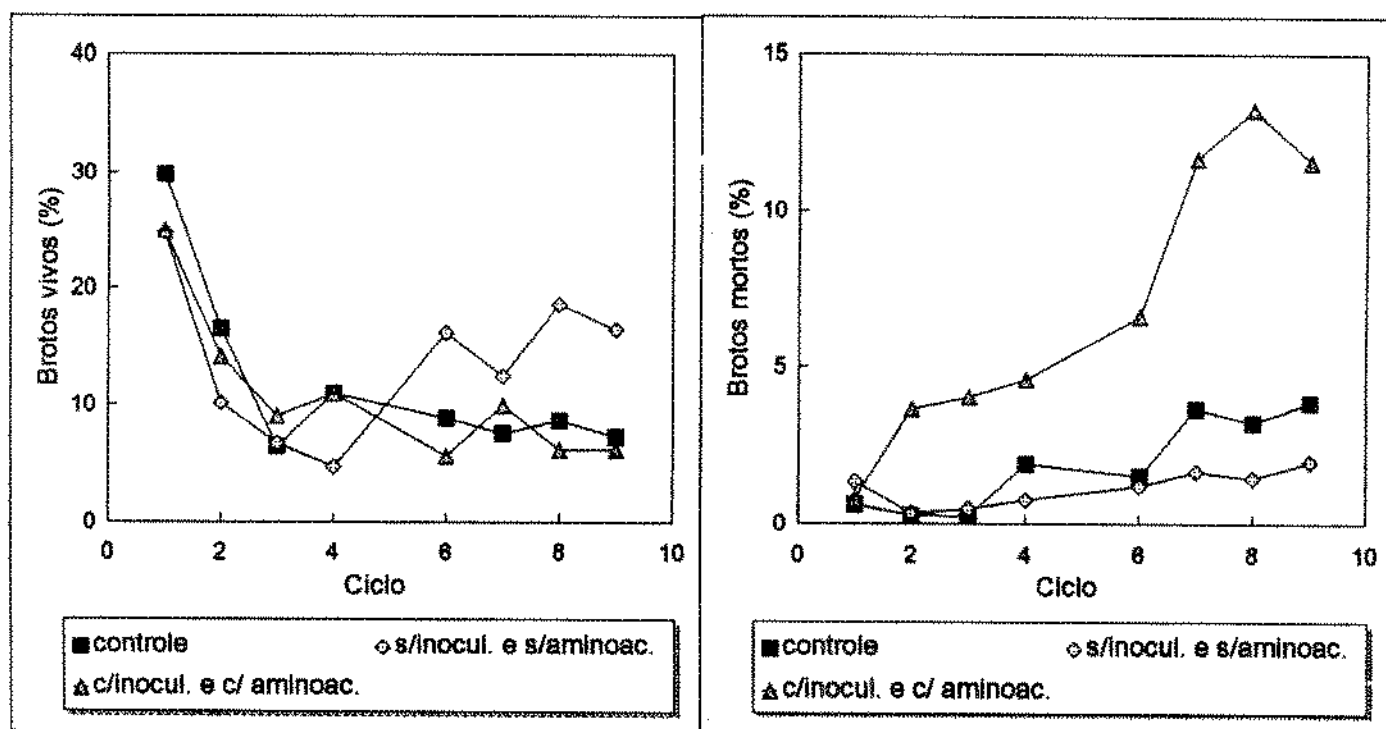


FIGURA 10 - Porcentagem de brotamento das células de leveduras no teste da adição de aminoácidos e inoculação inicial do contaminante (média de 2 repetições).

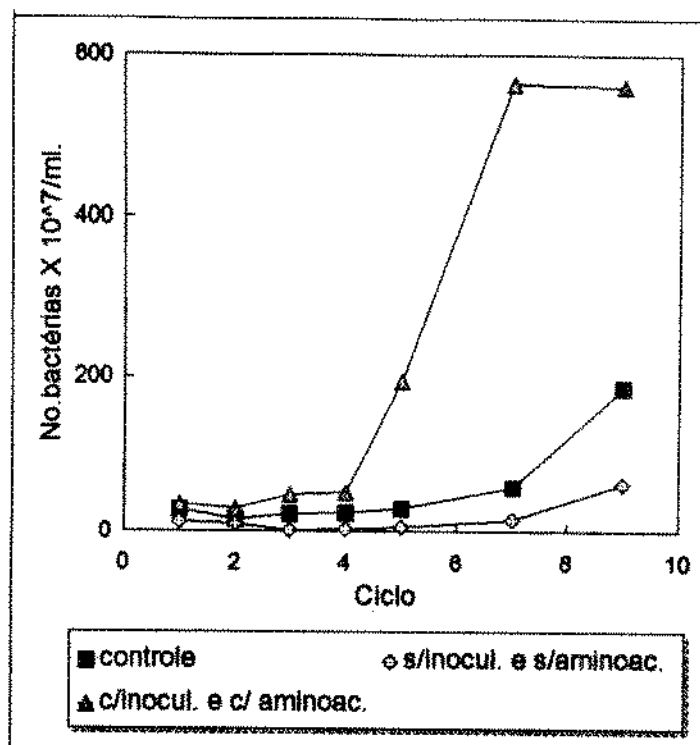


FIGURA 11 - Número de bactérias no teste da adição de aminoácidos e inoculação inicial do contaminante (média de 3 repetições).

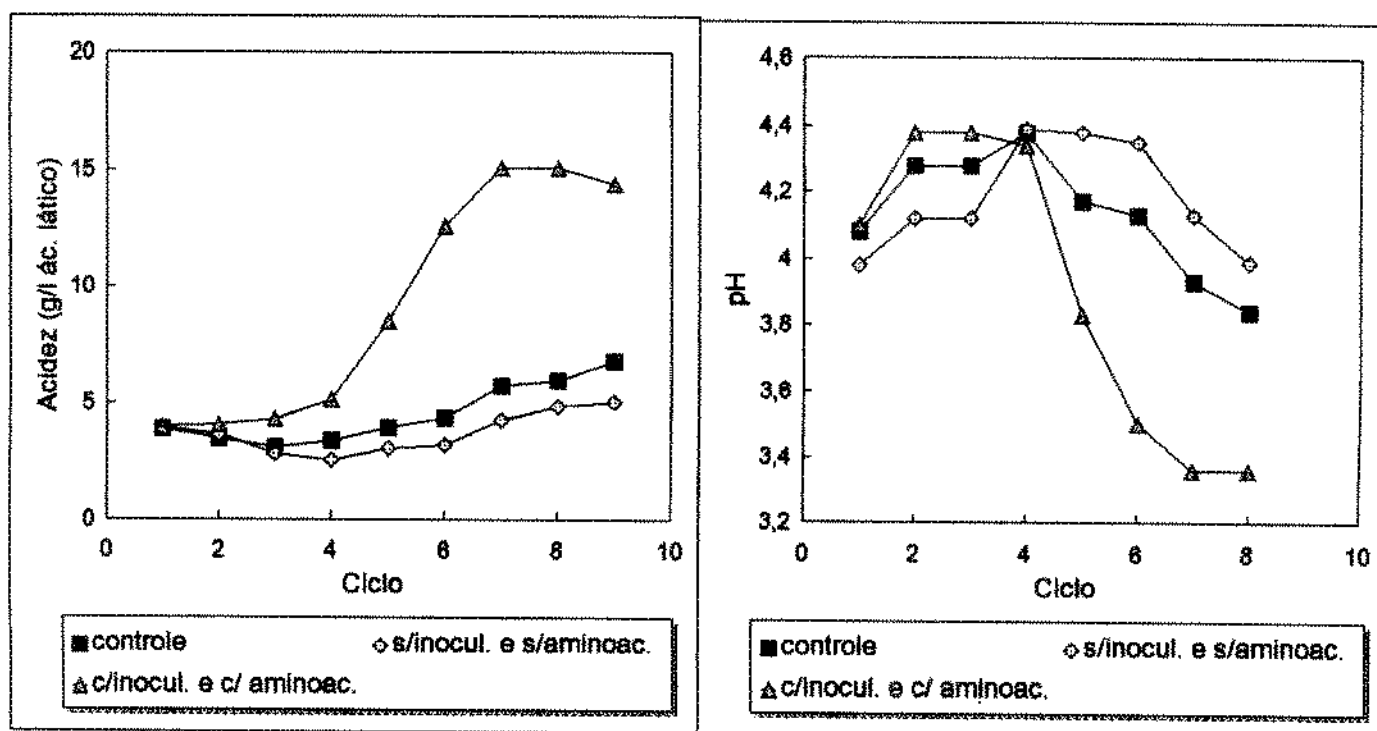


FIGURA 12 - Média da acidez e pH do vinho no teste da adição de aminoácidos e inoculação inicial do contaminante (média de 3 repetições).

A concentração de aminoácidos totais no vinho do tratamento controle (TABELA 23), nos primeiros quatro ciclos, ficou abaixo de 9 mg/l (expressa em leucina), enquanto que nos tres últimos ciclos era superior a 45 mg/l. Esses resultados indicaram o aumento do nível de aminoácidos presentes no vinho nos ciclos finais onde a proliferação bacteriana e a acidez atingiram os valores mais elevados. O teste onde foi avaliado o efeito do tempo de fermentação de 12 horas na estimulação do crescimento bacteriano, confirmou também a relação entre níveis de aminoácidos totais expressos em leucina inferior a 15 mg/l (TABELA 34) e a ausência de acidez no vinho, nos ciclos finais.

O perfil do comportamento da acidez e pH no tratamento sem adição do contaminante, semelhante ao controle aumentando nos ciclos finais (porém quantitativamente menor), sugere que a infecção está mais relacionada com as condições de crescimento, do que propriamente devido ao número de bactérias nas dornas, já que o aumento da população bacteriana em níveis anormais seria uma questão de tempo, tendo em vista o comportamento ascendente do crescimento (FIGURA 12) verificado no tratamento sem adição do contaminante.

Segundo ESSIA-NGANG et al. (1992), o estímulo do crescimento de lactobacilos durante a fermentação alcoólica por leveduras em mosto de beterraba é devido ao consumo de monossacarídeos liberados durante a hidrólise da sacarose pelas leveduras. No modelo proposto pelo autor é avaliado apenas um único ciclo, sendo que deveria ser avaliado com reciclo de células, método empregado na fermentação alcoólica industrial. No presente trabalho foi utilizado o reciclo de células para analisar de forma mais ampla o fenômeno da estimulação do crescimento, sendo padronizadas as condições tanto do fermento como do açúcar adicionado. Com isso, foi possível analisar a forte influência dos aminoácidos adicionados no estímulo do crescimento bacteriano. KING & BE-ELMAN (1986) estudaram as interações entre *S. cerevisiae* e *L. oenos* na fermentação para fabricação de vinho e concluíram que etanol estimulou o crescimento bacteriano quando a concentração era inferior a 2% (v/v) e inibiu-o, acima de 6 %. O autor indicou que a inibição inicial da

bactéria era mais complexa do que os fatores estudados. No presente trabalho também ocorreu a inibição inicial das bactérias, sendo atribuída à ausência de aminoácidos no mosto. Isso foi comprovado pela adição deste último evitando a inibição inicial das bactérias.

4.2.1.4 Efeito de vários nutrientes no cultivo puro de *L. fermentum*.

A realização de testes de avaliação de nutrientes no cultivo de *L. fermentum* foi feita após a formulação de um meio de cultivo específico, a base de caldo de cana desidratado, onde foram avaliados o crescimento de outras bactérias lácticas e leveduras.

Os resultados obtidos para o teste de crescimento de *S. cerevisiae*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc mesenteroides*, para os 7 meios testados, estão na TABELA 24. Foram observados que os meios 4 (rapadura) e 5 (rapadura e sais) não foram suficientes para o crescimento das bactérias, especialmente os lactobacilos que não cresceram mesmo na presença de sais. Os nutrientes extrato de levedura e/ou peptona devem ser adicionados no meio de rapadura (como nos meios 3 e 6) para que haja um bom desenvolvimento das bactérias em questão. Esses resultados estão de acordo com as características nutricionais do grupo das bactérias lácticas já que elas são exigentes do ponto de vista nutricional, requerendo vários fatores de crescimento, destacando-se vitaminas e aminoácidos, presentes em extratos orgânicos os quais fazem parte dos meios de cultivo para este grupo (KANDLER & WEISS, 1986).

Experiências anteriores demonstraram que o meio basal O/F (Difco), normalmente usado para muitas bactérias para o teste da oxidação e fermentação da glicose, não foi suficiente para os lactobacilos que apresentaram um fraco crescimento (OLIVA-NETO, 1990), sendo necessário

TABELA 24 - Avaliação do crescimento de bactérias lácticas e *Saccharomyces cerevisiae*, em meio de cultivo a base de caldo de cana-de-açúcar desidratado (rapadura), após 72 horas de incubação a 30°C.

Meios*	Culturas Microbianas - CCT				
	<i>S.cerevisiae</i>	<i>L. fermentum</i>		<i>L.mesenteroides</i>	
	0472	1400	0559	0582	0367
1	++++	++++	++	++++	++++
2	++++	++++	++	+++	+++
3	++++	++	++	+++	++
4	+++	-	-	-	-
5	+++	-	-	++	++
6	+++	+++	++	+++	+++
7	++++	++++	++	++++	++++

Legenda: - absorvância menor que 0,10

++ absorvância entre 0,10 a 0,19

+++ absorvância entre 0,20 a 0,29

++++ absorvância acima de 0,30

(*)Formulação dos meios de acordo com a TABELA 1.

complementar com extrato de levedura (SILVA, 1988) ou usar outro meio mais rico em aminoácidos como o vermelho de fenol - Difco (OLIVA-NETO, 1990).

Vários trabalhos tem sido descritos associando o extrato de levedura com o aumento do estímulo do crescimento de bactérias lácticas (FEENEY & STRONG, 1941; SPECK et al. 1958; SELBY-SMITH et al. 1975).

O efeito de vários nutrientes no cultivo puro de *L. fermentum* foi realizado, a fim de caracterizar e comprovar a participação dos aminoácidos no estímulo ao crescimento do contaminante. Por outro lado, testes de fermentação demonstraram que em condições de cultivo misto (leveduras e bactérias), a adição de nutrientes estimulou o crescimento dos lactobacilos.

Na TABELA 25 estão os resultados do crescimento de *L. fermentum* em diferentes fontes nutricionais. A comparação foi realizada entre o teste com caldo de cana desidratado adicionado de um complexo de vitaminas, sais e aminoácidos em relação a uma outra formulação. O ensaio indicou que trocando-se o açúcar da cana por glicose P.A., nem todos os nutrientes adicionados substituíram o meio formulado a base de caldo de cana desidratado, já que neste último, o crescimento dos lactobacilos foi superior. Provavelmente esse fato foi devido a deficiência de bases nitrogenadas e/ou ácidos graxos que podem ter faltado no meio formulado com glicose P.A. Os lactobacilos apresentam requerimentos nutricionais para aminoácidos, ácidos graxos, ácidos nucleicos e vitaminas (SHARPE, 1981).

O extrato de levedura e hidrolizados de proteína (triptona, ácido casamínico e peptona) mostraram-se estimulantes do crescimento de *L. fermentum*, confirmando a participação do extrato de levedura no favorecimento das bactérias lácticas durante os testes de fermentação alcoólica. Segundo PETERS et al. (1953) e PRESCOTT et al. (1953) a hidrólise ácida parcial da caseína estimulou o crescimento de *L. delbrueckii* e a adição de peptídeos de His e Ser duplicaram o crescimento quando adicionados no meio de cultivo.

TABELA 25 - Avaliação do crescimento de *Lactobacillus fermentum* em caldo de cana-de-açúcar desidratado (rapadura) adicionado de vários nutrientes, após 72 horas de incubação a 30°C.

Composição dos meios	Linhagens - <i>Lactobacillus fermentum</i>		
	CCT 1400	CCT 1407	CCT 559
rap*	-	-	-
rap + sais	-	-	-
rap + ext. leved.	++++	++++	++++
rap + triptona	++++	++++	++++
rap + peptona	++++	++++	++
rap + ac. casamínico	++++	++++	++++
rap + vitaminas*	-	-	-
rap + aa	+++	+++	+++
rap + aa + vitaminas	++++	+++	+++
rap + aa + sais	++++	++++	++++
rap + aa + vitam. + sais	+++++	++++	++++
gli + aa + vitam. + sais	++	++	++

Legenda: rap - rapadura 4%

aa - conjunto de aminoácidos (de acordo com item 3.3.1)

vitam. - vitaminas (de acordo com item 3.5)

gli - glicose 4%

(-) absorvância menor que 0,10

(++) absorvância entre 0,10 a 0,19

(+++) absorvância entre 0,20 a 0,29

(++++) absorvância acima de 0,30

SPECK et al., (1958) fracionaram o extrato de levedura e obtiveram peptídeos como os responsáveis pela estímulo do crescimento de *S. lactis*. SELBY-SMITH et al., (1975) fracionaram esse extrato em Sephadex G-25, obtendo uma fração estimuladora do crescimento de *S. lactis* contendo aminoácidos livres e uma pequena quantidade de peptídeos. COLEMAN (cit. em SELBY-SMITH et al., 1975) fracionou o extrato de levedura em cromatografia com a mistura fenol-água como fase móvel, encontrando como fração estimuladora do crescimento de *L. casei* um polipeptídeo formado de Asp, Glu, Gly e Leu. FEENEY & STRONG (1941) substituíram Asn, Gln e Glu no lugar de extrato de levedura e obtiveram um crescimento parcial. Asp, ureia e sulfato de amônia foram todos inativos.

O fracionamento do extrato de levedura através de cromatografia de troca iônica permitiu o isolamento dos aminoácidos presentes em duas frações: na primeira estavam aqueles ligados a célula, que se desprenderam após a hidrólise; e na segunda estavam os aminoácidos livres. Dentre os investigados estavam Leu, Ile Val, Ser, Glu, Asp, Thr, Gly, Ala, Tyr, Lys. Esses aminoácidos são essenciais para o crescimento dos lactobacilos, e estão presentes no extrato de levedura livres ou ligados a célula (ROTHENBUEHLER et al., 1982).

Os meios de cultivo contendo apenas caldo de cana desidratado, sais e vitaminas não foram suficientes para o crescimento das bactérias. Já com a adição de um conjunto de aminoácidos puros no meio, houve um crescimento semelhante àquele obtido com adição de extrato de levedura, triptona ou ácido casamínico, para as 3 espécies testadas. Com isso ficou evidenciada a necessidade de aminoácidos para o crescimento de lactobacilos em substrato a base de cana-de-açúcar, tanto no cultivo puro como no misto com leveduras (TABELA 25).

Seis vitaminas (ácido para-amino-benzóico, ácido nicotínico, tiamina, ácido fólico, pantotenato de cálcio e piridoxina) foram testadas isoladamente e em grupo, com sais e caldo de cana-de-açúcar sem adição de aminoácidos e não houve crescimento. A TABELA 25 apresenta os re-

sultados das vitaminas testadas em grupo.

Conjuntos com dois a sete aminoácidos quando complementados no meio a base de caldo de cana desidratado não apresentaram resultado positivo quanto ao crescimento das linhagens testadas (TABELA 26). Os testes com 17 aminoácidos, sais e caldo de cana desidratado permitiram caracterizar os aminoácidos quanto a influencia no crescimento de *L. fermentum* (TABELA 27). No grupo I, aqueles que não causaram nenhum tipo de inibição do crescimento das bactérias após 48 horas, estavam Ser, Arg, Pro, Asp e Lys. A falta de His influenciou o crescimento de *L. fermentum* CCT 1400 e 0559. Desses, Arg e Pro são considerados essenciais, e Ser e Lys, essenciais ou estimulantes para *L. arabinosus* segundo a revisão de BARTON-WRIGHT (1952).

No grupo II, quando Ala, Glu, Cys, Thr, Trp, Phe, Tyr, Met foram excluídos individualmente, ocorreu uma resposta de crescimento menor que a obtida no meio contendo a mistura dos 17 aminoácidos, para as 3 cepas de *L. fermentum* testadas e após 48 horas de cultivo. Dentre eles Glu, Cys, Met e Trp são considerados essenciais, entretanto para *L. arabinosus* Thr, Phe, Tyr são considerados essenciais ou estimulantes (BARTON-WRIGHT, 1952). Para *L. casei*, desses aminoácidos apenas Glu, Trp, Phe, Tyr são aminoácidos essenciais (STROBEL et al., 1989), por outro lado, para *L. brevis* apenas Glu, Phe e Met são os aminoácidos essenciais consumidos durante a fermentação da massa de trigo (COLLAR et al., 1992).

O grupo III impediu que houvesse o crescimento quando excluídos individualmente do meio de cultivo. Leu, Ile, Val, Ala, Glu e Thr, quando retirados do meio de cultivo, impediram o crescimento das 3 linhagens de *L. fermentum* testadas em 18 horas de incubação. Phe inibiu apenas *L. fermentum* CCT 1407 e *L. fermentum* CCT 0559; Trp e Pro inibiram apenas *L. fermentum* CCT 1407. Após 48 horas de incubação, apenas os aminoácidos Leu, Ile ou Val quando excluídos, impediram o crescimento das 3 linhagens testadas.

TABELA 26 - Avaliação do crescimento de *Lactobacillus fermentum* em meio contendo caldo de cana-de-açúcar (rapadura), sais e vários conjuntos de aminoácidos, após 72 hs. de incubação a 30°C.

meio de cultivo*	Linhagens - <i>Lactobacillus fermentum</i>		
	CCT 1400	CCT 1407	CCT 559
rap	-	-	-
rap + ext. leved.	++++	++++	++++
meio 1	++	-	-
meio 2	-	-	-
meio 3	++	-	-
meio 4	-	-	-
meio 5	++	-	-
meio 6	++	-	-
meio 7	-	-	-

* - Composição meio 1: Cys, Glu, Met, Trp, Val, Leu e Ile
 meio 2: Cys e trp
 meio 3: Glu e met
 meio 4: Leu, Ile e Val
 meio 5: Ala, Hys, Phe, Pro, Arg, Tyr e lys
 meio 6: Ala, hys e Phe
 meio 7: Arg, Tyr e Lys

TABELA 27 - Avaliação do crescimento de *Lactobacillus fermentum* em meio de cultivo contendo caldo de cana-de-açúcar desidratado (rapadura), adicionado de conjuntos com 16 aminoácidos removendo-se um dos 17 abaixo, após 18-48 horas de incubação a 30°C.

aa		Cepas - <i>Lactobacillus fermentum</i>		
		CCT 1400	CCT 1407	CCT 559
rap+	18h	++++	++	+++
17aa	48h	+++++	++++	++++
Phe	18h	++	-	-
	48h	+++	+++	+++
Ala	18h	-	-	-
	48h	++	+++	++
Tyr	18h	+++	++	+++
	48h	+++	+++	++++
Ile	18h	-	-	-
	48h	-	-	-
Asp	18h	++++	++	++
	48h	+++++	++++	++++
Glu	18h	-	-	-
	48h	+++	++	+++
Cys	18h	++	++	+++
	48h	+++	+++	+++
Pro	18h	++++	-	+++
	48h	+++++	++++	++++
His	18h	++++	-	+++
	48h	+++++	-	++++
Val	18h	-	-	-
	48h	-	-	-
Lys	18h	++++	++	+++
	48h	+++++	++++	++++
Arg	18h	+++	+	+++
	48h	+++++	++++	++++
Thr	18h	-	-	-
	48h	+++	++	++++
Leu	18h	-	-	-
	48h	-	-	-
Trp	18h	+++	-	+++
	48h	+++	+++	+++
Ser	18h	++++	+	++++
	48h	+++++	++++	++++

Na TABELA 28 estão os resultados do teste de crescimento de *L. fermentum* pelo método de lavagem do inóculo. Também não houve crescimento em 25 horas, nos tratamentos sem aminoácidos do grupo III, e quando apenas estes estavam presentes o crescimento foi reduzido pela metade aproximadamente.

Leu, Ile e Val foram considerados essenciais para *L. fermentum*, pois sem qualquer um deles não houve nenhum crescimento, mesmo presentes os outros 16 aminoácidos. De fato, as bactérias lácticas parecem não possuir ou estar inativa essa rota biossintetizadora (MORISHITA et al. 1981), que é comum para esses 3 aminoácidos e são essenciais também para outras espécies como *L. arabinosus* (BARTON-WRIGHT, 1952), *L. helveticus* (HUTCHINGS & PETERSON cit. em BARTON-WRIGHT, 1952; MORISHITA et al., 1981), *L. casei* (MORISHITA et al., 1981; STROBEL et al., 1989), *L. brevis* (COLLAR et al., 1992),

L. plantarum e *L. acidophilus* (MORISHITA et al., 1981). Glu e Val são exigidos pela maioria das espécies de *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus* (MORISHITA et al., 1981).

Testes com inóculo padronizado e lavado permitiram fazer uma avaliação quantitativa do crescimento de *L. fermentum* na presença de meio de cultivo a base de rapadura, sais, vitaminas e alguns conjuntos de aminoácidos. Os meios no. 1 e 5 contendo treze aminoácidos (grupos II e III), apresentaram crescimento razoável após 25 horas, e no meio n^o. 2, apenas com alguns aminoácidos do grupo II e III, houve um crescimento reduzido a aproximadamente metade daquele obtido nos meios de nos. 1 e 5. Na ausência dos aminoácidos do grupo III (meio n^o. 3) não houve crescimento bacteriano (TABELA 28).

Os aminoácidos Glu, Phe, Trp são essenciais para *L. plantarum*, *L. helveticus*, *L. casei* e *L. acidophilus*. Met também é essencial exceto para *L. casei* (MORISHITA et al., 1981).

TABELA 28 - Curva de crescimento de *Lactobacillus fermentum* em diferentes composições de meio de cultivo a base de caldo de cana-de-açúcar, incubado a 30°C.

Meio*	Absorbância (600 nm) - <i>L. fermentum</i>											
	CCT 1400				CCT 0559				CCT 1407			
	0h.	4h.	8h.	25h.	0h.	4h.	8h.	25h.	0h.	4h.	8h.	25h.
1	0	0,02	0,06	0,07	0	0,03	0,07	0,07	0	0,04	0,04	0,05
2	0	0,02	0,03	0,04	0	0	0,01	0,03	0	0	0,01	0,02
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0,03	0,06	0,08	0	0,04	0,08	0,10	0	0,02	0,06	0,10

(*) meio 1 - sais, vitaminas, rapadura e os aminoácidos Phe, Ala, Glu, Val, Tre, Leu, Ile, Hys, tyr, Cys, Met, Trp e Pro.

meio 2 - sais, vitaminas, rapadura e os aminoácidos Phe, Ala, Glu, Val, Tre, Leu, Ile, Hys.

meio 3 - sais, vitaminas, rapadura e os aminoácidos tyr, Cys, Met, Trp e Pro.

meio 4 - sais, vitaminas, rapadura.

meio 5 - sais, rapadura e os aminoácidos Phe, Ala, Glu, Val, Tre, Leu, Ile, Hys, tyr, Cys, Met, Trp e Pro.

Já que não só Leu, Ile e Val são necessários para o crescimento de *Lactobacillus*, porque apenas estes tres causaram a ausência completa do crescimento de *L. fermentum*, a resposta pode estar associada ao mecanismo de transporte desses aminoácidos, assumindo que uma quantidade residual de todos os aminoácidos essenciais já estavam presentes no meio basal de caldo de cana, pressuposto para o crescimento dos lactobacilos quando excluídos os outros aminoácidos essenciais. O consumo de aminoácidos pela bactéria é normalmente feito pelo transporte ativo, através de um transportador, e com isso um grupo de substâncias proximamente relacionadas podem ser transportadas de forma diferente, mais ou menos vagarosamente, dependendo da afinidade pelo transportador. Assim L-Val, L-Leu, e L-Ile competem pelo mesmo transportador. Essa é a razão pela qual o desbalanceamento da concentração de aminoácidos no meio de cultivo, leva a uma diminuição ou inibição total do crescimento. O excesso de um aminoácido previne o crescimento de outro (BROCK, 1974). O consumo de Leu por *L. casei* é completamente inibido pelo excesso de Val e Ile. Esses aminoácidos são consumidos por transporte ativo (pH ótimo entre 5,5 e 6,0) e parecem ter o mesmo transportador. Leu é consumida mais rapidamente que Val e Ile (STROBEL et al., 1989).

4.2.2 Efeito da duração do ensaio de fermentação, lavagem do fermento e velocidade de centrifugação.

4.2.2.1 Efeito da duração do ensaio de fermentação.

Nos diversos ensaios realizados, o tratamento controle tem sido feito sempre com duração de 20 horas (tempo zero até o final do ensaio fermentativo), e tem favorecido a população bacteriana após os primeiros quatro a sete ciclos. Paralelamente a fermentação de 20 horas foi realizado outro teste com duração de 12 horas, a fim de avaliar se a duração do ensaio mais rápida (12 horas) desfavorecia preferencialmente o crescimento bacteriano. Isso foi confirmado pela acidez do vinho, que permaneceu sempre inferior a 4,0 g/l (TABELA 32 e FIGURA 15). O

pH também ficou estabilizado e sempre acima de 3,30 (TABELA 33 e FIGURA 15). Houve uma diferença significativa (teste de Mann-Whitney - $P=0,0001$) da média da acidez do 7º ao 9º ciclos, entre o tempo de fermentação de 20 horas (5,72 g/l) e 12 horas (3,65 g/l). Enquanto o perfil do pH do vinho no tratamento com 20 horas foi de queda do 4º ciclo até o final; houve um ligeira elevação no tratamento com 12 horas.

A viabilidade das leveduras (TABELA 29 e FIGURA 13) sofreu uma queda mais acentuada e significativamente menor (teste t - $P=0,0041$) com 20 horas (média de 67,6%), do que no tempo de 12 horas (média de 78,9%), nos ciclos finais (8º e 9º). A porcentagem de brotos vivos (TABELA 30 e FIGURA 17) verificada no 8º e 9º ciclos foi bem superior (média= 28,1%) no tratamento com menor acidez (12 horas), em relação ao tempo de 20 horas (7,96%), diferença considerada significativa (teste de Mann-Whitney - $P=0,0286$).

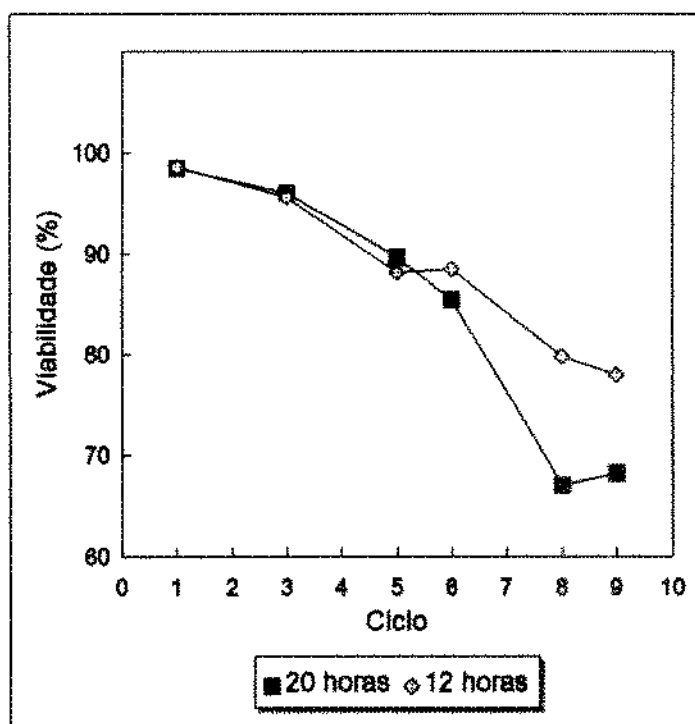


FIGURA 13 - Viabilidade das células de leveduras no teste do efeito da duração do ensaio de fermentação (média de 2 repetições).

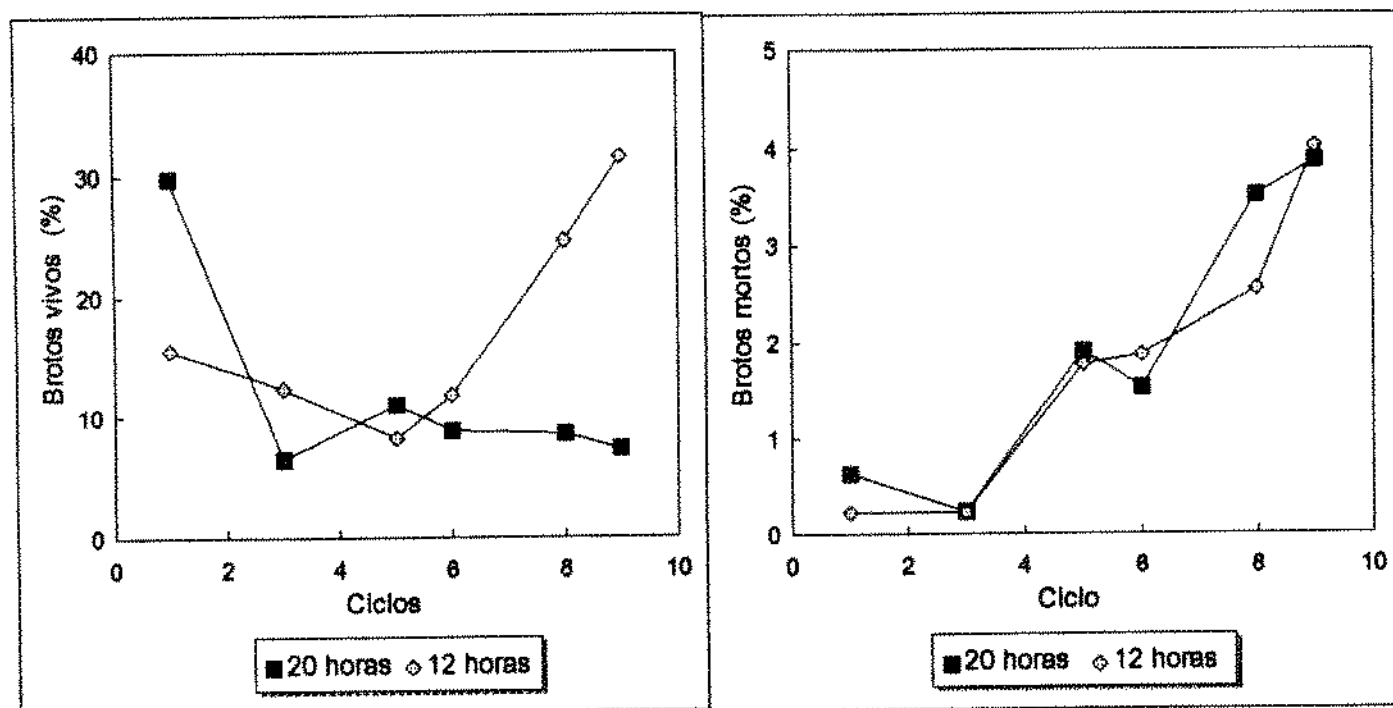


FIGURA 14 - Porcentagem de brotamento das células de leveduras no teste da duração do ensaio de fermentação (média de 2 repetições).

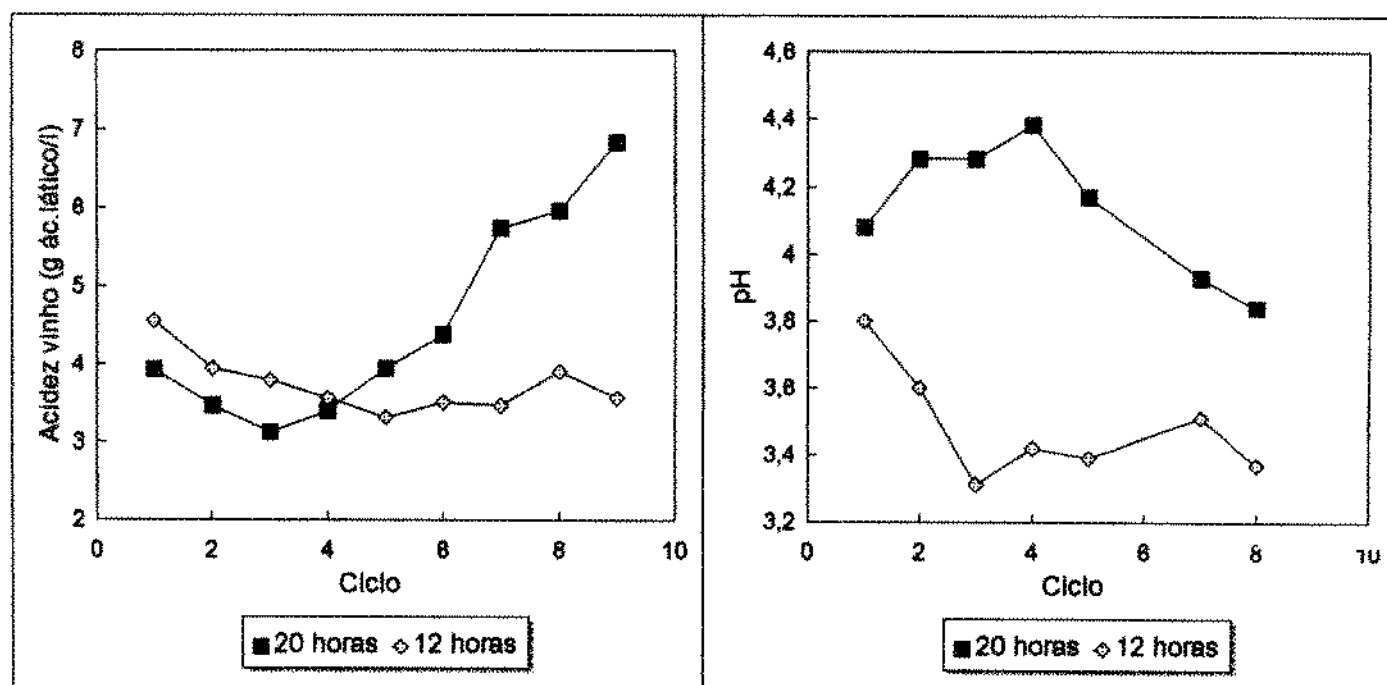


FIGURA 15 - Acidez e pH do vinho no teste do efeito da duração do ensaio de fermentação (média de 2 repetições).

4.2.2.2 Efeito da lavagem do fermento.

A lavagem do inóculo, após a centrifugação do fermento foi testada a fim de avaliar se atenuava o efeito estimulador do crescimento das bactérias, provocado pelo extrato de levedura em altas concentrações (10 g/l), demonstrado em testes anteriores.

A diferença entre a média da viabilidade das leveduras (TABELA 35 e FIGURA 16), do 8º ao 10º ciclos, entre os tratamentos com lavagem do fermento (83,9%) e lavagem com adição de extrato de levedura (65,8%) foi significativa (Mann-Whitney $P < 0,05$), demonstrando que esse parâmetro foi afetado pela adição do extrato de levedura, porém de forma bem atenuada, já que a viabilidade das leveduras nos testes com extrato de levedura sem lavagem, zerava já a partir do 4º ciclo (FIGURA 3).

A média da taxa de brotos vivos do 8º ao 10º ciclos (TABELA 36 e FIGURA 17) entre o tratamento com lavagem (22,1%) e o tratamento com lavagem e extrato de levedura (29,0%), apresentaram diferenças significativas (teste t com $P < 0,05$). Entre os brotos mortos (TABELA 37 e FIGURA 17) também houve diferença significativa entre a média do tratamento com lavagem (1,62%) e o tratamento com lavagem e extrato de levedura (11,2%), com $P < 0,05$ (Mann-Whitney).

Quanto a acidez do vinho (TABELA 38 e FIGURA 18) foi verificado um aumento significativo (Mann-Whitney $P < 0,05$) da média do 8º e 9º ciclos, entre os tratamentos com lavagem (3,51 g/l) e, lavagem e extrato de levedura (5,40 g/l), o que não ocorreu com o pH (teste t $P > 0,05$), devido ao forte poder tamponante do meio (TABELA 39 e FIGURA 18).

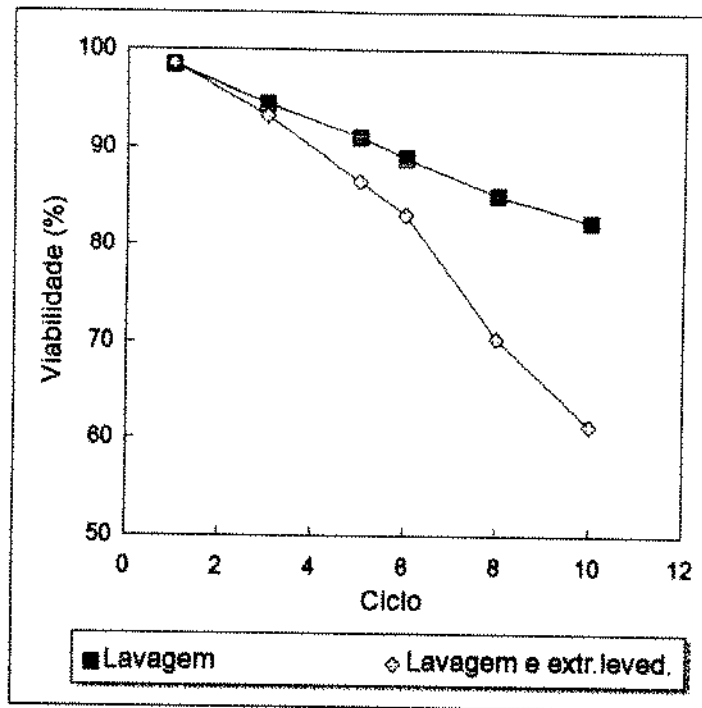


FIGURA 16 - Viabilidade das células de leveduras no teste da lavagem do fermento. (média de 2 repetições).

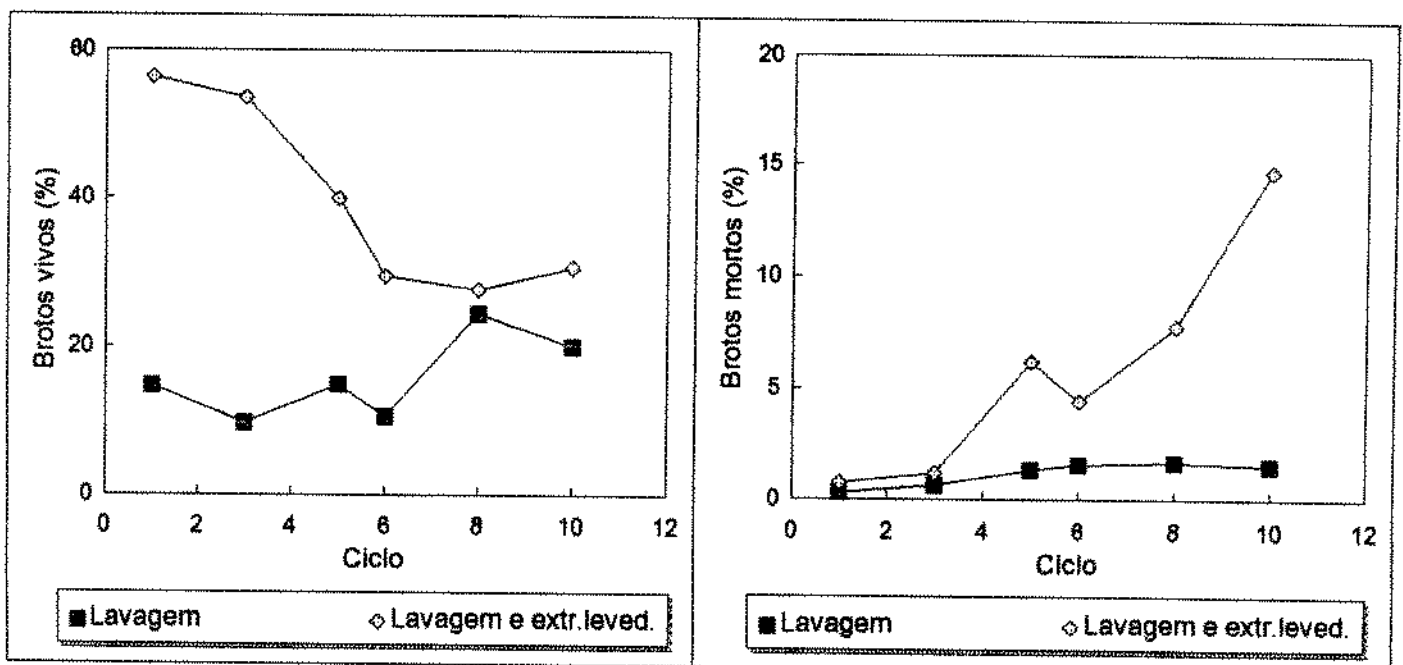


FIGURA 17 - Porcentagem de brotamento das células de leveduras no teste da lavagem do fermento. (média de 2 repetições).

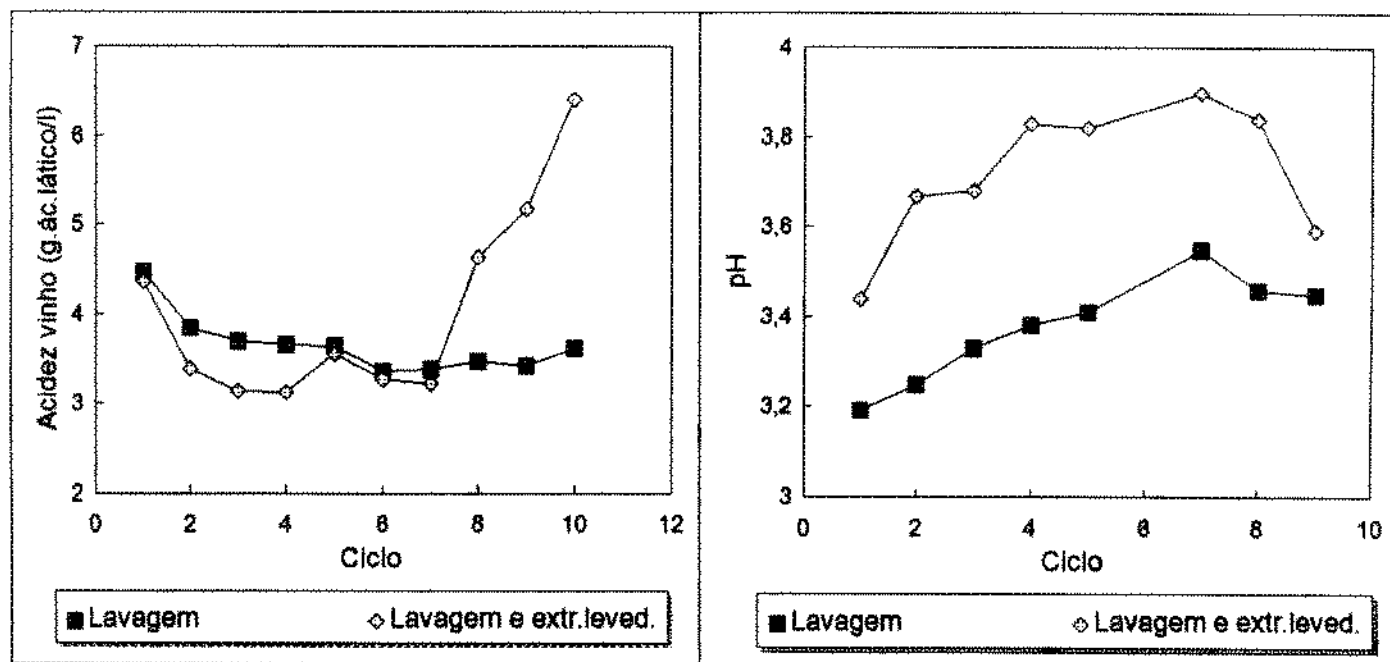


FIGURA 18 - Acidez e pH do vinho no teste do efeito da lavagem do fermento (média de 2 repetições).

4.2.2.3 Efeito da velocidade de centrifugação do fermento.

Desde que fatores nutricionais desprendidos pela levedura podem estar associados ao estímulo do crescimento bacteriano na fermentação alcoólica, o reciclo desses nutrientes para o sistema, na forma de leveduras em decomposição, pode ser importante na medida em que vai concentrando no fermento uma quantidade cada vez maior de nutrientes adsorvidos ou firmemente ligados a estrutura da célula morta (ROTHEN-BUEHLER et al., 1982). Portanto foram testadas duas velocidades de centrifugação bem diferenciadas com essa finalidade.

O efeito da baixa velocidade de centrifugação do fermento estimulando o crescimento bacteriano, pode ser verificado comparando-se a média da acidez (TABELA 41 e FIGURA 20) dos ciclos 59 ao 89 no tratamento com 870 X g (6,19 g/l) em relação ao de 5000 X g (5,47 g/l) com uma diminuição significativa do segundo (Mann-Whitney com $P=0,026$). O pH (TABELA 42 e FIGURA 20) sofreu queda no tratamento com baixa velocidade de centrifugação (próximo de 3,40 no ciclo final), enquanto que no segundo, praticamente não houve alterações permanecendo sempre acima de 3,50.

A viabilidade das leveduras (TABELA 40 e FIGURA 19) foi inferior no tratamento com 870 X g a partir do 69 ciclo acentuando-se no final, com diferença de aproximadamente 20% abaixo daquele com 5000 X g. A porcentagem de brotos vivos e mortos apresentou flutuação característica e com pouca diferença entre os tratamentos (TABELA 40 e FIGURA 19).

Outro teste envolvendo 30 ciclos foi realizado para testar a velocidade de centrifugação do fermento. Até o 249 foi utilizado 5000 X g e a partir deste ciclo até o final, utilizou-se 870 X g. Os resultados novamente demonstraram o aumento da acidez no tratamento com 870 X g em apenas cinco ciclos (TABELA 60). A média da acidez entre o 69 e o 249 ciclo foi de 5,76 g/l, enquanto que no segundo tratamento foi de 7,35 g/l, diferença extremamente significativa (Mann-Whitney - $P(0,0001)$). O pH (TABELA 61) também apresentou diferenças entre os tra-

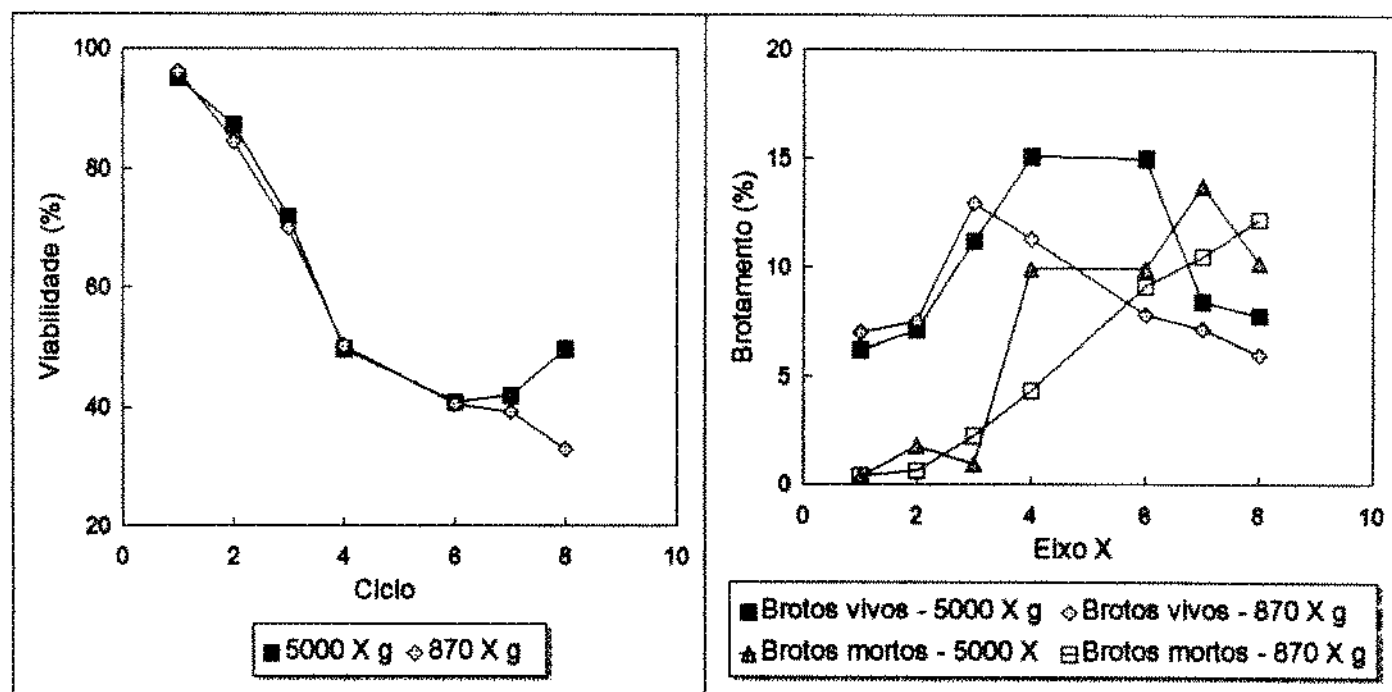


FIGURA 19 - Viabilidade e brotamento (média de 2 repetições) das leveduras no teste do efeito da centrifugação do fermento.

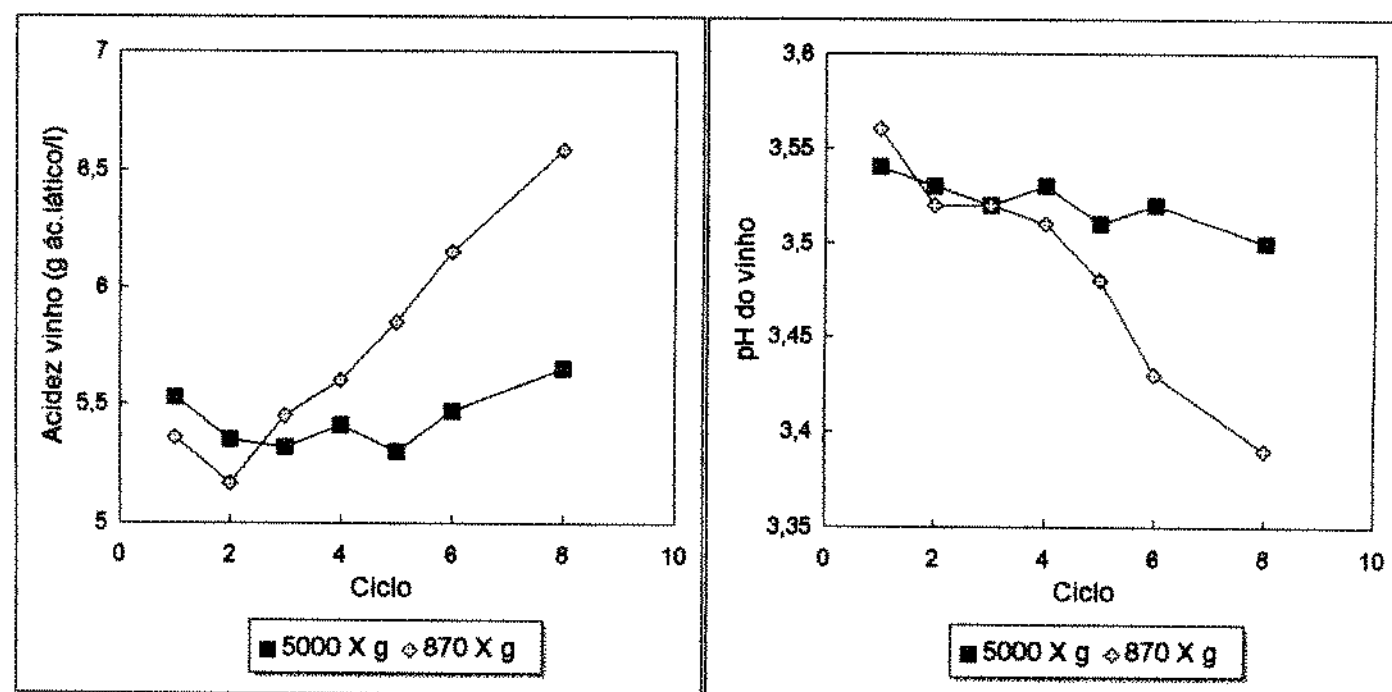


FIGURA 20 - Acidez e pH do vinho no teste do efeito da centrifugação do fermento (média de 2 repetições).

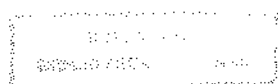
tamentos 5000 X g (3,68), nos ciclos 6º ao 24º, e 870 X g (3,49) nos ciclos finais ($t = 3,75$ e $P = 0,0006$).

Os testes do efeito da velocidade de centrifugação do fermento indicaram que houve nítida diferença entre os tratamentos com diferentes velocidades de centrifugação. Baixa velocidade (870 X g) causou um aumento nos índices de acidez, proveniente do aumento da população bacteriana.

Segundo AMORIM et al. (1989) o desempenho das centrífugas é fator primordial para se obter altos rendimentos na fermentação. Se a centrifugação for eficiente, a concentração do fermento na dorna se eleva e a fermentação fica mais rápida e menos sujeita a infecção, o que também foi verificado neste trabalho com os resultados do teste com tempo de fermentação de 12 horas. No período analisado (10 ciclos) não houve aumento das bactérias, como encontrado nos testes com 20 horas, que entre 4 a 7 ciclos já iniciava o crescimento da população bacteriana.

Os testes de lavagem do fermento, com e sem extrato de levedura, demonstraram que a lavagem não evitou o aumento da acidez e floculação do fermento no tratamento com extrato de levedura. Além disso, industrialmente ainda torna-se difícil esse procedimento como rotina, devido ao aumento significativo da água em circulação, e a perda de etanol presente no fermento.

A provável causa do efeito da velocidade de centrifugação no estímulo do crescimento bacteriano, pode estar associada a fontes nitrogenadas ligadas as células de levedura em decomposição, que sofrem o retorno através de centrifugações em baixas velocidades. A presença de aminoácidos essenciais, tais como Leu, Ile e Val, bem como peptídeos, encontrados ligados ao extrato de células de leveduras mortas (ROTHEN-BUEHLER et al., 1982) podem ser os responsáveis pelas diferenças entre os tratamentos de centrifugação, onde a baixa velocidade de centrifugação favorece a permanência desses compostos.



Aproximadamente 30% do conteúdo nitrogenado é liberado da célula de *S. cerevisiae*, devido a autólise, sendo que aminoácidos livres representam 1/4 desses compostos. A proteólise é máxima a pH=5,0, quando representa 60% do conteúdo nitrogenado da levedura, que consiste principalmente de aminoácidos. A pH 3,0 somente 40% do conteúdo nitrogenado da levedura pode ser liberado pela proteólise e os aminoácidos somente representam 13% dos compostos desprendidos, dominados por peptídeos (LURTON et al., 1989). Esses peptídeos ou mesmo aminoácidos presos a célula em decomposição podem ser os responsáveis pelo aumento desses nutrientes na fermentação alcoólica.

Sistemas proteolíticos existentes tanto nas bactérias como no fermento, podem ser os responsáveis pela autólise das células de leveduras e a consequente liberação de fatores nutricionais no meio de fermentação. Nas leveduras, consiste de duas endopeptidases, proteinases A e B (LENNEY et al. 1974; LOOZE et al. 1979), as carboxipeptidases Y (HASILIK & TAMNER, 1978) e S (WOLF & EHMANN, 1978) e uma dipeptidase (ROEHM, 1974). Tres endopeptidases (proteinases A, B e Y) foram purificadas de leveduras de panificação e caracterizadas (NOWAK & TSAI, 1989).

As bactérias lácticas também apresentam atividade proteolítica e, portanto podem auxiliar na proteólise. *Lactobacillus plantarum* CRL 83 e CRL 60 possuem atividade proteolítica a 30°C, com pH ótimo entre 5,6 a 6,2. *L. casei* possui atividade no pH ótimo entre 4,8 a 5,2 (de GIORGI et al., 1985). *L. casei* NCDO 151 contém as exopeptidases dipeptidase, aminopeptidase e uma específica carboxipeptidase, além de uma endopeptidase. As tres exopeptidases são fortemente inibidas por EDTA, mas novamente ativadas por Co^{++} e Mn^{++} (EL SODA et al., 1978). *L. bulgaricus* NCDO 1489 produz uma única proteinase ligada a parede celular com atividade ótima a 45-50°C., pH ótimo entre 5,2 a 5,8 e também é inibida por agentes quelantes (ARGYLE et al. 1976).

O sistema peptídeo hidrolase intracelular de *L. plantarum* consiste de uma inespecífica aminopeptidase e tres dipeptidases, não possui carboxipeptidase ou endopeptidase e a atividade é máxima na fase esta-

cionária (EL SODA et al., 1983). O sistema peptidase de *L. plantarum* é parecido com o de *L. helveticus*, *L. lactis*, *L. bulgaricus* e *L. acidophilus* (EL SODA & DESMAZEAUD, 1982), enquanto o de *L. casei* seria comparável com o de *L. brevis* e *L. fermentum* (EL SODA et al., 1982). Ambos os sistemas proteolíticos devem estar presentes no fermento contaminado por *L. plantarum* e *L. fermentum*, espécies reconhecidamente contaminantes da fermentação alcoólica (SILVA, 1988; OLIVA-NETO, 1990).

Medidas que contribuam para o controle da liberação de aminoácidos, peptídeos e proteínas no ambiente da fermentação, poderiam levar a uma forma alternativa do controle bacteriano. Nesse sentido, o controle da viabilidade das leveduras se faz necessário, devendo-se evitar a morte por excesso de temperatura, tratamento ácido intenso e alto teor alcoólico. Agentes inibidores do poder proteolítico da microbiota poderiam ser analisados para uma futura aplicação neste sentido, bem como inibidores, se possível, dos próprios aminoácidos essenciais ao crescimento bacteriano. Com isso, ao invés de usar métodos para destruir as células bacterianas, como os biocidas que acabam causando poluição ambiental, as novas tecnologias evitariam a propagação dos contaminantes por inanição, sem prejuízos ecológicos. Deve-se ressaltar que as leveduras praticamente não necessitam de aminoácidos no meio de cultivo, já que possuem as vias de síntese a partir de amônia, uréia ou nitratos (NICHOLAS, 1965; PHAFF et al., 1966).

4.3. Estudo de desinfetantes para controle bacteriano da fermentação alcoólica.

4.3.1 Seleção do desinfetante para teste na fermentação alcoólica.

As TABELAS 43 e 44 indicam a concentração mínima inibitória para diversos agentes antimicrobianos no meio de cultivo nº 3 a pH 6,5, e as TABELAS 45 e 46 a pH 4,5.

Nessa etapa do trabalho foram feitos testes de CMI, com diversos produtos que apresentam atividade antimicrobiana, com o objetivo principal de selecionar aquele que reúne o melhor desempenho quanto a capacidade de inibir o crescimento dos grupos *Leuconostoc* e *Lactobacillus*, microrganismos que frequentemente causam problemas na produção do etanol, sem afetar consideravelmente a atividade da levedura. O produto em questão deveria ainda apresentar custo relativamente baixo, ser relativamente atóxico para o homem e ao meio-ambiente, não ser corrosivo e estar disponível em quantidade para uso industrial.

Dos antibióticos analisados a penicilina e a clindamicina apresentaram os melhores resultados quanto a inibição bacteriana e nenhum dos antibióticos testados inibiu as leveduras. A penicilina-V-ácida apresentou faixa de CMI para as bactérias de 0,050 a 0,20 ug/ml (TABELA 45) ou 53 a 211 UI/l no pH= 4,5 e com 24 horas de incubação. Esses resultados estão coerentes com os trabalhos de AQUARONE (1959), MENEZES (1980) e CRUZ et al. (1985), que utilizaram 500-1000 UI/l de penicilina no mosto, para o controle bacteriano da fermentação alcoólica. Normalmente os resultados de CMI estão abaixo do necessário, já que corresponde a mínima concentração necessária para causar inibição do crescimento bacteriano.

BAYER et al. (1978) trabalharam com 40 linhagens de lactobacilos pelo método de diluição em caldo, e determinaram a média geométrica para penicilina (CMI= 0,48 ug/l), enquanto neste trabalho, com as

TABELA 43 - Concentração Mínima Inibitória, em ug/ml, de diversos produtos, para bactérias lácticas e *Saccharomyces cerevisiae* pH do meio 6,5 e incubação de 24 horas

agente inibidor	Linhagens - CCT				
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>L. fermentum</i>		<i>L. mesenteroides</i>	
	0472 ug/ml	1400 ug/ml	0559 ug/ml	0582 ug/ml	0367 ug/ml
Antibiótico:					
Penicilina V-ácida	SE*	0,230	0,120	0,950	0,470
Sais e Ácidos:					
$\text{Cu}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	140	70,0	70,0	35,0	140
Tripolifosfato	1250	625	625	2500	1250
Sulfito de Sódio	>2500	625	625	312	78,0
Sorbato e Fosfato de Sódio	1250	1250	>2500	>1250	1250
Fosfato de Sódio	>12500	6250	6250	12500	3125
Nitrito de Sódio	3750	1875	469	234	234
Ácido fólico	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	10,0
Biocida puro:					
Formaldeído	92,5	11,5	23,0	23,0	5,70
Glutaraldeído	>300	>300	>300	>300	>300
Quinazolina	>118	>118	>118	>118	>118
Tanino	>302	>302	>302	>302	>302
* SE - sem efeito					

TABELA 44 - Concentração Mínima Inibitória, de formulações comerciais para bactérias lácticas e *Saccharomyces cerevisiae*, pH do meio 6,5 e incubação de 24 horas.

agente inibidor	Linhagens - CCT				
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>L. fermentum</i>		<i>L. mesenteroides</i>	
	0472 ug/ml	1400 ug/ml	0559 ug/ml	0582 ug/ml	0367 ug/ml
Etileno Bis-					
Ditiocarbamato	250	250	>250	>250	>250
3metil4cloro fenol	37,0	150	300	150	37,0
2benzil4cloro- fenol	<60,0	<30,0	<60,0	<60,0	<60,0
2 cloro aceta- mida	>300	>300	>300	>300	>300
Benzil Alcool					
mono poliformol	62,0	125	125	62,0	62,0

TABELA 45 - Concentração Mínima Inibitória, em ug/ml, de diversos produtos para bactérias lácticas e *Saccharomyces cerevisiae*, pH do meio 4,5 e incubação de 15-24 horas.

agente inibidor		Linhagens - CCT				
		<i>S. cerevisiae</i> 0472 ug/ml	<i>L. fermentum</i> 1400 ug/ml		<i>L. mesenteroides</i> 0582 0367 ug/ml	
Antibióticos:						
Penicilina						
V-ácida	(15h)	SE*	0,100	0,0500	0,0500	0,100
	(24h)	SE	0,200	0,100	0,0500	0,200
Clindamicina	(15h)	SE	0,100	0,0500	0,200	0,0500
	(24h)	SE	0,100	0,0500	0,400	0,0500
Cefamandole	(15h)	SE	0,400	0,200	0,400	0,200
	(24h)	SE	0,400	0,200	1,60	0,400
Enzima:						
Lisozioma	(15e24h)	SE	>124	>124	>124	>124
Sais e Ácidos:						
Sulfato de cobre 5H ₂ O	(15h)	75,0	9,50	<4,70	37,5	150
	(24h)	75,0	75,0	300	37,5	150
Tripolifosfato de sódio	(15h)	5000	2500	5000	5000	2500
	(24h)	5000	2500	2500	5000	5000
Sulfito de Sódio	(15h)	>6000	40,0	2,50	10,0	5,00
	(24h)	>6000	40,0	20,0	20,0	10,0
Nitrito de Sódio	(15h)	117	117	117	<58,5	<58,5
	(24h)	234	117	117	<58,5	117
Biocida puro:						
Formaldeído	(15h)	23,0	11,5	6,00	11,5	6,00
	(24h)	46,0	23,0	11,5	23,0	11,5

* SE - sem efeito

adaptações já mencionadas, foi obtida a média de 0,15 ug/l (pH=4,5 e 6,5). A Concentração Mínima Bactericida (CMB) encontrada pelo autor foi maior que 100 ug/ml, e a relação entre CMB e CMI foi de 210:1, o que significou que 100% das linhagens foram inibidas, porém somente 22% foram mortas em concentrações de 10 ug/ml de penicilina. Se considerarmos que parte das bactérias são recicladas durante o processo fermentativo para obtenção de etanol, o custo da adição contínua desse produto é elevado, e que 78% das células bacterianas tratadas continuam viáveis, segundo o referido autor. Talvez esses resultados possam explicar a razão pela qual a penicilina, até hoje, não foi implantada como único método de combate a contaminação bacteriana nas destilarias.

Outros aspectos devem ser ressaltados quanto ao uso da penicilina e, provavelmente, considerados. O aumento da viscosidade e floculação do fermento, e a seleção de bactérias Gram negativas (algumas produtoras de goma) devido a ação específica para bactérias Gram positivas, são fatores limitantes. Por essas razões, está praticamente descartado o uso contínuo desse produto em condições industriais, contrariando AQUARDNE (1976), que indicava o uso da penicilina G potássica para a desinfecção na fermentação alcoólica industrial em lugar do ácido sulfúrico. Esse é portanto um método antieconômico e perigoso de desinfecção permanecendo o ácido sulfúrico como o meio mais utilizado no controle bacteriano pelas destilarias.

A clindamicina apresentou-se bem eficaz com uma faixa de CMI de 0,050 a 0,40 ug/ml para as bactérias, no pH de 4,5 e com 24 horas de incubação (TABELA 45), porém não o bastante para justificar o seu uso, pois apresentou performance semelhante a penicilina e tem um custo bem superior. Além disso, não existe o interesse da indústria farmacêutica pelo uso industrial dessas novas moléculas, pois causariam um aumento mais rápido do número de microrganismos resistentes, tornando-as impróprias para o uso terapêutico. Esse argumento vale principalmente para a ampicilina e imipenem, cujos fabricantes se recusaram a for-

necer amostras, e desestimularam a pesquisa para esta finalidade

A cefamandole, antibiótico do grupo das cefalosporinas, não demonstrou uma atividade tão satisfatória com CMI na faixa de 0,20 a 1,6 ug/ml para as bactérias, no pH 4,5 e 24 horas de incubação (TABELA 45). Elevadas concentrações (20 ug/ml) foram necessárias para inibição de 97% das linhagens de lactobacilos testados por BAYER et al. (1979).

Dentre os sais testados destacaram-se o sulfito e o nitrito de sódio e o sulfato de cobre (TABELAS 43 e 45). A faixa da CMI do sulfito de sódio para as bactérias a pH 4,5 foi de 10 a 40 ug/ml e maior que 6,0 mg/ml para a levedura, e a pH 6,5 foi de 78 a 625 ug/ml para as bactérias, e maior que 250 ug/ml para levedura, ambos após 24 horas de incubação. A utilização desse produto nas destilarias, poderia ser viável como um possível inibidor de bactérias lácticas na fermentação. O maior inconveniente do produto é o poder corrosivo, necessitando um maior conhecimento de como evitar esse sério inconveniente, talvez através da adição de anti-corrosivos. O sulfito atua melhor em pH 4,0-4,5 conforme BLOCK (1977), o que ficou nitidamente demonstrado nos resultados apresentados.

A ação antimicrobiana do sulfito sobre bactérias lácticas também foi verificada por CARR et al. (1976), sendo menor o efeito sobre as bactérias, quanto mais elevado for o pH. Isso porque no pH entre 5,0 e 9,0 ocorre mistura de bissulfito (HSO_3^-) e sulfito molecular (SO_2). Com o decréscimo do pH a proporção do SO_2 aumenta e nesta forma é que existe o maior efeito antimicrobiano.

Lactobacillus mali e *Leuconostoc mesenteroides* sofrem um rápido decréscimo de ATP a pH 4,0 quando submetidos a concentração de 1 mM de sulfito, a pH 6,0 a ação inibidora é diminuída. A incubação dessas bactérias na fase log com 2 mM de sulfito a pH=5,0 previne completamente o crescimento (HINZE et al. 1981).

O nitrito de sódio também apresentou relativamente baixos valores de CMI para as bactérias (58,5 a 117 ug/ml) porém inibiu as leveduras com valores próximos aos das bactérias (CMI= 234 ug/ml), o que difi-

cultúria sua utilização. Resultados semelhantes foram obtidos para o sulfato de cobre $5H_2O$, cuja CMI para as bactérias foi de 37,5 a 300 ug/ml, a pH 4,5 e 24 horas de incubação, porém a levedura também demonstrou ser facilmente inibida (CMI= 75 ug/ml), além do inconveniente do potencial corrosivo desse produto que causaria problemas nas instalações da indústria.

O tripolifosfato de sódio (TABELA 45) obteve CMI entre 2500 a 5000 ug/ml para bactérias, a pH 4,5 e 24 horas de incubação, e 5000 ug/ml para a levedura. No pH 6,5 a faixa de CMI foi mais baixa (CMI entre 625 e 2500 ug/ml para as bactérias e 1250 ug/ml para a levedura), porém ainda assim valores muito elevados para utilização convencional na indústria (TABELA 43). Concentrações de 5000 ug/ml de tripolifosfato de sódio causaram a inibição do crescimento de *S.*

aureus (JEN & SHELEF, 1986). O efeito inibidor foi maior em pH superior a 7,4. Devido a alta carga de natureza aniônica os polifosfatos formam complexos com cátions multivalentes, e a quelacção é influenciada pelo pH, temperatura, força iônica, conteúdo de íons metálicos e composição do meio. A formação de complexos estáveis com cátions essenciais para o crescimento normal dos microrganismos pode causar disfunções metabólicas responsáveis pela inibição do crescimento. *Lactobacillus acidophilus* e *L. casei* foram completamente inibidos com 0,5% da formulação contendo 70 a 80% de tripolifosfato, 25% de pirofosfato e 10% de fosfato (RADKOWSKI & KAFEL, 1985). Pesquisas alternativas na forma de aplicação desses produtos, poderiam viabilizar a aplicação industrial nas moendas e no tratamento da água de lavagem.

O efeito do sorbato de sódio sobre as bactérias (CMI > 1250 ug/ml) foi superior a levedura (CMI= 1250 ug/ml), tornando-o inadequado para uso na fermentação alcoólica (TABELA 43), embora RESTAINO et al. (1981) tenham obtido uma redução do crescimento de *L. plantarum* e outros lactobacilos não identificados, pela adição de 0,2% de sorbato de potássio em combinação com outros ácidos a pH 5,5.

O ácido fólico a 10,0 ug/ml inibiu completamente o crescimento de *L. bulgaricus* (ROGOSA et al. 1961), o que não ocorreu neste trabalho

onde foram testadas concentrações de até 10,0 ug/ml para *L. fermentum* e *L. mesenteroides* (TABELA 43).

A enzima lisozima não atuou nas bactérias em concentrações de até 124 ug/ml (TABELA 45) devido, provavelmente, a reação com o meio a base de cana-de-açúcar e extrato de levedura formando flocos visíveis antes da adição da cultura. A lisozima age impedindo o consumo de vários substratos devido a ação sobre a parede celular da bactéria (SHAH & KING, 1966).

Os biocidas usados na indústria alcooleira normalmente são formulados para aplicação em dosagens de no máximo 40 ug/ml. Dentre os produtos testados os seguintes compostos apresentaram CMI próxima a essa faixa: tiocianato, fenol halogenado, formaldeído, carbamatos e carbanilida (TABELA 46).

O produto a base de tiocianato (Busan 110) apresentou CMI entre 1,20 a 5,00 ug/ml para as bactérias, com 24 horas de incubação e pH 4,5 e para a levedura foi de 2,50 ug/ml. Além da CMI ser próxima entre a bactéria e a levedura, esse produto ainda é relativamente caro para o uso na produção de álcool, segundo informações do fabricante.

O dimetilditiotiocarbamato (Busan 85) e o etileno bis ditiotiocarbamato não apresentaram resultados satisfatórios com CMI acima de 50 ug/ml, com 24 horas de incubação e pH 4,5. CEREDA et al. (1981) também obtiveram resultados semelhantes para os ditiotiocarbamatos testados com CMI entre 68-200 ug/ml.

O metilditiotiocarbamato mostrou-se eficaz para *L. fermentum* com CMI= 2,50 ug/ml, no pH 4,5 e 24 horas de incubação e para a levedura (CMI=5,00 ug/ml), e bem menos eficaz para *L. mesenteroides* (CMI >40,0 ug/ml), o que levaria a uma seleção de bactérias se apenas esse método fosse adotado continuamente no controle bacteriano da fermentação.

A formulação a base de bromofenato (Biopen 400) também foi efetiva para as bactérias (TABELA 46), com CMI entre 9 a 18 ug/ml, com 24 horas de incubação e pH 4,5, e para a levedura CMI= 9,00 ug/ml, o que provavelmente prejudicaria as leveduras de fermentação, caso fosse usado

TABELA 46 - Concentração Mínima Inibitória, de formulações comerciais para bactérias lácticas e *Saccharomyces cerevisiae*, meio com pH 4,5 e incubação de 15-24 horas

Culturas - CCT					
agente		<i>S.cerevisiae</i>	<i>L. fermentum</i>		<i>L.mesenteroides</i>
inibidor		0472	1400	0559	0582 0367
Benzil Alcool					
monopoliformol (24h)	250	62,5	62,5	125	62,5
o-fenil fenol (15h)	100	100	100	100	100
	(24h)	100	200	100	200 100
tiocianato (15h)	0,310	2,50	2,50	2,50	5,0
(Busan110) (24h)	2,50	5,00	1,20	5,00	5,0
metilditio-					
carbamato (15h)	2,50	2,50	2,50	40,0	1,20
(Busan 40) (24h)	5,00	2,50	2,50	>40,0	>40,0
bromofenato (15h)	4,50	9,00	-	9,00	4,50
(Biopen 400) (24h)	9,00	18,0	-	9,00	9,00
dimetilditio-					
carbamato (15h)	25,0	>50,0	-	>50,0	50,0
(Busan 85) (24h)	50,0	>50,0	-	>50,0	>50,0
derivado de (15h)	>200	0,500	<0,250	0,500	0,500
uréia(Desfloc) (24h)	>200	2,00	0,500	0,500	4,00
Desfloc e					
Quaternário* (24h)	8,00	0,500	0,500	1,00	-
Quaternário					
de amônia (24h)	8,00	8,00	8,00	1,00	-
Desfloc e					
LSS** (24h)	16,0	0,500	<0,125	1,00	-

* - mistura com a proporção de 8 ug/ml de TCC e 32 ug/ml de quaternário de amônia puro.

** - mistura com a relação de 16 ug/ml de TCC para 29,3 ug/ml de lauril sulfato de sódio (LSS).

na concentração necessária para inibição das bactérias.

O formaldeído apresentou um resultado bastante satisfatório (TABELAS 43 e 45), indicando ser interessante para o uso na fermentação alcoólica, já que inibiu as bactérias em concentrações baixas - CMI de 6 a 11,5 ug/ml - para um período de incubação de 15 horas, e 11,5 a 23 ug/ml em 24 horas, no pHs 4,5 e 6,5. Para a levedura foi necessária uma CMI de 46 ug/ml, em 24 horas e pH4,5. Esse produto inibe *E.coli* e *S. aureus* em concentrações ótimas de 20 ug/ml, e causa a lise de várias bactérias Gram positivas e Gram negativas com aproximadamente duas vezes a CMI (HAMILTON, 1971).

A formulação Desfloc a base do ativo 3,4,4' triclorocarbanilida (TCC) age seletivamente sobre as bactérias contaminantes sem afetar a levedura do processo. Não apresenta a inconveniência de antibióticos que, além de serem caros para uso na fermentação, não permitem uso continuado devido a seleção de cepas resistentes. Essa formulação não é corrosiva e possui baixa toxicidade. Pela TABELA 46 pode-se observar a grande diferença de CMI entre as bactérias e a levedura. A CMI do Desfloc é bem inferior aos outros biocidas testados ficando entre 0,25 a 0,50 ug/ml para bactérias e acima de 200 ug/ml para a levedura, em 15 horas e a pH 4,5. Para 24 horas de incubação a CMI foi de 0,5 a 4,0 ug/ml, para as bactérias. A CMI do TCC para *S. aureus* (48 h./37°C) foi de 0,5 ug/ml e para *C. albicans* (7 dias/28°C.) 500 ug/ml (WALL-HAUFSER, 1984), resultados semelhantes aos encontrados nesse trabalho.

Segundo HAMILTON (1971), o TCC é altamente dependente do número de células, sendo encontrado pelo autor CMI de 0,078 ug/ml com inoculação de 10^7 cel./ml. Como propriedades comuns das carbanilidas estão: a atividade independente do pH, ação bacteriostática em baixas e bactericida em altas concentrações, não possuem atividade esporicida e são especialmente ativos para as bactérias Gram positivas. Pelos resultados apresentados esse produto foi escolhido para testes no modelo de fermentação mista.

4.3.2 Avaliação do uso de 1800 mg/l de Desfloc imobilizado com e sem a adição de extrato de levedura.

A avaliação do efeito do Desfloc imobilizado no controle bacteriano da fermentação alcoólica foi feita testando-se uma alta concentração (1800 mg/l) do produto, com e sem a adição de 10 g/l de extrato de levedura.

A média da viabilidade das células de leveduras (TABELA 47 e FIGURA 21) nos ciclos finais (5º, 7º e 8º ciclos) no tratamento com Desfloc (87,9%) foi bem superior ao controle (47,1%) com $P < 0,001$. Entre os tratamentos extrato de levedura (21,6%) e desfloc mais extrato de levedura (49,0%) também houve diferença significativa ($P < 0,001$), demonstrando que o produto evitou a queda acentuada desse parâmetro.

Com a taxa de brotos vivos (TABELA 48 e FIGURA 22) houve diferenças significativas apenas entre o tratamento com extrato de levedura (5,63%) e o tratamento com extrato de levedura mais Desfloc (14,6%), significativamente superior no segundo tratamento ($P < 0,001$). Apesar das diferenças nas taxas de brotos mortos (TABELA 49 e FIGURA 22) entre os tratamentos controle (6,97%) e Desfloc (2,19%), ou extrato de levedura (17,9%) e extrato de levedura mais Desfloc (12,9%), elas não foram estatisticamente diferentes ($P > 0,05$).

O número de leveduras (TABELA 50 e FIGURA 21) foi reduzido de 150×10^7 (12C) para $6,85 \times 10^7$ u.f.c./ml. (média do 7º e 8º ciclos), no tratamento com extrato de levedura, e $7,00 \times 10^7$ (média do 7º e 8º ciclos) no tratamento com extrato de levedura e Desfloc. No tratamento com Desfloc houve o dobro de células viáveis ($56,5 \times 10^7$ u.f.c./ml) em relação ao controle (média do 7º e 8º ciclos).

O número de bactérias (TABELA 51 e FIGURA 23) no 8º ciclo foi reduzido apenas no tratamento com Desfloc ($3,80 \times 10^7$ u.f.c./ml), os tratamentos controle ($55,0 \times 10^7$ u.f.c./ml) e extrato de levedura e Desfloc ($67,5 \times 10^7$ u.f.c./ml) permaneceram elevados. O tratamento com apenas extrato de levedura apresentou o maior índice de contaminação (205×10^7 u.f.c./ml).

A média da acidez no vinho (TABELA 52 e FIGURA 24), entre os ciclos 69, 79 e 89, demonstrou nitidamente a diferença entre os tratamentos com Desfloc (2,92 g/l) e o controle (6,84 g/l), bem como os tratamentos com extrato de levedura com (8,82 g/l) e sem (15,5 g/l) Desfloc, com $P<0,001$. Houve uma redução de praticamente metade da acidez nas fermentações tratadas com o desinfetante. Essa diferença provavelmente está associada com os resultados encontrados para os indicadores das condições vitais das leveduras, favorecidas pelo tratamento com o antibacteriano. Quanto ao pH do vinho (TABELA 53 e FIGURA 24), houve comportamento inverso ao da acidez entre o controle (3,59 g/l) e o Desfloc (4,14 g/l), e o tratamento com extrato de levedura com (3,68 g/l) e sem (3,45 g/l) Desfloc ($P<0,01$).

O efeito favorável do Desfloc sobre o consumo de açúcar pela levedura e produção de etanol ficou evidenciado neste teste. A média da concentração de açúcar residual no vinho (TABELA 54) dos últimos ciclos (79 e 89), após 10 horas de fermentação, foi significativamente superior ($P<0,001$), tanto entre os tratamentos controle (7,31 g/l) em relação ao tratamento com Desfloc (2,49 g/l), como também entre o tratamento com extrato de levedura (8,95 g/l) e o tratamento com extrato de levedura e Desfloc com (2,82 g/l). A média da eficiência da fermentação alcoólica (TABELA 57) entre o controle (73,8%) e o tratamento com Desfloc (77,4%) não foi significativamente diferente ($P>0,05$), porém, entre os tratamentos extrato de levedura (55,4%) e Desfloc mais extrato de levedura (66,9%), houve uma diferença de 11,5%, que em termos de rendimento foi extremamente significativo ($P<0,001$). Para o cálculo da eficiência de fermentação alcoólica foi considerada a concentração de açúcar no mosto (TABELA 55) e etanol no vinho (TABELA 56).

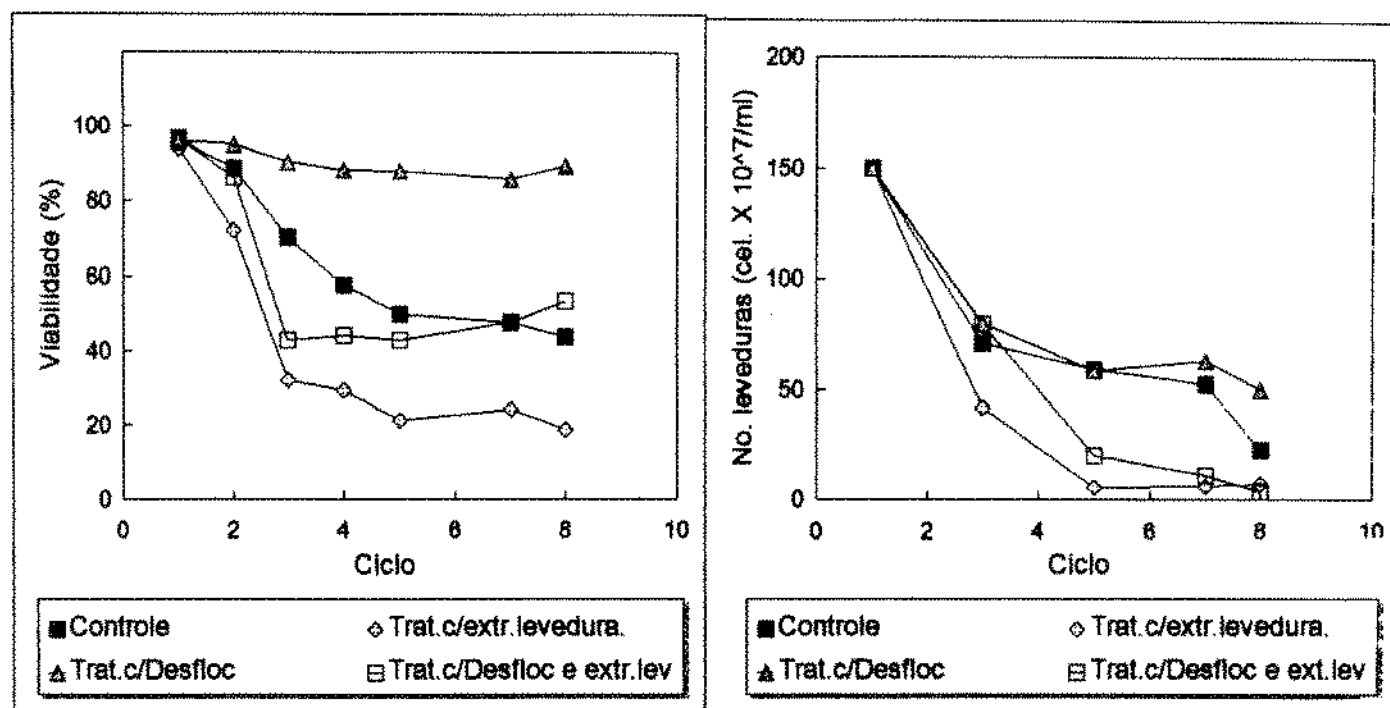


FIGURA 21 - Viabilidade e número de leveduras no teste da avaliação do uso de 1800 mg/l de Desfloc imobilizado com e sem a adição de extrato de levedura (média de 2 repetições).

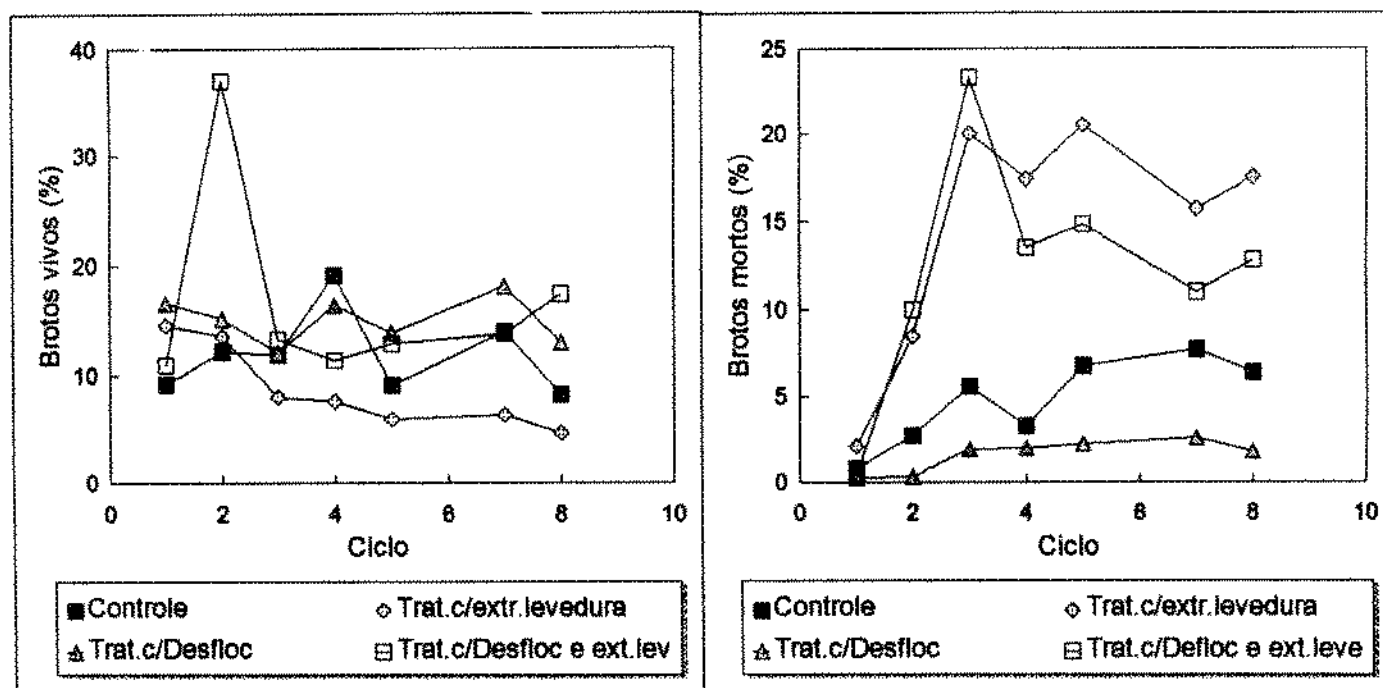


FIGURA 22 - Brotamento das leveduras no teste da avaliação do uso de 1800 mg/l de Desfloc imobilizado com e sem a adição de extrato de levedura (média de 2 repetições).

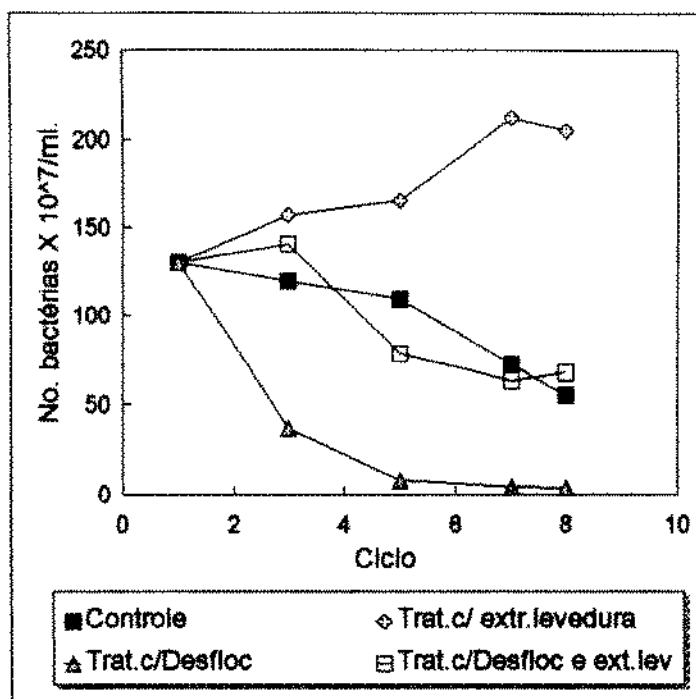


FIGURA 23 - Número de bactérias no teste da avaliação do uso de 1800 mg/l de Desfloc imobilizado com e sem a adição de extrato de levedura (média de 2 repetições).

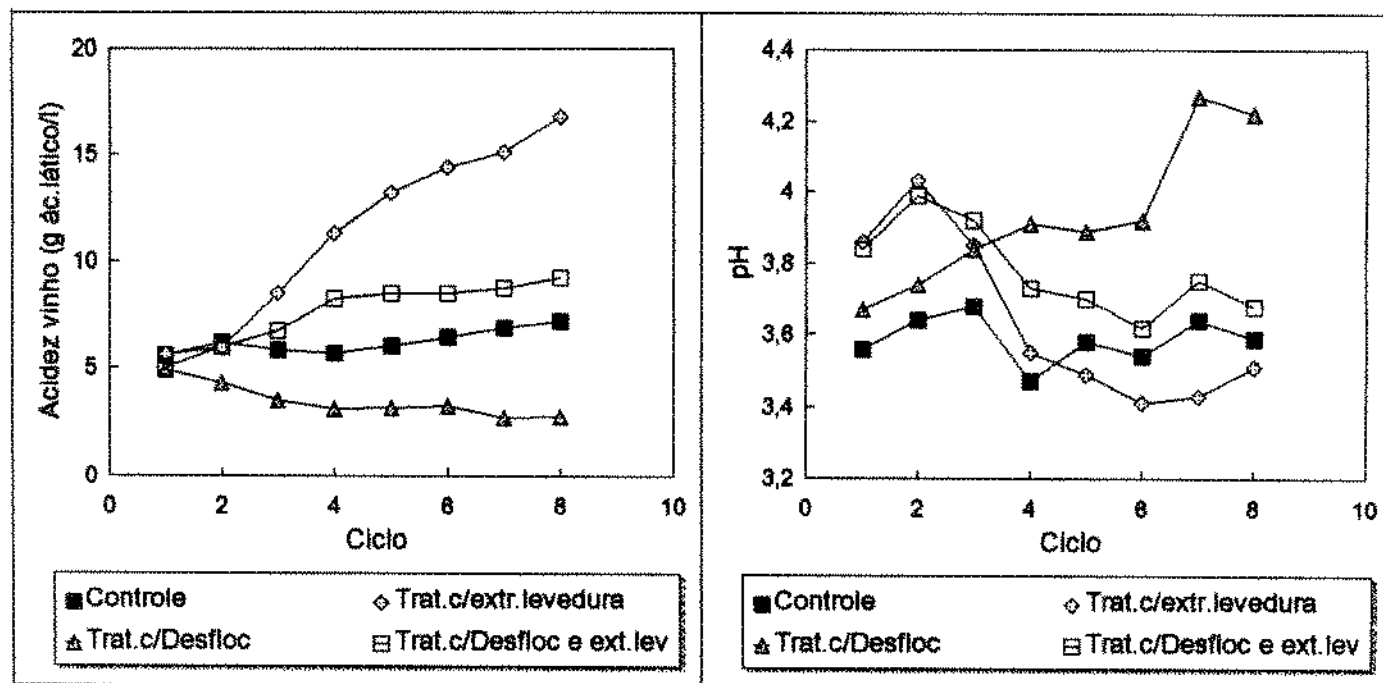


FIGURA 24 - Acidez e pH do vinho no teste da avaliação do uso de 1800 mg/l de Desfloc imobilizado com e sem a adição de extrato de levedura (média de 2 repetições).

4.3.3 Avaliação do uso de diversas concentrações de Desfloc imobilizado.

No teste anterior foi testada uma alta concentração de Desfloc (1800 mg/l) e houve um resultado satisfatório, porém nesta concentração não seria possível uma aplicação industrial do produto, tanto por questões econômicas quanto operacionais. A avaliação do desempenho de diversas concentrações do produto foi feita para determinar a menor concentração necessária, a fim de obter o controle do crescimento bacteriano durante a fermentação e evitar o consequente aumento da acidez.

O produto conseguiu um resultado satisfatório em relação ao controle. A média da acidez dos ciclos 8º ao 11º (TABELA 60 e FIGURA 27) no controle (5,68 g/l) foi significativamente superior ($P < 0,05$) aos tratamentos com Desfloc nas concentrações: 75 mg/l (4,94 g/l), 200 mg/l (4,67 g/l), 300 mg/l (4,36 g/l) e 1800 mg/l (4,45 g/l). O pH (TABELA 61 e FIGURA 27) entre o controle e os tratamentos com Desfloc, não foi significativamente alterado ($P > 0,05$) ficando numa faixa de 3,85 a 3,90, nos ciclos finais (7º ao 11º ciclo).

A média da viabilidade das leveduras (TABELA 58 e FIGURA 25) nos ciclos finais (8º e 10º) sempre foi inferior no controle (63,7%) em relação aos tratamentos com Desfloc 75 mg/l (69,8%), 200 mg/l (76,5%), 300 mg/l (77,0%) e 1800 mg/l (69,2%), provavelmente devido as diferenças no nível de acidez, superior no controle. A média da porcentagem de brotos vivos dos ciclos 8º e 10º (TABELA 59 e FIGURA 26) no tratamento com 75 mg/l (16,3%) foi superior aos demais (inclusive controle) que ficaram numa faixa de 6,23 a 9,68%. Em relação aos brotos mortos (TABELA 59 e FIGURA 26) não houve grandes variações entre os tratamentos (2,29 a 4,54%).

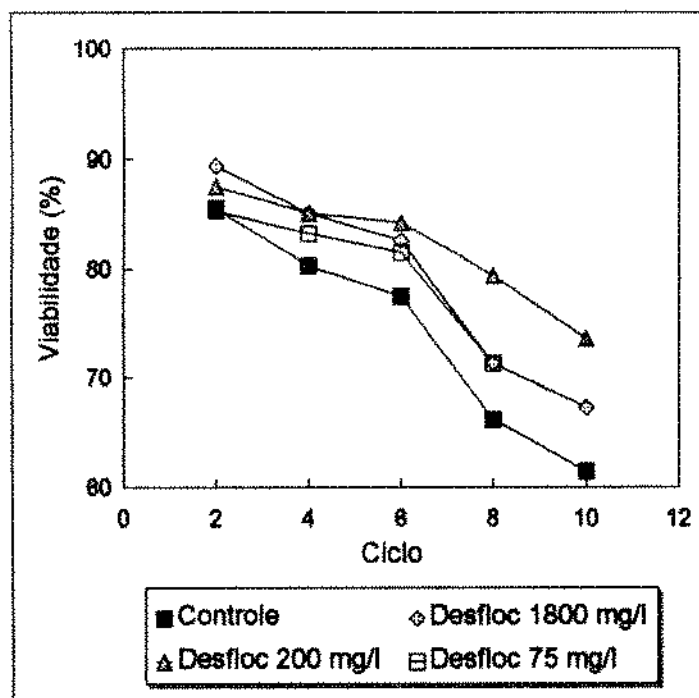


FIGURA 25 - Viabilidade das leveduras no teste da avaliação de diversas concentrações de Desfloc imobilizado.

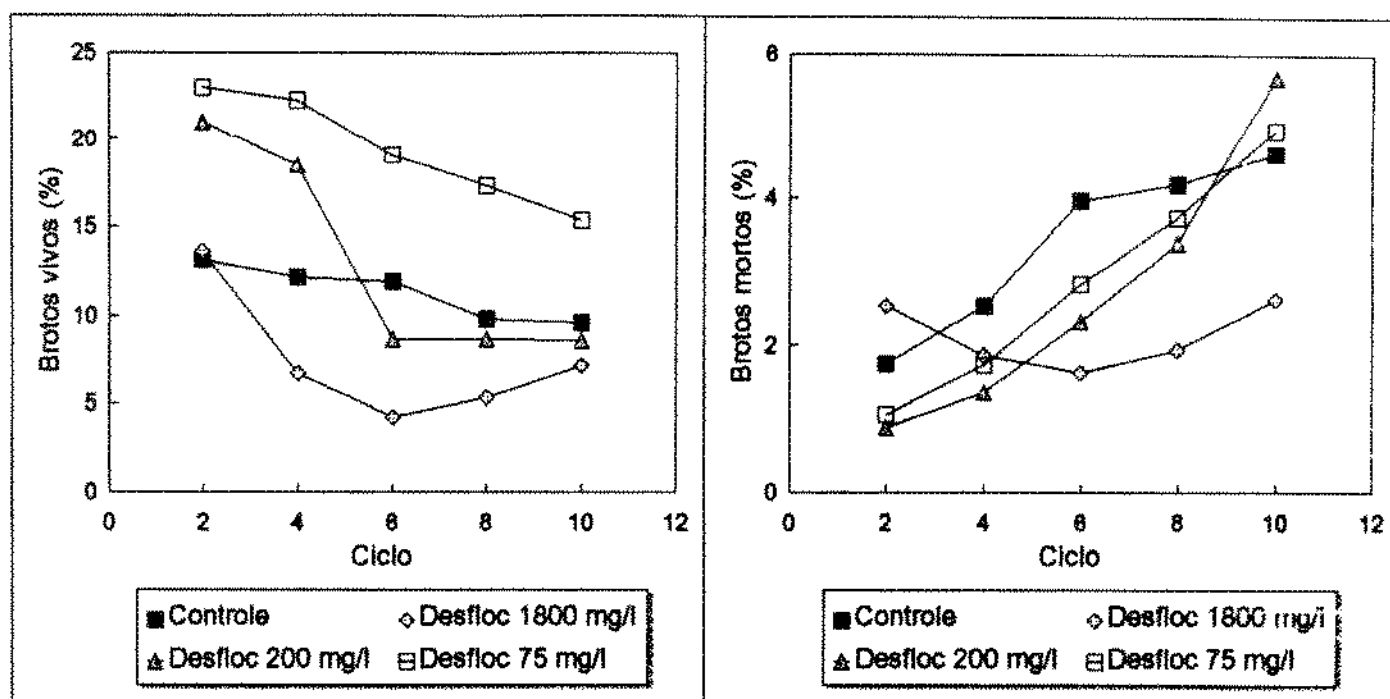


FIGURA 26 - Brotamento das leveduras no teste da avaliação de diversas concentrações de Desfloc imobilizado.

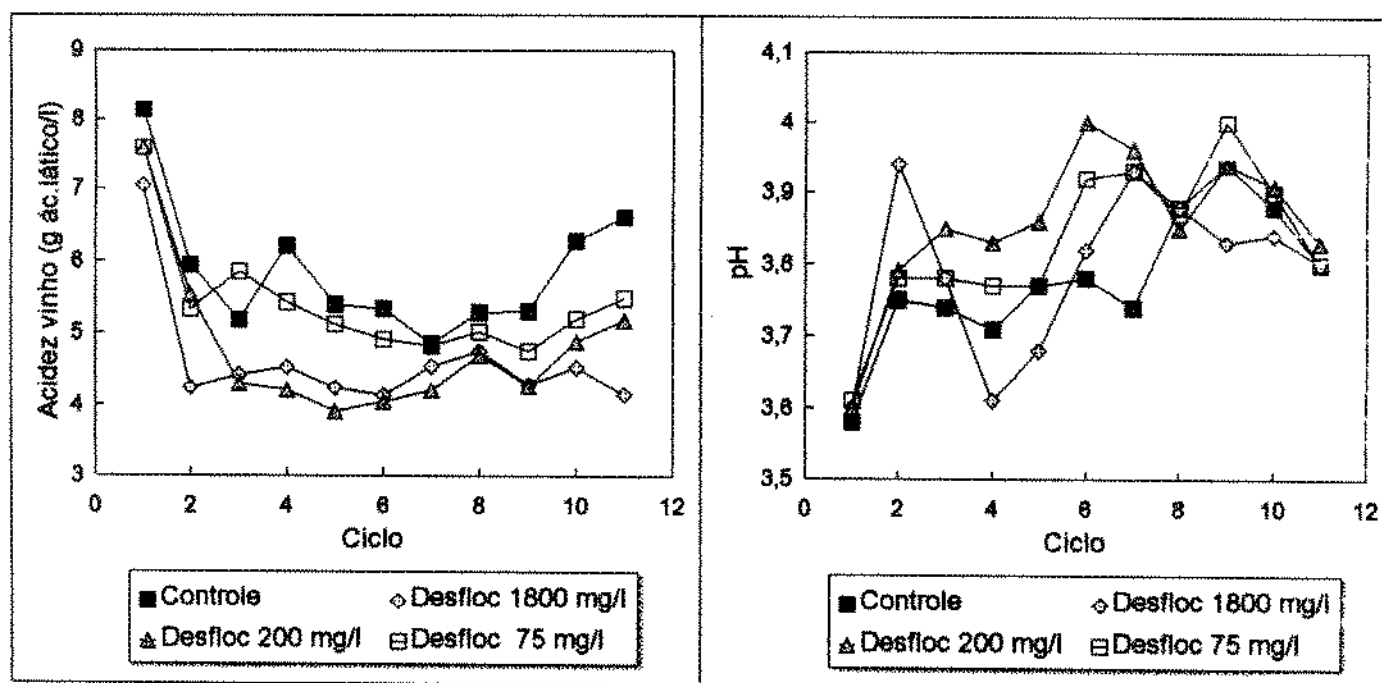


FIGURA 27- Acidez e pH do vinho no teste da avaliação de diversas concentrações de Desfloc imobilizado (média de 2 repetições).

4.3.4 Avaliação do Desfloc imobilizado com potencializador em diversas concentrações de extrato de levedura.

Concentrações da ordem de 75 mg/l de Desfloc imobilizado passam a ter interesse industrial não só do ponto de vista econômico como operacional, já que em termos de volume este produto ocuparia menos de 2% do volume da dorna. O uso de detergentes aniônicos (lauril sulfato de sódio) aumenta a solubilidade do produto imobilizado no meio aquoso, sendo testado para aumentar a potencia do desinfetante. Também foi adicionado neste último teste o extrato de levedura em diversas concentrações, e só após 5 ciclos foi introduzido o desinfetante Desfloc, com o intuito de simular uma condição drástica em termos de infecção.

Todos os tratamentos (inclusive o controle) foram executados com velocidade de centrifugação de 5000 X g até o 24º ciclo. Após este ciclo foi alterada a velocidade para 870 X g, a fim de causar a infecção bacteriana no tratamento controle.

Nos 5 primeiros ciclos houve um significativo ($P < 0,05$) aumento do nível de infecção bacteriana na fermentação, sinalizado pela média da acidez no vinho (TABELAS 65 e 66, FIGURA 31), especialmente entre o controle (6,37 g/l) e os tratamentos com extrato de levedura nas concentrações de 1,80 g/l (10,7 g/l) e 5,00 g/l (13,6 g/l). Os tratamentos com 0,200 g/l (6,39 g/l) e 0,600 g/l (8,24 g/l) não foram estatisticamente superiores ao controle ($P > 0,05$).

O Desfloc demonstrou eficiência no controle bacteriano. Houve a queda da acidez em poucos ciclos, que estava bem elevada na fase inicial sem controle do crescimento bacteriano. A acidez caiu vertiginosamente já a partir do 6º ciclo. Do 6º ao 11º ciclo, a média da acidez dos tratamentos com extrato de levedura nas concentrações de 0,200 g/l (5,51 g/l), 0,600 g/l (5,44 g/l), 1,80 g/l (8,44 g/l) e 5,00 g/l (10,2 g/l), não foram significativamente diferentes ($P > 0,05$) do controle (5,95 g/l). Do 11º ao 24º ciclo houve uma queda da acidez ainda maior, os tratamentos de 0,200 g/l (5,12 g/l), 0,600 g/l (5,30 g/l), 1,80 g/l (5,50 g/l) e 5,00 g/l (6,22 g/l), também não foram diferentes ($P > 0,05$) do controle (5,68 g/l).

Na fase final da fermentação (26º ao 30º ciclo) houve um aumento nos níveis de acidez do vinho tanto nos tratamentos com Desfloc, devido a sua ineficácia, como no controle que aumentou devido a redução da velocidade de centrifugação a partir do 24º ciclo. A média da acidez do vinho no tratamento com 5,00 g/l de extrato de levedura (8,43 g/l) foi significativamente superior ($P>0,05$) ao controle (7,35 g/l) que já estava bem acima da fase anterior (5,68 g/l). Todos os demais tratamentos: 0,200 g/l (5,79 g/l), 0,600 g/l (6,90 g/l) e 1,80 g/l (5,99 g/l) foram superiores ao controle da fase anterior. Portanto o produto controlou a acidez do vinho do 6º ao 25º ciclo, nos ciclos finais houve perda e gasto do produto, fatores que levaram ao fraco desempenho nos ciclos finais (TABELAS 65 e 66, FIGURA 31).

A média do pH do vinho do 4º e 5º ciclos (TABELAS 65 e 67, FIGURA 32) foi significativamente inferior no controle (3,59) em relação apenas ao tratamento com 5000 mg/l de extrato de levedura (3,37), nos demais tratamentos (0,200 g/l - pH 3,66; 0,600 g/l - pH 3,47 e 1,80 g/l - pH 3,44), não houve diferenças significativas ($P>0,05$).

Entre o 6º ao 24º ciclo, não houve diferenças significativas ($P>0,05$) no pH do vinho entre os tratamentos com Desfloc e extrato de levedura e o controle, ficando na faixa de 3,44 a 3,57 entre o 6º e o 10º, e de 3,73 a 3,79 entre os ciclos 11º ao 24º. Nos ciclos finais (26º ao 30º) houve uma forte diminuição do pH em relação a fase anterior com 3,50 (controle), 3,65 (0,200 g/l), 3,61 (0,600 g/l), 3,78 (1,80 g/l) e 3,66 (5,00 g/l).

A viabilidade das células de leveduras (TABELA 62 e FIGURA 28) sofreu diminuição na fase sem Desfloc e com extrato de levedura (1º ao 5º ciclo). A média da viabilidade das leveduras no 4º ciclo demonstrou a nítida diferença entre o controle (49,7%) e o tratamento com extrato de levedura, nas concentrações de 0,600 g/l (16%), 1,80 g/l (5%) e 5,00 g/l (5%). O tratamento com 0,200 g/l foi superior ao controle (54,3%). Após o 4º ciclo, houve uma recuperação da viabilidade nos tratamentos com extrato de levedura e Desfloc, no 25º ciclo os tratamentos com 0,200 g/l (51,4%), 0,600 g/l (44,6%), 1,80 g/l (51%) e 5,00

g/l (49,7%), estavam compatíveis com o controle (45%). No 30º ciclo houve uma redução da viabilidade em todos os tratamentos, devido a ineficácia do produto e ao consequente aumento da acidez no vinho, provocado pelas bactérias lácticas.

A porcentagem de brotos vivos das leveduras (TABELA 63 e FIGURA 29) também sofreu forte redução na fase sem Desfloc e com extrato de levedura (1º ao 5º ciclos). A média da porcentagem de brotos vivos no 4º ciclo apresentou diferença entre o controle (15,1%) e o tratamento com extrato de levedura, nas concentrações de 0,600 g/l (0,920 %), 1,80 g/l (0%) e 5,00 g/l (0%). O tratamento com 0,200 g/l foi superior ao controle (28,7%). Após o 4º ciclo, semelhante a viabilidade, também houve recuperação da taxa de brotos vivos nos tratamentos com extrato de levedura e Desfloc, no 25º ciclo os tratamentos com 0,200 g/l (14,3%), 0,600 g/l (13,1%), 1,80 g/l (16,4%) e 5,00 g/l (20,1%), foram superiores ao controle (8,20%). No 30º ciclo houve uma diminuição mais acentuada apenas no tratamento com 5,00 g/l (5,03%).

A média da porcentagem de brotos mortos no 4º ciclo (TABELA 59 e FIGURA 30) foi alta nos tratamentos com extrato de levedura, nas concentrações de 0,200 g/l (14,3%), 0,600 g/l (33,0%), 1,80 g/l (0%) e 5,00 g/l (0%), em relação ao controle (9,93%). O tratamento com 0,200 g/l foi superior ao controle (28,7%). Após o 4º ciclo, semelhante a viabilidade, também houve recuperação da taxa de brotos vivos nos tratamentos com extrato de levedura e Desfloc. No 25º ciclo os tratamentos com 0,200 g/l (14,3%), 0,600 g/l (13,1%), 1,80 g/l (16,4%) e 5,00 g/l (20,1%), foram superiores ao controle (8,20%). No 30º ciclo houve uma forte redução apenas no tratamento com 5,00 g/l (5,03%).

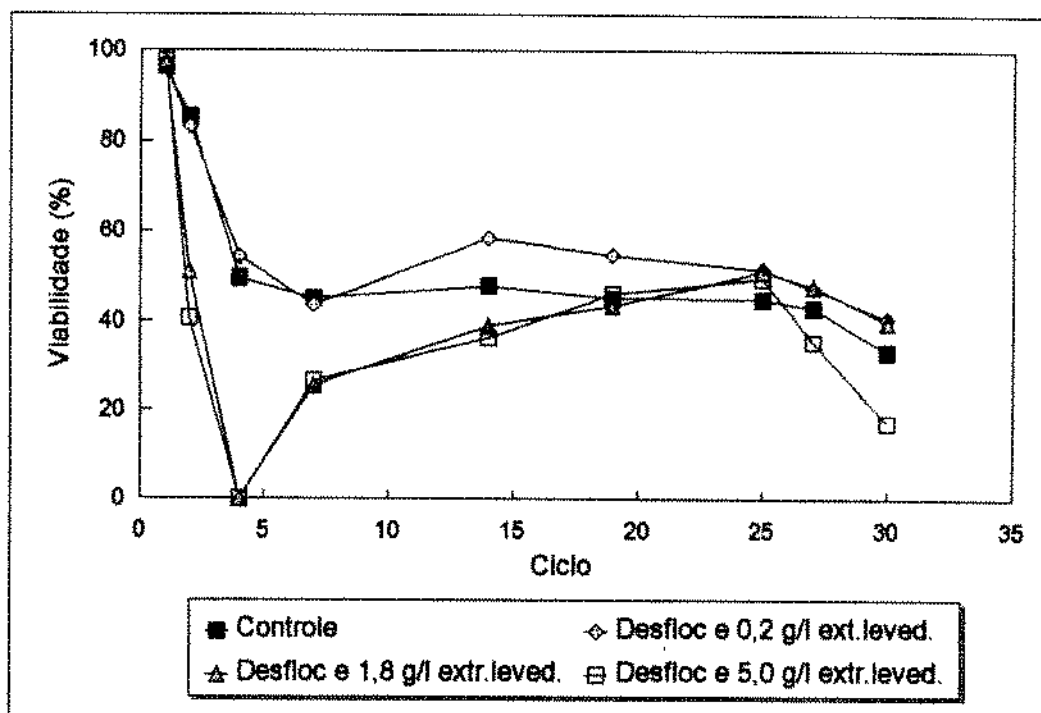


FIGURA 28 - Viabilidade das leveduras no teste da aplicação do Desfloc com potencializador em diversas concentrações de extrato de levedura.

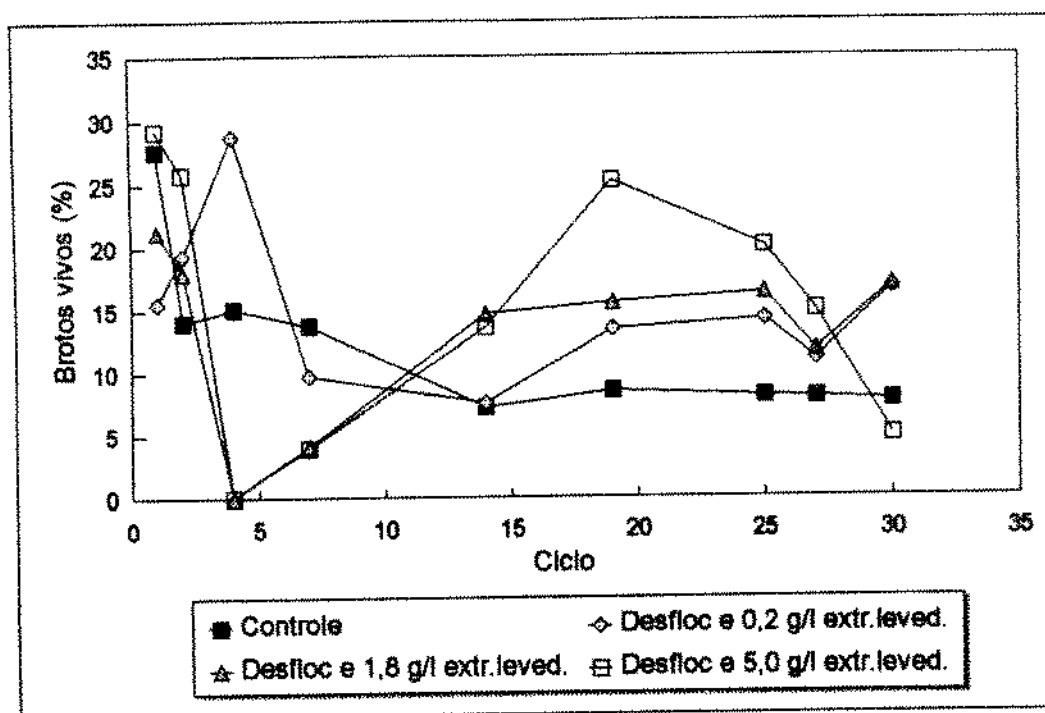


FIGURA 29 - Porcentagem de brotos vivos das células de leveduras no teste da aplicação do Desfloc com potencializador em diversas concentrações de extrato de levedura.

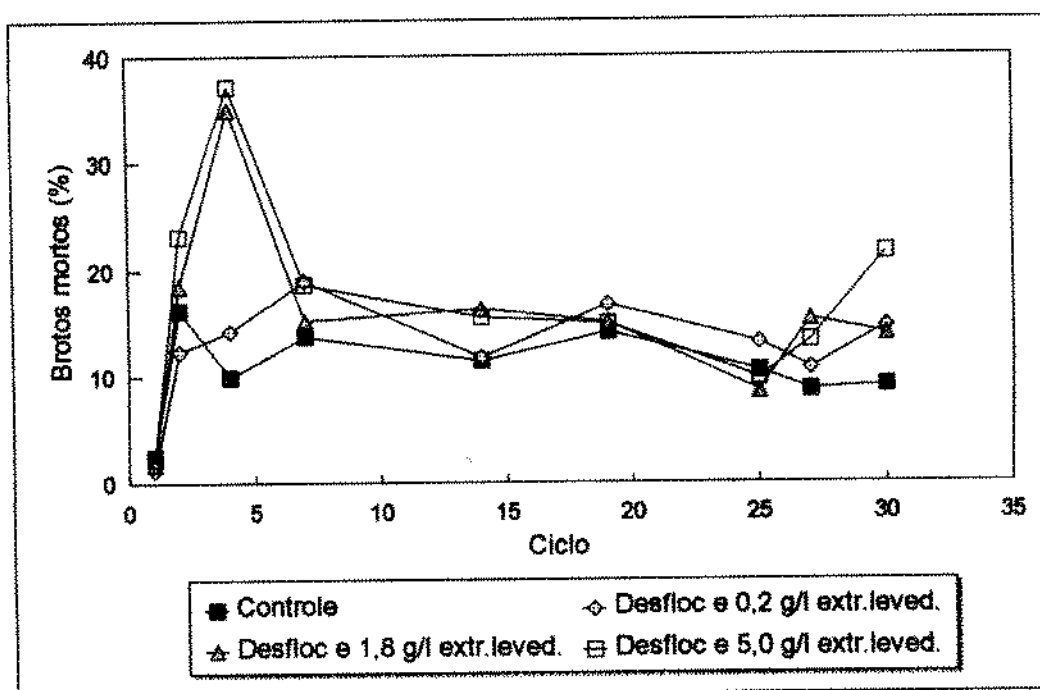


FIGURA 30 - Porcentagem de brotos mortos das células de leveduras no teste da aplicação do Desfloc com potencializador em diversas concentrações de extrato de levedura.

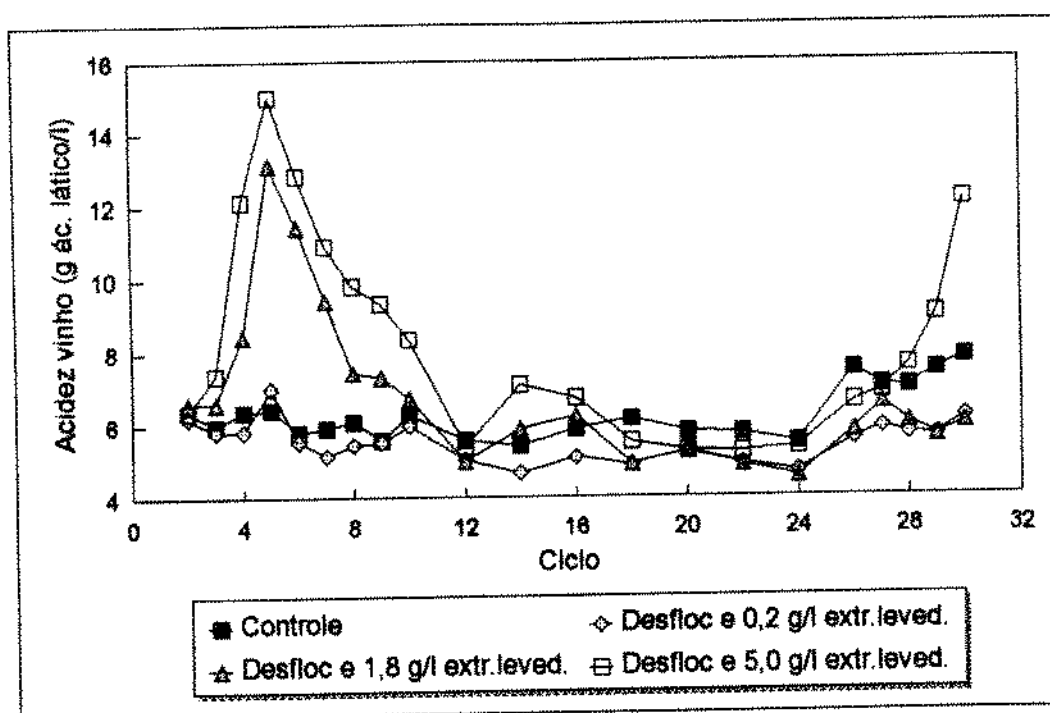


FIGURA 31 - Acidez do vinho no teste da aplicação do Desfloc com potencializador em diversas concentrações de extrato de levedura.

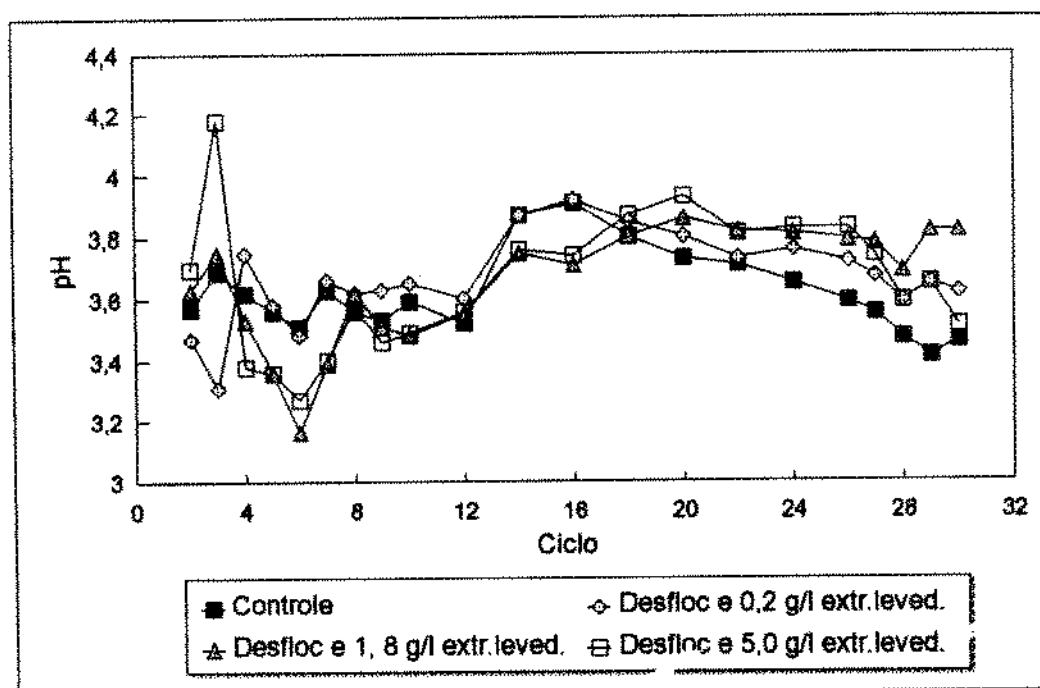


FIGURA 32 - pH do vinho no teste da aplicação do Desfloc com potencializador em diversas concentrações de extrato de levedura.

Os resultados dos ensaios de fermentação demonstraram que o Desfloc deve ser testado em escala industrial, podendo ser imobilizado em alginato e testado na concentração de 75 mg/l com auxílio do potencializador lauril sulfato de sódio em concentrações de 1,67 a 5,00 ppm. O produto além de reduzir a acidez do vinho por 20 ciclos (6º ao 25º ciclo), evitou a queda da viabilidade e brotamento das células das leveduras, evitando assim o aumento de nutrientes no meio, provenientes da morte das leveduras, que como demonstrado favorece o crescimento bacteriano.

5. CONCLUSÕES

- 5.1 A técnica de estudo da população mista leveduras e bactérias láti-
cas, quando testada em condições físico-químicas similares às ob-
tidas na indústria, e com altas concentrações de bactérias, simu-
la o crescimento da população bacteriana durante a fermentação al-
coólica.
- 5.2 Após 4 a 7 ciclos de fermentação de 20 horas cada, ocorre o ini-
cio do crescimento da população bacteriana inoculada no primeiro
ciclo e, após 8 a 12 ciclos, ocorre a inibição das leveduras de-
vido ao excesso de acidez provocada pelo aumento das bactérias.
- 5.3 O crescimento das bactérias durante a fermentação parece não ser
tão dependente do tamanho dessa população, mas das condições fí-
sico-químicas e, principalmente, dos nutrientes presentes no meio
de cultivo.
- 5.4 Vários fatores nutricionais estimulam a população bacteriana con-
taminante da fermentação alcoólica, dentre eles, extrato de leve-
dura, triptona, ácido casamínico e peptona, indicando a necessi-
dade de complementação desses produtos ou de seus derivados no
caldo de cana, para que ocorra o crescimento bacteriano durante a
fermentação.
- 5.5 Extrato de levedura (1%) propicia uma forte infecção bacteriana
no modelo estudado, levando à morte leveduras em 3 ciclos fermen-
tativos de 20 horas cada, devido ao excesso de acidez láctica no
vinho (aproximadamente 15,0 g/l), produzida pelas bactérias.
- 5.6 O conjunto dos L aminoácidos Ala, Arg, Glu, Lys, Asp, His, Phe,
Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Tre, Gly, Val, Leu, Ile, levam a uma
resposta semelhante ao extrato de levedura na fermentação, quanto

ao crescimento das bactérias e inibição das leveduras

- 5.7 Sem a complementação com os aminoácidos Leu, Ile ou Val no meio a base de caldo de cana desidratado a 4%, não ocorre crescimento de *L. fermentum* em cultivo puro
- 5.8 Complementação do meio a base de caldo de cana desidratado a 4% com as vitaminas (piridina, ácido nicotínico, tiamina, pantotênato de cálcio, PABA, ácido fólico) e sais (sulfato de manganês, sulfato de magnésio, acetato de sódio e citrato de amônia); não são necessários para que ocorra o crescimento de *L. fermentum*.
- 5.9 Os aminoácidos são os principais componentes presentes no extrato de levedura que estimulam o crescimento das bactérias lácticas durante a fermentação alcoólica.
- 5.10 A duração de cada ciclo dos ensaios de fermentação é fator importante no desenvolvimento da população bacteriana da fermentação alcoólica por leveduras. Quanto menor a duração de cada ciclo, menor o grau de competição da população de bactérias durante o cultivo misto. Ciclos com 20 horas de duração, favorecem as bactérias, o que não ocorre quando o intervalo é de 12 horas.
- 5.11 Baixas velocidades de centrifugação do fermento (da ordem de 870 a 2200 X g) favorecem o desenvolvimento das bactérias contaminantes da fermentação, e comportamento inverso ocorre com velocidades mais elevadas (5000 X g).

- 5.12 Na avaliação da inibição de *Lactobacillus fermentum* e *Leuconostoc mesenteroides* no meio a base de caldo de cana desidratado a 4% e em pH 4,5, destacaram-se os seguintes produtos com suas respectivas faixas de CMI em 24 horas de incubação: clindamicina (0,050 - 0,40 ug/ml), penicilina V ácida (0,050 - 0,20 ug/ml), sulfito de sódio (10,0 - 40,0 ug/ml) e formaldeído (11,5 - 23,0 ug/ml). Dentre as formulações comerciais destacaram-se os ativos bromofenato (9 - 18 ug/ml) e tiocianato (1,20 - 5,0 ug/ml), e a formulação Desfloc (0,25 - 0,50 ug/ml).
- 5.13 75 mg/l de Desfloc (triclorocarbanilida) imobilizado em alginato de cálcio, e combinado com lauril sulfato de sódio (1,67 a 5,00 mg/l), controlam de forma eficaz o crescimento de *L. fermentum* na fermentação alcoólica conduzida em escala de laboratório por 20 ciclos de 20 horas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J. R. Alcool e destilaria. Piracicaba, Nathanael dos Santos. Mineogr. vol. 5, pag. 55-85. 1940.
- ALMEIDA, J.R.; LIMA, U.A. de. O emprego do emulsan AL na fermentação alcoólica. Inst. Zimot. Esc. Sup. Agricultura "Luiz de Queiros" da USP, 6: 1-245. 1953.
- ALTERTHUM, F.; CRUZ, M.R. M.; VAIRO, M. L. R.; GAMBASSI, D. M. Efeito dos microorganismos contaminantes da fermentação alcoólica nas microdestilarias. STAB, 3(1): 42-49. 1984.
- ALTERTHUM, F.; CRUZ, M. R. M.; VAIRO, M. L.; GAMBASSI, D. M. Influência da penicilina v-ácida no controle das infecções bacterianas na fermentação alcoólica. Rev. Microbiol., 16(2):138-142. 1985.
- AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J. Infecção na fermentação: como evitá-la. Alcool and Açúcar. 5: 12-14. 1981.
- AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J. Infecção, problema sério na produção de álcool. Anais do Segundo Congresso Nacional da Sociedade de Técnicos Açúcareiros do Brasil, 4: 158-168. 1982.
- AMORIM, V.A.; OLIVEIRA, A.J.; ZAGO, E.A.; GALLO, C.R. Processos de fermentação alcoólica, seu controle e monitoramento. Fermentec - Centro de Biotecnologia Agrícola. Piracicaba/SP. 1989.
- ANÔNIMO. Problems in processing deteriorated cane. The Sugar J., 34(4):22-24. 1971.
- ADAC. Official Methods of Analysis. Washington - DC, Association of Official Analytical Chemists. n.22061. p.366: Fruits and Products. 1980
- AQUARONE, E. Ação da tetraciclina em fermentação alcoólica de mosto de melão. Bol. Dep. Quim. Esc. Politécnica S. Paulo, 11: 49. 1950.
- AQUARONE, E. Influência do cloranfenicol na fermentação alcoólica de melão de cana diluído. An. Farm. Quim. São Paulo, 10: 39. 1959.
- AQUARONE, E. Penicillin and tetracycline as contamination control agents in alcoholic fermentation of sugar cane molasses. Appl. Microbiol., Baltimore, 8(5): 263-268. 1960.

- AQUARONE, E. Contribuição ao estudo do emprego de associações de antibióticos como desinfetantes em fermentações alcoólicas. São Paulo, 120 p. Tese (Cátedra). Faculdade de Farmácia e Bioquímica da USP, 1968.
- AQUARONE, E. O uso de antibiótico na fermentação industrial. Química e Derivados, **120**: 32-37, 1976.
- AQUARONE, E.; BRAZZACH, M.L. O cloranfenicol como desinfetante em fermentação alcoólica de melaco de cana. An. Farm. Quim. São Paulo, **11**(3/4): 49-60, 1960.
- AQUARONE, E.; BRAZZACH, M.L. Estudos comparativos de antissépticos usados na fermentação alcoólica de mosto de melaco. Bol. Dep. Quim. Esc. Politécnica São Paulo, **16**: 1-25, 1963.
- ARGYLE, P.J., MATHISON, G.E.; CHANDAN, G.C. Production of cell-bound proteinase by *Lactobacillus bulgaricus* and its location in the bacterial cell. J. Appl. Bacteriol., **41**: 175-184, 1976.
- ASGUAR, S.S., LEVIN, E.; HAROLD, F.M. Accumulation of neutral amino acids by *Streptococcus faecalis*. J. Biol. Chem., **248**: 5225-5233, 1973.
- AYALA, H. G.; LIMPIAS, D. B.; DELFINI, A.; GARGIULO, C. A. Action of some bactericides on raw sugarcane juice. ISSCT, 16th Congress, **3**: 2909-2922, 1977.
- BARTON-WRIGHT, C.C. The microbiological assay of the vitamin B complex and amino acids. New York, Pitman Publ. Corp. 1952.
- BAYER, A.S.; CHOW, A.W.; CONCEPCION, N.; GUZE, L.B. Susceptibility of 40 lactobacilli to six antimicrobial agents with broad Gram positive anaerobic spectra. Antim. Ag. Chemoth., **14**(5): 720-722, 1978.
- BAYER, A.S.; ANTHONY, CHOW, A.W.; CONCEPCION, N.F.; GUZE, L.B. Comparative in vitro activity of five cephalosporins against lactobacilli. Antim. Ag. Chemoth., **16**(1): 112-113, 1979.
- BEELMAN, R.B., KEEN, R.M., BANNER, M.J.; KING, W.S. Interactions between wine yeast and malolactic bacteria under wine conditions. Dev. Ind. Microbiol., **23**: 107-21, 1982.

- BEVAN, D. ; BOND, J. Micro-organisms in field and mill - a preliminary survey. Proc. Ad. Soc. Sugar Cane Technol , 38th Conference, 137-143. 1971.
- BLOCK, S.S. Desinfection, Esterilization and Preservation. Seymour S. Block ed., 2^a ed. 1977.
- BORZANI, W.L. O emprego da penicilina como desinfetante em fermentação alcoólica de mosto de milho. Bol. Dept. Quim. Esc. Politécnica S. Paulo., 7:9-11. 1957.
- BORZANI, W.; AQUARONE, E. Continuous fermentation- Penicillin as contamination control agent. Agricultural and Food Chemistry, 5(8):612-616. 1957.
- BOVI, R.; MARQUES, M.D. O tratamento ácido na fermentação alcoólica. Alcool e Açúcar, 3(9): 10-13. 1983.
- BRAUNBECK, M.D.W. Efeito de biocidas sobre o comportamento de leveduras e o rendimento da fermentação. Tese de Mestrado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP. Piracicaba. 156 p. 1988.
- BRAUNBECK, M.D.W.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J. Efeito do biocida Quimatec MA (fenol não clorado) sobre o comportamento das leveduras Fleischmann, M-300A (TA-79) e IZ 1904. STAB, Açúcar, Alcool e Subprodutos, 8(2):55-58. 1989.
- BROCK, T.D. Biology of microorganisms. Englewood Cliff, New Jersey. Prentice Hall Inc, p. 191-192. Biosynthesis and nutrition. 1974.
- BRYAN-JONES, G. Lactic acid bacteria in distillery fermentation. In: CARR, J. G. et al. eds. Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food. London, Academic Press, p. 165-175. 1975.
- CARR, J.G.; DAVIES, P.A. ; SPARKS, A.H. The toxicity of sulfur dioxide towards certain lactic acid bacteria from fermented apple juice. J. Appl. Bacteriol., 40: 201-212. 1976.
- CASSIO, F.; LEÃO, C. ; van UDEN, N. Transport of lactate and other short-chain monocarboxylates in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microbiol., 53(3): 509-513. 1987.
- CEREDA, M.P.; SERRA, G.E.; CAGLIARI, A.M.; MENEGUIM, M.A. Métodos

- microbiano de avaliação de antissépticos empregados em indústrias alcooleiras. *Brasil Açucareiro*, **97**(3): 44-51. 1981.
- CLAUS, D.; BERKELEY, A.L.W. Genus *Bacillus*. In: SNEATH et al. *Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology*. Section 13. Baltimore, Williams & Wilkins. 1986.
- COLLAR, C.; MASCARDS, A.F.; DE BARBER, C.M. Amino acid metabolism by yeast and lactic acid bacteria during bread dough fermentation. *J.Food Science*, **57**(6): 1423-1427. 1992.
- CRUZ, M.R.L.; VAIRO, M.L.; GAMBASSI, D.M. Influência da penicilina V-ácida no controle das infeccões bacterianas na fermentação alcoólica. *Rev. Microb., São Paulo*, **16**(2): 138-142. 1985.
- DABRAL, S.K.; RAWAT, J.P.; MUKTAWAT, K.P.S. Ion - exchange chromatographic determination of aminoacids on impregnated papers. *An. Lett.* **22** (3): 537-543. 1989.
- DAESCHEL, M.A.; FLEMING, H.P.; Mc FELTS, R. F. Mixed culture fermentation of cucumber juice with *Lactobacillus plantarum* and yeasts. *J.Food Science*, **53**(3): 863-864. 1988.
- DAHIYA, R.S.; SPECK, M.L. Identification of stimulatory factor involved in symbiotic growth of *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. *J. Bacteriol.* **85**: 585-589. 1963.
- DAY, W.H.; SERJAK, W.C.; STRATTON, J.R.; STONE, L. Antibiotics as contamination-control agents in grain alcohol fermentation. *Agricultural and Food Chemistry*, **2**(5): 252-258. 1954.
- DE GIORI, G.S.; de VALDEZ, G.F.; de RUIZ HOLGADO, A.P.; OLIVER, G. Effect of pH and temperature on the proteolytic activity of lactic acid bacteria. *J. Dairy Science*, **68**: 2165-2171. 1985.
- DELISE, A.L.; PHAFF, H.J. The release of nitrogenous substances by brewers yeast. *Brewer's Digest*, 1:35-39. 1961.
- DIFCO. DIFCO Manual. Detroit - Michigan, 10th ed. DIFCO laboratories p.1115: Medios para pruebas de aminoacidos. 1984.
- DUNCAN, C. L.; COLMER, A. R. Coliforms associated with sugarcane plants and juices. *Appl. Microbiol.*, **12**(2): 173-177. 1964.
- DUTTA, G.N.; DEVRIESE, L.A. Sensitivity and resistance to growth

- promoting agents in animal lactobacilli. *J. Appl Bacteriol* **51**: 283-288. 1981.
- EGAN, B.T. Post-harvest deterioration losses in sugar cane in Queensland. *Proc. Congress ISSCT*, 13th, 1729-1734. 1968
- EL SODA, M.; DESMAZEAUD, M.J.; BERGERE, J.L. Peptide hydrolases of *Lactobacillus casei*: isolation and general properties of various peptidase activities. *J. Dairy Research*, **45**: 445-455. 1978.
- EL SODA, M.; DESMAZEAUD, M.J. Les peptide-hydrolases des lactobacilles du groupe *Thermobacterium* I. Mise en évidence de ces activités chez *Lactobacillus helveticus*, *L. acidophilus*, *L. lactis* e *L. bulgaricus*. *Can. J. Microbiol.*, **28**:1181-1188. 1982.
- EL SODA, M.; ZEYADA, N.; DESMAZEAUD, M.J.; MASHALY, R.; ISMAIL, A. Les peptide-hydrolases des lactobacilles du groupe *Betabacterium*. Mise en évidence chez *Lactobacillus brevis*, *L. fermentum*, *L. buchneri* e *L. cellobiosus*. *Science des Aliments*, **2**: 261-273. 1982.
- EL SODA, M.; SAID, H.; DESMAZEAUD, M.J.; MASHALY, R.; ISMAIL, A. The intracellular peptide-hydrolases of *Lactobacillus plantarum*. Comparison with *Lactobacillus casei*. *Le Lait*, **63**: 1-14. 1983
- ESSIA-NGANG, J.J.E.; LETOURNEAU, F.; VILLA, P. Alcoholic fermentation of beet molasses: effects of lactic acid on yeast fermentation parameters. *Appl. Microb. Biotechnol.* **31**: 125-128. 1989.
- ESSIA-NGANG, J.J.; WOLNIEWICZ, E.; LETOURNEAU, F.; VILLA, P. Stimulation of lactobacilli during alcoholic fermentation: action of sucrose hydrolysis by yeast. *Biotech.Lett.* **14**:741-746. 1992
- FEENEY, R.E.; STRONG, F.M. Identification of growth-stimulating substances for *Lactobacillus*. *J.Biol.Chem.* **140**: xxxviii. 1941.
- FURLETTI, M. E. M.; OLIVEIRA, M. C. F. L.; ANGELIS, D. F. Perspectivas do uso de biocidas não convencionais na desinfecção da fermentação alcoólica. *Brasil Acucareiro*, **XCVII**(3): 219-223. 1981.
- GAI, F. Os antissépticos na fermentação alcoólica. *Bol. Soc. Bras. Agronomia Rio de Janeiro*, **8**(4): 377-382. 1945.

- GALLI, Z. F. II Semana da fermentação alcoólica: fermentação do mel final das usinas de açúcar. Piracicaba, Instituto Zimotécnico, 2: 297-304. 1961.
- GALLO, C. R. Contaminantes bacterianos em mosto e dornas de fermentação alcoólica. In: EGUCHI, S. et al. Pontos Críticos Microbiológicos em Usinas de Açúcar e Alcool. Campinas, Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello. 1989.
- GARVIE, E. I. Genus *Leuconostoc*. In: SNEATH, P. H. A. et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore. Williams and Wilkins. 99 ed., v. 2, Section 12, p. 1071-1975. 1986
- GUTIERREZ, L.E., AMORIM, H.V. e BASSO, L.C. Inibidores da fermentação alcoólica. STAB Açúcar, Alcool e Subprodutos, 9(6): 24-29. 1991.
- HALVORSON, H.O. e MUEDEKING, M.R. A comparison of rates of fermentation by *Lactobacillus casei* in synthetic and yeast extract media. J. bacteriol., 54:39-40. 1947.
- HAMILTON, W.A. Membrane active antibacterial compounds. In: HUGO, W.B. Inhibition and Destruction of the Microbial Cell. London - New York. Academic Press. 1971.
- HASILIK, A.; TANNER, W. Biosynthesis of the vacuolar yeast glycoprotein carboxypeptidase Y. Conversion of precursor into enzyme. Eur. J. Biochem., 91: 567-575. 1978.
- HAYASHI, R.; BAI, Y.; HATA, T. Further conformation of carboxypeptidase Y as a metal-free enzyme having a reactive serine residue. J. Biochem. (Tokyo), 77: 1313-1318. 1975.
- HENDERSON, G.B.; ZEVELY, E.M.; HUENNEKENS, F.M. Coupling of energy to folate transport in *Lactobacillus casei*. J. Bacteriol., 139: 552-559. 1979.
- HINZE, H.; MAIER, K.; HOLZER, H. Rapid decrease of the adenosine triphosphate content in *Lactobacillus mali* and *Leuconostoc mesenteroides* after incubation with low concentration of sulfite. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung, 172(5): 389-392. 1981.

- HOLDEN, J.T. Amino acid transport in bacteria. Effect of nutritional and physiological factors. In: Amino Acids and Serum proteins. Adv. Chem. Series **44**: 96-117. 1964.
- INOUE, T.; TAKAKA, Y.; HATA, S. Studies on sake yeasts: on the tolerance of yeast to lactic acid. J. Ferm. Technol. **40**: 505-511. 1962.
- IKAWA, M.; O BARR, J.S. The nature of some growth stimulatory substances for *Lactobacillus delbrueckii*. J. Bacteriol. **71**: 401-405. 1956.
- JEN, C.M.; SHELEF, L.A. Factors affecting sensitivity of *Staphylococcus aureus* 196 E to Polyphosphates. Appl. Environ. Microbiol., **52**(4): 842-846. 1986.
- JOLLY, S.L.; PRAKASH. Removal dextran from cane juice. Intern. Sugar J., **89**: 184-185. 1987.
- JONES, R.P.; PAMMENT, N.; GREENFIELD, P.F. Alcohol fermentation by yeasts- the effect of environmental and other variables. Process Biochemistry **16**: 42-49. 1981.
- JONES, R.N.; BARRY, A.L.; GAVAN, T.L.; WASHINGTON II, J.A. Susceptibility tests: microdilution and macrodilution broth procedures. In: LENNETTE et al. Manual of Clinical Microbiology. Washington - DC. Amer. Soc. Microbiol. p. 972-977. 1985.
- JOSLYN, M.A. Yeast autolysis. I. Chemical and cytological changes involved in autolysis. Wallerstein Lab. Commum. **18**: 107-122. 1955.
- KAJI, D. A. Influência da temperatura e infecção láctica na fermentação alcoólica. Campinas. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP. 1989.
- KANDLER, O. e WEISS, N. Regular Nonsporing Gram Positive Rods. In: SNEATH et al. Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology. Baltimore. Williams and Wilkens. vol. II, Section 14, p. 1208-1234. 1986.
- KING, S.W.; BEELMAN, R.B. Metabolic interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc oenos* in a model grape juice/wine system. Am. J. Enol. Vitic. **37**(1): 53-60. 1986.

- KITAY, E.; McNUTT, W.S.; SNELL, E.E. Desoxyribosides and vitamin B12 as growth factors for lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.*, **59**: 727-738. 1950.
- KOCK, A.L. Turbidity measurements of bacterial cultures in some available commercial instruments. *Anal. Biochem.* **38**: 252-259. 1970.
- LEE, S.S.; ROBINSON, F.M.E.; WANG, H.Y. Rapid determination of yeast viability. *Biotech. Bioeng. Symp.* **11**: 641-649. 1981.
- LENNEY, J.F.; MATILE, P.; WIEMKEN, A.; SCHELLENBERG, M.; MEYER, J. Activities and cellular location of yeast proteases and their inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**: 1378-1382. 1974.
- LETOURNEAU, L.; VILLA, P. *Saccharomyces* yeast growth on beet molasses effects of substrate concentration on alcohol toxicity. *Biotechnol. Letters*, **9**(1): 53-58. 1987.
- LIMA, U. A.; GOLDONI, J. S.; CEREDA, M. P.; SOUZA, L. G. Ocorrência de microorganismos em caldo bruto, caldo misto e água de embebição em uma usina de açúcar de cana. *Brasil Açucareiro*, **4**: 337-343. 1974.
- LONDON, J. The ecology and taxonomic status of the lactobacilli. *Annu. Rev. Microbiol.*, **30**: 279-301. 1976.
- LOOZE, Y.; GILLET, L.; DECOMINCK, M.; COUTEAUX, B.; POLASTRO, E.; LEOMIS, J. Protease B from *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and characterization. *Inst. J. Pept. Protein Res.* **13**: 253-259. 1979.
- LURTON, L.; SEGAIN, J.P.; FEUILLAT, M. étude de la protéolyse au cours de l'autolyse de levures en milieu acide. *Science Aliments*, **9**(1): 111-120. 1989.
- MAIORELLA, B. BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. By Product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech. Bioeng.*, **XXV**, 103-121. 1983.
- MAN, J.C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M.E. A medium for the cultivation of *Lactobacillus*. *J. Appl. Bacteriol.* **23**: 130-135. 1960.
- MASSON, N.P.M.; BALBO-NETTO, A. Tratamento de água das torres de resfriamento. *STAB, Açúcar, Alcool e Subprodutos*, **10**(1): 42-46. 1991.
- Mc ANELLY, J.K.; SPECK, M.L. The amino acid content of a peptide

- stimulatory for *Lactobacillus casei*. J. Bacteriol., **73**: 676-678 1957.
- Mc NUTT, W.S.; SNELL, E.E. Pyridoxal phosphate and pyridoxamine phosphate as growth factors for lactic acid bacteria. J. Biol Chem. **182**: 557-567. 1950.
- MENEZES, T.J.B. Etanol, o combustível do Brasil. São Paulo, Ed. Agronômica Ceres. 1980.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry **31**, 426-428 1959
- MORISHITA, T.; DEGUSHI, Y.; YAJIMA, M.; SAKURAI, T. e YURA, T. Multiple nutritional requirements of *Lactobacilli*: genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways. J. Bacteriol., **148**(1):64-71. 1981.
- MORISHITA, T.; FUKADA, T.; SHIROTA, M.; YURA, T. Genetic basis of nutritional requirements in *Lactobacillus casei*. J. Bacteriol., **120**(3):1078-1084. 1974.
- NEVES, L. B. Tecnologia da fabricação do álcool. Rev. Bras. Química, **3**: 89-134. 1938.
- NICHOLAS, D.J.D. Utilization of inorganic nitrogen compounds and amino acids by fungi. In: AINSWORTH, G.C and SUSSMAN, A.S. The Fungi - an advanced treatise. New York - London. Academic Press. 1965.
- NOWAK, J.; TSAI, H. Purification and properties of three endopeptidases from baker's yeast. Can. J. Microbiol., **35**: 295-303 1989.
- OGDEN, K.; TUBB, R.S. Inhibition of beer-spoilage lactic acid bacteria by nisin. J.Inst.Brew., **91**:390-392. 1985.
- OGDEN, K.; WAITES, M.J. The action of nisin on beer spoilage lactic acid bacteria. J.Inst.Brew. **92**: 463-467. 1986.
- OLIVA-NETO, P. Influência da contaminação por bactérias lácticas na fermentação alcoólica pelo processo de batelada alimentada. Campinas. 190p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de

Alimentos - UNICAMP. 1990

- OLIVA-NETO, P. Evaluation of bacterial contamination in a fed - batch alcoholic fermentation process. *World J. Microbiol. Biotechn* **10**: 697-699. 1994.
- OLIVEIRA, M.C. de FURLETTI, M.E.; ANGELIS, D. F. Novos biocidas propostos a indústria alcooleira (I). Análise do desempenho do Busan 881. V Simpósio Nacional de fermentação. Universidade Federal de Viçosa-MG. 1982.
- ONNA, K.M.; HASHIMOTO, W.K. Economics of using a biocide at milling tandem. *Int. Sugar J.*, **91**: 232-234. 1989.
- ORLA-JENSEN, S. The Lactic Acid Bacteria. Copenhagen. Andr.Fre. Host. and Son. 1919.
- PAMPULHA, M.E.; LOUREIRO, V. Interaction of the effects of acetic acid and ethanol on inhibition of fermentation in *Sacchromyces cerevisiae*. *Biotechnol. Letters*, **11**(4): 269-274. 1989.
- PETERS, V.J.; PRESCOTT, J.M.; SNELL, E.E. Peptides and bacterial growth. IV. Histidine peptides as growth factors for *Lactobacillus delbrueckii* 9649. *J. Biol.Chem.*, **202**: 521-532. 1953.
- PHAFF, H.J.; MILLER, M.W.; MRAK, E.M. The Life of Yeasts. Cambridge Massachussetts. Harvard Univ. Press. , p. 83-92: Nutrition and Growth. 1966.
- POOLMAN, B.; SMID, E.J.; KONINGS, W.N. Kinetic properties of a phosphate-bond-driven glutamate-glutamine transport system in *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. *J. Bacteriol.*, **169**(6): 2755-2761. 1987.
- PRESCOTT, J.M.; PETERS, V.J.; SNELL, E.E. Peptides and bacterial growth. V. Serine peptides and growth of *Lactobacillus delbrueckii* 9649. *J.Biol.Chem.*, **202**: 533-540. 1953.
- POLLACK, M.A.; LINDNER, M. A growth stimulant for *Lactobacillus casei*. *J. Biol. Chem.*, **147**: 183-187. 1943.
- RADKOWSKI, M.; KAFEL, S. Effect of polyphosphates on lactic acid

- bacteria of processing importance. *Medycyna Weterynaryjna*, **40**(6): 328-329. 1985.
- RESTAINO, L.; KOMATSU, K. K.; SYRACUSE, M. J. Effects of acids on potassium sorbate inhibition of food-related microorganisms in culture media. *J. Food Science*, **47**: 134-143. 1981.
- RIBEREAU-GAYON, J.; PEYNAUD, E.; RIBEREAU-GAYON, P.; SUDRAUD, P. *Traite d'Œnologie, Sciences et Techniques du Vin*, Tomo 2. Dunod, Paris, 556 p. cit. p. 363, 461. 1975.
- RODINI, M. A. T. Isolamento, caracterização e identificação de bactérias contaminantes de dornas de fermentação nas destilarias de etanol. Piracicaba. 92 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - USP. 1985.
- RODINI, M. A. T. Bactérias contaminantes do processo de fermentação de etanol e sua sensibilidade frente à penicilina e pentaclorofenol. STAB, Açúcar, Alcool e Subprodutos, Piracicaba, **8**(2): 52-54. 1989.
- ROEHM, K. H. Properties of a highly purified dipeptidase from brewer's yeast. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **355**: 675-686. 1974.
- ROGOSA, M. Genus I. *Peptococcus*. Kluyver and van Niel 1936, 400. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Baltimore. The Williams and Wilkins Co., 8th ed., p. 518-522. 1974.
- ROGOSA, M.; FRANKLIN, J. G.; PERRY, K. D. Correlation of the vitamin requirements with cultural and biochemical characters of *Lactobacillus* spp. *J. Gen. Microbiol.*, **25**: 473-482. 1961.
- ROSALES, S. Y. R. Contaminantes bacterianos da fermentação etanólica: isolamento em meios diferenciais, identificação e avaliação de desinfetantes. Rio Claro. 200 p. Tese (Doutorado). Univ. Estadual Paulista. Campus de Rio Claro. 1989.
- ROSALES, S. Y. R.; ANGELIS, D. F.; FURLETTI, M. E.; OLIVEIRA, M. C. F. L. de. Action del biocida Busan 881 sobre la viabilidad celular y fermentation de *Saccharomyces cerevisiae*. 9o. Cong. Latino-Americano Microb. e 12o. Cong. Brasil. Microb. pg. 185. 1983.
- ROSALES, S. Y. R.; ANGELIS, D. F.; FURLETTI, M. E.; OLIVEIRA, M. C. F. L. de. Action del biocida Busan 881 em reapplicaciones sobre la viabilidade

- de *Saccharomyces cerevisiae*. 37a. Reunião anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. Belo Horizonte-MG. 1985
- ROTHENBUEHLER, E., AMADO, R.; SOLMS, J. Isolation and identification of amino acids derivatives from yeast. *J. Agric. Food Chem.* **30**: 439-442. 1982.
- SAMSON, F.E.; KATZ, A.M.; HARRIS, D.L. Effects of acetate and other short-chain fatty acids on yeast metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* **54**: 406. 1955.
- SANTOS, M.T.; YOKOYA, F. Characteristics of yeast cell flocculation by *Lactobacillus fermentum*. *J. Fermentation and Bioengineering.* **75**(2): 151-154. 1992.
- SATO, S.; BRAZZACH, M.L.; AQUARONE, E. Estudo comparativo de diversos desinfetantes usados na fermentação alcoólica de mostos de melão de cana. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo*, **16**: 133-144. 1980.
- SELBY-SMITH, J.; HILLIER, A.J.; LEES, G.J.; JAGO, G.R. The nature of the stimulation of the growth of *Streptococcus lactis* by yeast extract. *J. Dairy Res.* **42**(1): 123-138.
- SERRA, G. E.; CEREDA, M. P.; FERES, R. J. F.; BERTOZO, M. T.; VICENTE, A. L. Contaminação da fermentação alcoólica "floculação do fermento". *Brasil Açucareiro*, **XCIII**(6): 336-341. 1979.
- SHAH, S.B.; KING, H.K. The action of lysozyme on bacterial electron transport systems. *J. Gen. Microbiol.*, **44**: 1-13. 1966.
- SHARPE, M.E. The genus *Lactobacillus*. In: SATRR et al. *The Prokaryotes*. Berlin, Springer Verlag, p.1653-1679. 1981.
- SILVA, N. da. Influência do resfriamento em torre sobre a microbiota do caldo de cana no processo de produção de álcool. Campinas. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP. 1988.
- SIMPSON, W.J.; HAMMOND, J.R.M. The response of brewing yeast to acid washing. *J. Inst. Brew.*, **95**: 347-354. 1989.
- SMITH, F.R. Nutricional studies on *Streptococcus lactis* I. An unidentified growth factor found in yeast extract. *J. Bacteriol.*, **46**: 369-371. 1943.

- SPECK, M.L. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Washington-DC, Am. Public Health. Assoc. 1978
- SPECK, M.L., McANELLY, J.K.; WILBUR, J.D. Variability in response of lactic streptococci to stimulants in extracts of pancreas, liver and yeast. J. Dairy Sci. 41:502-508. 1958.
- STRATFORD, M.; COLEMAN, H.P.; KEENAN, M.H.J. Yeast flocculation - a dynamic equilibrium. Yeast, 4:207-209. 1988.
- STRATFORD, M.; KEENAN, M.H.J. Yeast flocculation: quantification. Yeast 4: 107-115. 1988.
- STRITTMATTER, C.F. Electron transport to oxygen in Lactobacilli. J. Biol. Chem., 234(10): 2789-2793. 1959.
- STROBEL, H.J.; RUSSEL, J.B.; DRIESSEN, A.J.M.; KONINGS, W.N. Transport of amino acids in *Lactobacillus casei* by proton-motive -force-dependent and non-proton-motive - force dependent mechanisms. J. Bacteriol. 171(1):280-284. 1989.
- SWENSON, J.M.; FACKLAM, R.R.; THORNSBERRY, C. Antimicrobial susceptibility of vancomycin-resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus* and *Lactobacillus* species. Antim. Ag. Chemoth. 34(4):543-549.
- TANTOI, M. Dextran its effects on polarization and true sucrose determination in sugar juice. Sugar J., 15(6): 36-38. 1952.
- TEREZA-RAMOS, M.; MADEIRA-LOPES, A. Effects of acetic acid on the temperature profile of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol. Letters. 12(3): 229-234. 1990.
- THOMPSON, J. Characteristics and energy requirements of an alfa aminoisobutyric acid transport system in *Streptococcus lactis*. J. Bacteriol., 127:719-730. 1976.
- TILBURY, R.H. Biodeterioration of harvested sugarcane in Jamaica. Ph. D. Thesis. University of Aston. Birmingham. 1970.
- TILBURY, R.H. Post-harvest biodeterioration of sugarcane - an economic appraisal. Society of Chemical Industry Symposium on "Post-harvest deterioration". 1972.

- TILBURY, R.H. Occurrence and Effect of Lactic Acid Bacteria in the sugar industry. In: CARR et al. Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food. New York, Academic Press. p.177-191. 1975.
- TILBURY, R.H.; HOLLINGSWORTH, B.S.; GRAHAM, S.D.; POTTAGE, P. Mill sanitation - a fresh approach to biocide evaluation. I.S.S.C T. Proceed. XVI Congress. São Paulo/SP. 1977.
- TORLONI, M. Influência da clorotetraciclina na fermentação alcoólica de mosto de melão de cana pelo processo de corte. Bol. Dept. Quim. Esc. Politécnica São Paulo, 12: 27-29. 1958.
- VAN-ZELLER, A.L.; OLIVEIRA, A.J.; ZAGO, E.A. Conservação de xarope de cana-de-açúcar pelo emprego da radiação gama. STAB, Açúcar, Açúcar, Alcool e Subprodutos, 2(4): 29-36. 1984.
- VEGA, J.L.; CLAUSEN, E.C.; GADDY, J.L. Acetate addition to an immobilized yeast column for ethanol production. Biotech. Bioeng 29: 429-435. 1987.
- VEGA, J.L.; NAVARRO, A.R.; CLAUSEN, E.C. e GADDY, J.L. effects on inoculum size on ethanol inhibition modeling and other fermentation parameters. Biotech. Bioeng. 29: 633-638. 1987
- VIEGAS, C.A.; ROSA, M. F.; SÁ-CORREIA, I.; NOVAIS, J.M. Inhibition of yeast growth by octanoic and decanoic acids produced during ethanolic fermentation. Appl. Environ. Microb. 55(1): 21-28. 1989.
- WALLHAUFSE, V.K. Praxis der sterilisation-desinfektion-Konservierung-keimidentifizierung-betriebshygiene. New York, George Thieme Verlag Stuttgart. p. 849-851. 1984.
- WEINMAN, D.E.; MORRIS, G.K.; WILLIAMS, W.L. Unidentified growth factor for a lactic acid bacterium. J.Bacteriol. 87:263-269. 1964.
- WOLF, D.H.; EHMANN, C. Carboxypeptidase S from yeast: regulation of its activity during vegetative growth and differentiation. FEBS Lett., 91: 59-62. 1978.
- YOKOYA, F. Microbiologia de Processo. In: EGUCHI, S.Y. et al. Pontos Críticos Microbiológicos em Usinas de Açúcar e Alcool. Campinas, Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello". p. 1-22. 1989.

YOKOYA, F.; OLIVA-NETO, P. Características da floculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum*. Rev Microb. (São Paulo), 22(1): 21-27. 1991.

7. APÊNDICE

TABELA 2 - Viabilidade das células de leveduras (%) no teste de avaliação de alguns parâmetros da fermentação alcoólica com adição inicial de *L. fermentum*.

ciclo	repetição			média	desvio padrão
	1	2	3		
1	97,3	96,5	96,0	96,6	0,660
2	94,3	94,4	91,7	93,5	1,53
3	91,5	89,8	91,0	90,8	0,870
4	81,8	86,0	85,4	84,4	2,27
5	81,2	85,1	-	83,1	2,75
6	85,3	81,8	83,0	83,4	1,78
7	80,5	82,3	-	81,4	1,27
8	83,1	82,7	82,1	82,6	0,500
9	78,4	79,7	80,9	79,7	1,25
10	81,3	76,6	76,8	78,2	2,66
11	78,8	75,5	81,2	78,5	2,86
12	74,6	76,6	77,5	76,2	1,48

TABELA 3 - Porcentagem de brotos vivos das células de leveduras no teste de avaliação de alguns parâmetros da fermentação alcoólica com adição inicial de *L. fermentum*

ciclo	repetição			média	desvio padrão
	1	2	3		
1	20,5	17,0	14,5	17,3	3,01
2	8,40	8,30	11,3	9,33	1,70
3	9,97	7,82	10,5	9,43	1,42
4	8,33	7,07	6,75	7,38	0,830
5	6,21	4,25	-	4,50	1,60
6	2,90	2,54	4,20	3,21	0,870
7	3,02	5,07	-	4,04	1,45
8	2,69	3,15	2,40	2,75	0,380
9	2,61	1,91	2,29	2,27	0,350
10	3,97	2,52	2,25	2,91	0,920
11	2,07	1,41	2,38	1,95	0,490
12	5,04	2,25	4,42	3,90	1,46

TABELA 4 - Porcentagem de brotos mortos das células de leveduras no teste de avaliação de alguns parâmetros da fermentação alcoólica com adição inicial de *L. fermentum*.

ciclo	repetição			média	desvio padrão
	1	2	3		
1	0,190	0,810	0,230	0,410	0,350
2	0,205	1,24	0,950	0,800	0,530
3	1,44	1,12	1,75	1,44	0,310
4	3,03	3,17	2,25	2,82	0,500
5	1,75	1,47	-	1,61	0,200
6	0,960	0,610	-	0,780	0,250
7	2,18	2,45	-	2,31	0,190
8	1,43	1,22	1,29	1,31	0,110
9	0,950	1,19	1,25	1,13	0,160
10	0,826	1,26	2,47	1,52	0,850
11	0,691	2,36	2,38	1,81	0,970
12	2,31	2,46	2,00	2,26	0,230

TABELA 5 - Número de células de leveduras no inóculo de cada ciclo, expressos em u.f.c./ml $\times 10^7$, no teste de avaliação de alguns parâmetros da fermentação alcoólica com adição inicial de *L. fermentum*

ciclo	repetição			média	desvio padrão
	1	2	3		
1	48,0	48,0	48,0	48,0	0
2	188	86,0	89,0	121	58,0
3	92,5	84,5	74,5	83,8	9,01
4	118	107	150	125	22,2
5	131	107	122	120	12,1
6	104	133	119	119	14,8
7	122	111	98,0	111	12,3
8	122	115	136	124	10,5
9	118	109	87,5	105	15,7
10	104	84,5	96,0	94,8	9,80
11	86,0	79,0	-	82,5	4,95
12	92,5	90,0	98,5	93,0	1,80
13	87,0	91,5	95,0	91,2	4,01

TABELA 6 - Número de células de bactérias lácticas no inóculo de cada ciclo, expressos em u.f.c./ml $\times 10^7$, no teste de avaliação de alguns parâmetros da fermentação alcoólica com adição inicial de *L. fermentum*.

ciclo	repetição			média	desvio padrão
	1	2	3		
1	58,5	58,5	58,5	58,5	0
2	107	52,0	60,0	73,0	29,7
3	50,0	33,0	38,5	40,5	8,67
4	52,0	37,5	55,5	48,3	9,54
5	56,0	33,0	53,5	47,5	12,6
6	43,5	33,0	41,0	39,2	5,48
7	39,0	33,5	32,0	34,8	3,68
8	48,0	35,0	43,5	42,2	6,60
9	61,0	51,0	36,4	49,5	12,4
10	62,0	46,5	42,5	50,3	10,3
11	80,5	51,5	40,0	57,3	20,9
12	100	86,0	81,5	89,2	9,65
13	82,5	94,0	80,0	85,5	7,47

TABELA 7 - pH do vinho delevurado no final de cada ciclo, no teste de avaliação de alguns parâmetros da fermentação alcoólica com adição inicial de *L. fermentum*.

ciclo	repetição			média	desvio padrão
	1	2	3		
1	3,37	3,33	3,34	3,35	0,020
3	3,44	3,40	3,38	3,41	0,030
4	3,54	3,48	3,45	3,49	0,050
5	3,47	3,44	3,45	3,45	0,010
6	3,42	3,40	3,41	3,41	0,010
7	3,39	3,40	3,39	3,39	0,060
8	3,37	3,38	3,45	3,40	0,040
9	3,29	3,36	3,40	3,35	0,050
10	3,40	3,35	3,41	3,39	0,030
11	3,26	3,37	3,39	3,34	0,070
12	3,25	3,37	-	3,31	0,080
13	3,16	3,26	3,31	3,24	0,076

TABELA 8 - Resumo das faixas de resultados referentes aos parâmetros avaliados no tratamento controle de 4 ensaios de fermentação.

Parâmetros	Fase 1		Fase 2		TABELA
	mínimo	máximo	mínimo	máximo	
Ciclo	1	7	8	13	7
	1	4	5	9	13
	1	3	4	9	20
	1	4	5	8	52
Viabilidade (%)	81,4	96,6	76,6	82,6	2
	61,3	96,0	55,5	65,0	9
	96,0	98,4	67,0	89,6	16
	57,6	96,4	43,8	49,8	47
Broto vivo (%)	3,21	17,3	1,95	3,90	3
	8,00	19,3	9,08	14,1	10
	6,45	29,8	7,30	11,0	17
	9,24	19,1	8,23	14,0	48
Broto morto (%)	0,400	2,82	1,13	2,26	4
	0,380	3,97	5,04	5,43	11
	0,240	0,630	1,53	3,88	18
	0,750	5,60	6,42	7,72	49
Acidez vinho (g/l expr. ac. lático)	5,07	6,16	6,89	-	14
	3,12	3,93	3,40	6,83	21
	5,59	6,19	6,03	7,20	52
pH	3,35	3,49	3,24	3,40	7
	3,01	3,28	2,81	2,88	15
	4,08	4,28	3,84	4,38	22
	3,47	3,68	3,54	3,64	53
Nº Bactérias (*10 ⁷ ufc/ml)	34,8	73,0	42,2	89,2	6
	97,0	159	135	174	13
	15,0	28,2	24,0	186	20
	120	130	55,0	109	34
Nº Leveduras (*10 ⁷ ufc/ml)	48,0	125	91,0	124	5
	52,5	103	38,0	54,0	12
	78,2	105	29,8	81,0	19
	70,9	150	23,0	58,7	33
Eficiência ferment. (%)	71,8	72,8	71,0	78,0	57

TABELA 9a - Viabilidade das células de leveduras (%) sem adição de extrato de levedura no mosto (controle).

ciclo	controle				média	desvio padrão
1	95,1	97,0	-	96,0	96,0	1,31
2	87,0	86,6	82,6	-	85,4	2,43
3	76,4	59,1	70,2	-	68,6	8,76
4	74,8	53,4	55,6	-	61,3	11,8
5	51,9	69,8	53,9	48,6	56,0	9,42
6	60,5	52,0	59,0	50,7	55,5	4,92
7	70,1	-	60,0	-	65,0	7,14
8	72,0	49,5	56,0	56,2	58,4	9,57
9	70,4	59,2	-	-	60,0	6,25

TABELA 9b - Viabilidade das células de leveduras (%) com a adição de 10 g/l de extrato de levedura no mosto.

ciclo	repetição				média	desvio padrão
	1	2	3	4		
1	90,5	88,7	-	89,0	89,6	1,27
2	40,5	41,9	40,7	-	41	0,75
3	19,5	16	14,1	-	16,5	2,74
4	<5	<5	<5	<5	<5	-
5	<5	<5	<5	<5	<5	-
6	15,4	4,90	3,00	6,40	7,42	5,49
7	21,2	8,50	9,90	-	13,0	3,60
8	19,0	7,45	26,0	13,3	16,4	7,93
9	26,8	9,43	33,8	25,5	23,9	10,3

TABELA 10a - Porcentagem de brotos vivos das células de leveduras sem adição de extrato de levedura no mosto (controle)

ciclo	repetição				média	desvio padrão
	1	2	3	4		
1	6,22	10,7	-	8,23	8,46	3,17
2	7,14	8,42	8,43	-	8,00	0,74
3	30,1	8,56	18,8	-	19,1	10,8
4	22,8	18,0	17,1	-	19,3	3,06
5	16,1	11,1	15,7	13,4	14,1	2,31
6	15,0	12,8	11,5	11,8	12,8	1,58
7	13,9	-	7,35	-	10,6	4,63
8	9,22	11,7	6,22	9,18	9,08	2,24
9	10,0	9,84	-	8,83	9,56	0,630

TABELA 10b - Porcentagem de brotos vivos das células de leveduras com a adição de 10 g/l de extrato de levedura no mosto -

ciclo	repetição				média	desvio padrão
	1	2	3	4		
1	51,0	56,2	-	54,1	53,6	3,68
2	6,16	10,3	3,89	-	6,78	3,25
3	3,91	1,60	10,8	-	5,44	4,78
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	1,43	1,09	-	-	1,26	0,24
7	1,97	0,67	3,30	-	1,98	1,31
8	3,45	-	5,65	1,02	3,37	2,32
9	1,56	0,67	2,56	0,49	1,32	0,95

TABELA 11a - Porcentagem de brotos mortos das células de leveduras sem adição de extrato de levedura no mosto (controle)

ciclo	repetição				média	desvio
	1	2	3	4		
1	0,370	0,390	-	0,379	0,380	0,014
2	1,53	2,10	3,00	-	2,21	0,740
3	3,24	4,96	1,57	-	3,26	1,70
4	1,63	5,33	4,96	-	3,97	2,04
5	4,90	3,83	5,90	5,55	5,04	0,910
6	4,81	5,40	5,01	5,60	5,20	0,360
7	4,42	-	6,45	-	5,43	1,43
8	3,87	7,21	3,63	6,25	5,24	3,00
9	4,53	4,82	-	6,39	5,25	1,00

TABELA 11b - Porcentagem de brotos mortos das células de leveduras com a adição de 10 g/l de extrato de levedura no mosto

ciclo	repetição				média	desvio padrão
	1	2	3	4		
1	0,590	11,3	-	6,25	6,05	5,36
2	4,11	8,26	9,69	-	7,35	2,90
3	8,38	12,4	12,8	-	11,2	2,44
4	21,1	25,0	23,0	-	23,0	1,95
5	22,2	24,3	24,0	-	23,5	1,13
6	9,84	4,92	9,80	5,60	7,54	2,65
7	4,93	13,4	11,0	-	9,78	4,36
8	12,0	18,1	7,91	10,0	12,1	4,39
9	5,23	12,5	11,8	4,41	8,48	4,25

TABELA 12a- Número de células de leveduras no inóculo de cada ciclo, expressos em u.f.c./ml $\times 10^7$, sem adição de 10 g/l de extrato de levedura no mosto (controle).

ciclo	repetição				média	desvio padrão
	1	2	3	4		
1	108	116	84,0	-	103	17,0
2	147	145	131	139	140	7,19
3	173	268	164	94,0	175	71,5
4	54,0	51,5	43,5	61,0	52,5	7,22
5	44,5	52,0	53,0	-	50,0	4,64
6	47,5	57,1	45,2	49,0	50,0	4,48
7	57,5	65,0	32,5	42,5	49,4	14,6
8	34,0	52,5	32,0	32,0	38,0	9,96
9	60,0	58,0	34,0	63,5	54,0	13,4

TABELA 12b - Número de células de leveduras no inóculo de cada ciclo, expressos em u.f.c./ml $\times 10^7$, com adição de 10 g/l de extrato de levedura no mosto

ciclo	repetição				média	desvio padrão
	1	2	3	4		
1	123	159	134	-	139	18,4
2	118	115	120	96,0	112	11,0
3	131	97,0	38,0	54,0	57,0	21,0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	5,94	0,640	0,650	2,02	2,02	2,62
7	6,50	1,86	1,25	1,89	2,87	2,43
8	10,2	-	2,60	5,00	5,93	5,49
9	13,0	6,70	16,0	14,1	12,4	4,02

TABELA 13a - Número de células de bactérias lácticas no inóculo de cada ciclo, expressos em u.f.c./ml $\times 10^7$, sem extrato de levedura no mosto (controle)

ciclo	repetição				média	desvio padrão
	1	2	3	4		
1	157	156	163	-	159	3,79
2	125	125	133	116	122	8,46
3	88,0	117	111	101	104	13,0
4	70,0	139	81,5	-	97,0	37,0
5	-	130	130	145	135	8,66
6	170	-	125	190	162	33,3
7	102	170	241	173	174	57,0
8	92,5	149	127	88,5	114	29,0
9	125	195	195	-	171	40,4

TABELA 13b - Número de células de bactérias lácticas no inóculo de cada ciclo, expressos em u.f.c./ml $\times 10^7$, com adição de 10 g/l de extrato de levedura no mosto.

ciclo	repetição				média	desvio padrão
	1	2	3	4		
1	191	161,5	140	-	164	25,6
2	146	138	132	144	140	6,32
3	311	290	250	387	309	57,5
4	380	465	560	470	469	73,5
5	490	520	-	450	489	35,1
6	825	1000	405	485	679	281
7	-	381	337	301	340	40,1
8	240	-	470	255	322	129
9	320	-	375	280	325	48,0

TABELA 14a - Acidez do vinho delevurado, expressa em g/l ácido lático, sem adição de extrato de levedura no mosto (controle).

ciclo	repetição				média	desvio padrão
	1	2	3	4		
1	4,96	5,05	5,13	5,13	5,07	0,0810
2	5,31	-	4,96	5,90	5,39	0,475
3	5,22	6,25	6,33	6,85	6,16	0,682
4	5,56	6,33	5,65	6,25	5,95	0,400
5	5,82	7,19	6,85	7,70	6,89	0,794

TABELA 14b - Acidez do vinho delevurado, expressa em g/l ácido lático, com adição de 10 g/l de extrato de levedura no mosto.

ciclo	repetição				média	desvio padrão
	1	2	3	4		
1	4,96	5,31	5,13	5,13	5,13	0,143
2	7,19	7,53	6,93	7,10	7,19	0,252
3	12,3	11,9	11,8	12,6	12,1	0,370
4	14,7	12,7	14,3	15,4	14,3	1,14
5	14,7	14,4	14,4	14,7	14,5	0,173

TABELA 15a - pH do vinho delevurado no final de cada ciclo, sem extrato de levedura no mosto (controle).

ciclo	repetição				média	desvio padrão
	1	2	3	4		
1	3,23	3,20	3,22	3,19	3,21	0,018
2	3,27	3,29	3,33	3,23	3,28	0,042
3	3,24	3,29	3,23	3,26	3,25	0,026
4	3,15	2,95	3,06	2,89	3,01	0,115
5	3,03	2,82	2,87	2,81	2,88	0,102
6	2,89	-	2,76	2,18	2,81	0,07
7	2,90	2,74	2,82	2,84	2,82	0,07
8	2,90	2,72	2,79	2,98	2,85	0,115
9	2,89	2,73	2,75	3,10	2,87	0,21

TABELA 15b - pH do vinho delevurado no final de cada ciclo, com adição de 10 g/l de extrato de levedura no mosto.

ciclo	repetição				média	desvio padrão
	1	2	3	4		
1	3,60	3,54	3,61	3,59	3,58	0,030
2	3,51	3,50	3,52	3,51	3,51	0,008
3	2,90	2,90	2,96	2,88	2,91	0,035
4	2,51	2,50	2,52	2,50	2,51	0,010
5	2,12	2,09	2,11	2,10	2,10	0,013
6	2,10	2,08	2,10	2,10	2,09	0,010
7	2,13	2,11	2,15	2,18	2,14	0,030
8	2,18	2,11	2,19	2,26	2,18	0,060
9	2,32	2,17	2,25	2,35	2,27	0,080

TABELA 16a - Viabilidade das células de leveduras (%) no teste do efeito da inoculação inicial do contaminante e adição de aminoácidos no mosto (controle).

ciclo	repetição		média	desvio padrão
	1	2		
1	99,7	97,1	98,4	1,84
2	97,6	97,7	97,6	0,070
3	95,5	96,5	96,0	0,710
4	91,3	88,0	89,6	2,33
6	85,7	85,1	85,4	0,424
7	74,0	74,8	74,4	0,566
8	64,5	69,5	67,0	3,53
9	66,9	69,5	68,2	1,84

TABELA 16b - Viabilidade das células de leveduras (%), sem inoculação inicial do contaminante e sem adição de aminoácidos no mosto.

ciclo	repetição		média	desvio padrão
	1	2		
1	99,5	-	99,5	-
2	96,3	97,0	96,6	0,490
3	94,2	94,3	94,2	0,0070
4	90,8	91,2	91,0	0,280
6	84,5	84,5	84,5	0
7	80,5	75,8	78,1	3,32
8	82,6	76,0	79,3	4,67
9	77,9	72,0	75,0	4,17

TABELA 16c - Viabilidade das células de leveduras (%), com a inoculação inicial do contaminante e adição de aminoácidos no mosto.

ciclo	repetição		média	desvio padrão
	1	2		
1	96,5	96,5	96,5	-
2	89,4	86,4	87,9	1,46
3	83,7	81,6	82,6	1,48
4	77,4	72,7	75,0	3,32
5	-	64,8	64,8	-
6	56,6	54,2	55,4	1,70
7	36,4	39,8	38,1	2,40
8	27,7	30,6	29,1	1,43
9	32,0	27,2	29,6	3,39

TABELA 17a - Porcentagem de brotos vivos das células de leveduras no teste do efeito da inoculação inicial do contaminante e adição de aminoácidos no mosto (controle).

ciclo	repetição		média	desvio padrão
	1	2		
1	28,0	31,7	29,8	2,62
2	14,9	18,2	16,5	2,33
3	6,12	6,79	6,45	0,470
4	9,20	12,9	11,0	2,62
6	7,59	10,1	8,84	1,77
7	7,92	7,23	7,57	1,66
8	10,4	6,84	8,62	2,93
9	7,04	7,56	7,30	2,70

TABELA 17b - Porcentagem de brotos vivos das células de leveduras sem inoculação inicial do contaminante e sem adição de aminoácidos no mosto.

ciclo	repetição		média	desvio padrão
	1	2		
1	24,7	-	24,7	-
2	9,98	10,2	10,1	0,160
3	5,78	7,57	6,67	1,27
4	4,58	4,70	4,64	2,15
6	16,1	16,0	16,1	-
7	16,3	8,57	12,4	5,46
8	19,1	18,0	18,5	0,778
9	13,9	18,9	16,4	3,35

TABELA 17c - Porcentagem de brotos vivos das células de leveduras com inoculação inicial do contaminante e com adição de aminoácidos no mosto.

ciclo	repetição		média	desvio padrão
	1	2		
1	24,5	25,3	24,9	0,560
2	15,6	12,7	14,1	2,05
3	7,62	10,5	9,06	2,03
4	12,3	9,77	11,0	1,79
5	8,40	-	8,40	-
6	4,50	6,70	5,60	1,56
7	13,8	6,02	9,91	5,50
8	4,40	7,97	6,18	2,52
9	6,80	5,44	6,12	0,962

TABELA 18a - Porcentagem de brotos mortos das células de leveduras no teste do efeito da inoculação inicial do contaminante e adição de aminoácidos no mosto (controle)

ciclo	repetição		média	desvio
	1	2		
1	0,300	0,950	0,630	0,690
2	0,430	0,160	0,290	0,190
3	0,300	0,180	0,240	0,080
4	1,530	4,29	1,91	1,95
6	1,52	1,53	1,53	0,0070
7	3,40	3,91	3,65	0,360
8	4,30	2,14	3,22	1,52
9	4,96	2,80	3,88	1,53

TABELA 18b - Porcentagem de brotos mortos das células de leveduras sem inoculação inicial do contaminante e sem adição de aminoácidos no mosto.

ciclo	repetição		média	desvio padrão
	1	2		
1	1,34	-	1,34	-
2	0,400	0,320	0,360	0,0566
3	0,800	0,200	0,500	0,420
4	0,550	0,980	0,760	0,300
6	1,21	1,23	1,22	0,0141
7	1,69	1,62	1,65	0,0495
8	1,47	1,45	1,46	0,0141
9	1,91	2,00	1,95	0,0636

TABELA 18c - Porcentagem de brotos mortos das células de leveduras com a inoculação inicial do contaminante e adição de aminoácidos no mosto

ciclo	repetição		média	desvio padrão
	1	2		
1	0,700	0,930	0,810	0,160
2	2,70	4,64	3,67	1,37
3	4,50	3,59	4,04	0,640
4	3,96	5,23	4,59	0,900
5	6,80	-	6,80	-
6	4,50	8,70	6,60	2,97
7	6,28	17,1	11,7	7,60
8	12,3	14,4	13,3	1,48
9	11,6	11,7	11,6	0,070

TABELA 19a - Número de células de leveduras no inóculo de cada ciclo, expressos em u.f.c. $\times 10^7$ /ml., no teste do efeito da inoculação inicial do contaminante e adição de aminoácidos no mosto (controle).

ciclo	repetição			média	desvio padrão
	1	2	3		
1	95,0	74,5	65,0	78,2	15,3
2	99,5	105	92,5	99,2	6,51
3	110	106	99,0	105	10,2
4	77,0	85,0	-	81,0	5,66
5	42,3	50,5	64,5	52,4	11,2
6	39,0	55,5	57,5	50,7	12,2
7	50,0	54,5	66,5	57,0	8,53
8	29,5	30,5	29,5	29,8	0,580
9	51,0	60,0	54,5	55,2	8,49

TABELA 19b - Número de células de leveduras no inóculo de cada ciclo, expressos em u.f.c. $\times 10^7$ /ml., sem inoculação inicial do contaminante e sem adição de aminoácidos no mosto.

ciclo	repetição			média	desvio padrão
	1	2	3		
1	77,0	66,5	105	82,8	19,9
2	99,0	101	119	106	15,1
3	111	122	-	117	7,78
4	103	80,5	85,0	89,7	12,2
5	47,5	38,5	42,5	42,8	4,50
6	21,5	-	22,0	21,7	
7	24,5	-	64,0	44,2	27,9
8	52,0	45,0	53,0	50,0	4,36
9	43,5	50,0	67,0	53,5	12,1

TABELA 19c - Número de células de leveduras no inóculo de cada ciclo, expressos em u.f.c. $\times 10^7/\text{ml}$, com inoculação inicial do contaminante e a adição de aminoácidos no mosto.

ciclo	repetição		média	desvio
	1	2		
1	89,5	79,5	84,5	7,07
2	80,0	94,0	87,0	9,90
3	66,0	77,5	71,7	8,13
4	54,0	56,0	55,0	1,41
5	-	26,5	26,5	-
6	21,5	26,5	24,0	3,53
7	12,2	12,3	12,2	0,070
8	34,0	16,3	25,1	5,01
9	29,0	18,5	23,7	7,42

TABELA 20a - Número de células de bactérias lácticas no inóculo de cada ciclo, expressos em u.f.c. $\times 10^7$ /ml., no teste do efeito da inoculação inicial do contaminante e adição de aminoácidos no mosto (controle)

ciclo	repetição			média	desvio padrão
	1	2	3		
1	23,0	29,5	32,0	28,2	4,64
2	13,5	14,5	17,0	15,0	1,80
3	21,5	19,5	25,0	22,0	2,78
4	24,0	-	-	24,0	-
5	27,5	-	31,0	29,2	2,48
7	59,0	55,0	-	57,0	2,83
9	-	180	192	186	8,13

TABELA 20b - Número de células de bactérias lácticas no inóculo de cada ciclo, expressos em u.f.c. $\times 10^7$ /ml., sem a inoculação inicial do contaminante e sem a adição de aminoácidos no mosto.

ciclo	repetição			média	desvio padrão
	1	2	3		
1	-	12,6	12,1	12,3	0,350
2	-	-	10,0	10,0	-
3	2,00	2,50	2,00	2,17	0,290
4	3,00	3,00	3,30	3,10	0,170
5	5,89	6,10	6,25	6,08	0,180
7	14,8	16,0	15,0	15,3	0,640
9	65,1	-	59,0	62,0	4,31

TABELA 20c - Número de células de bactérias lácticas no inóculo de cada ciclo, expressos em u.f.c. $\times 10^7$ /ml., com a inoculação inicial do contaminante e a adição de aminoácidos no mosto

ciclo	repetição		média	desvio padrão
	1	2		
1	22,0	48,0	35,0	18,4
2	29,0	29,0	29,0	0
3	48,0	49,0	48,5	0,710
4	50,0	-	50,0	-
5	162	229	195	14,0
7	580	550	565	21,2
9	550	573	562	16,3

TABELA 21a - Acidez do vinho delevurado, expressa g/l ácido láctico no teste do efeito da inoculação inicial do contaminante e adição de aminoácidos no mosto (controle).

ciclo	repetição			média	desvio padrão
	1	2	3		
1	3,94	3,94	3,91	3,93	0,0184
2	3,46	3,47	3,51	3,47	0,0255
3	3,21	3,00	3,14	3,12	0,106
4	3,39	3,16	3,64	3,40	0,245
5	3,87	3,86	4,08	3,94	0,122
6	4,73	3,94	4,42	4,38	0,400
7	5,74	5,92	5,56	5,74	0,173
8	6,18	6,02	5,71	5,97	0,237
9	6,91	7,05	6,42	6,83	0,371

TABELA 21b - Acidez do vinho delevurado, expressa g/l ácido láctico sem a inoculação inicial do contaminante e a adição de aminoácidos no mosto.

ciclo	repetição			média	desvio padrão
	1	2	3		
1	3,80	3,98	4,10	3,96	0,139
2	3,61	3,78	3,59	3,66	0,102
3	2,87	2,90	2,79	2,85	0,051
4	2,52	2,65	2,52	2,57	0,087
5	3,21	2,97	3,00	3,06	0,139
6	3,21	3,26	3,14	3,21	0,036
7	4,06	4,51	4,27	4,29	0,226
8	4,34	5,38	4,98	4,90	0,526
9	4,98	4,67	5,52	5,05	0,430

TABELA 21c - Acidez do vinho delevurado, expressa g/l ácido láctico com a inoculação inicial do contaminante e adição de aminoácidos no mosto.

ciclo	repetição		média	desvio padrão
	1	2		
1	4,01	3,98	3,99	0,024
2	4,06	4,10	4,08	0,024
3	4,48	4,17	4,32	0,220
4	4,69	5,62	5,16	0,660
5	7,64	9,38	8,51	1,23
6	12,3	13,0	12,6	0,528
7	15,2	14,9	15,1	0,196
8	14,5	15,8	15,1	0,920
9	13,7	15,1	14,4	1,02

TABELA 22a - pH do vinho deleiturado no teste do efeito da inoculação inicial do contaminante e adição de aminoácidos no mosto (controle)

ciclo	repetição			média	desvio padrão
	1	2	3		
1	4,07	4,10	4,08	4,08	0,010
2	4,28	4,28	4,28	4,28	0
3	4,28	4,28	4,28	4,28	0
4	4,38	4,40	4,35	4,38	0,020
5	4,15	4,20	4,17	4,17	0,020
6	4,08	4,23	4,09	4,13	0,080
7	3,93	3,91	3,94	3,93	0,010
8	3,78	3,86	3,87	3,84	0,050

TABELA 22b - pH do vinho deleiturado sem a inoculação inicial do contaminante e sem a adição de aminoácidos no mosto.

ciclo	repetição			média	desvio padrão
	1	2	3		
1	3,96	3,97	4,00	3,98	0,020
2	4,11	4,07	4,19	4,12	0,060
3	4,11	4,07	4,19	4,12	0,060
4	4,35	4,41	4,41	4,39	0,030
5	4,36	4,37	4,41	4,38	0,030
6	4,32	4,35	4,38	4,35	0,030
7	4,15	4,11	4,14	4,13	0,020
8	4,10	3,91	3,96	3,99	0,100

TABELA 22c - pH do vinho delevurado com a inoculação inicial do contaminante e a adição de aminoácidos no mosto

ciclo	repetição		média	desvio padrão
	1	2		
1	4,11	4,10	4,10	0,010
2	4,35	4,42	4,38	0,050
3	4,35	4,42	4,38	0,050
4	4,34	4,35	4,34	0,010
5	3,87	3,80	3,83	0,050
6	3,59	3,42	3,50	0,120
7	3,33	3,40	3,36	0,050
8	3,36	3,36	3,36	0

TABELA 23 - Aminoácidos totais no vinho delevurado, expressos em mg/l de leucina, no teste do efeito da inoculação inicial do contaminante e adição de aminoácidos no mosto (controle).

ciclo	repetição		média	desvio padrão
	1	2		
1	3,34	3,80	3,57	0,325
2	-	5,00	5,10	0,141
3	5,75	11,4	8,57	4,00
4	4,19	13,2	8,69	6,37
5	24,1	16,9	20,5	5,09
6	27,0	39,5	33,2	8,83
7	47,6	44,3	45,9	2,33
8	59,3	-	59,3	-
9	45,1	58,0	51,5	9,12

TABELA 29 - Viabilidade das células de leveduras (%) na avaliação do efeito do tempo de fermentação

ciclo	controle				12 horas			
	repetição		média	desvio padrão	repetição		média	desvio padrão
	1	2			1	2		
1	97,7	97,1	98,4	1,84	98,0	99,2	98,6	0,850
3	95,5	96,5	96,0	0,710	95,6	95,4	95,5	0,140
5	91,3	88,0	89,6	2,33	88,2	88,1	88,1	0,070
6	85,7	85,1	85,4	0,424	90,6	86,3	88,4	3,04
8	64,5	69,5	67,0	3,53	82,6	77,0	79,8	3,96
9	66,9	69,5	68,2	1,84	73,6	82,5	77,9	6,43

TABELA 30 - Porcentagem de brotos vivos das células de leveduras na avaliação do efeito do tempo de fermentação

ciclo	controle				12 horas			
	repetição		média	desvio padrão	repetição		média	desvio padrão
	1	2			1	2		
1	28,0	31,7	29,8	2,62	15,3	16,0	15,6	15,6
3	6,12	6,79	6,45	0,47	13,5	11,4	12,4	1,48
5	9,20	12,9	11,0	2,62	7,45	9,05	8,25	1,13
6	7,59	10,1	8,84	1,77	15,3	8,49	11,9	4,81
8	10,4	6,84	8,62	2,93	21,3	28,0	24,6	4,74
9	7,04	7,56	7,30	2,70	23,9	39,2	31,5	10,8

TABELA 31 - Porcentagem de brotos mortos das células de leveduras na avaliação do efeito do tempo de fermentação.

ciclo	controle				12 horas			
	repetição		média	desvio padrão	repetição		média	desvio padrão
	1	2			1	2		
1	0,300	0,950	0,630	0,690	0,320	0,156	0,238	0,116
3	0,300	0,180	0,240	0,080	0,470	0	0,235	0,330
4	1,53	4,29	1,91	1,65	3,14	0,410	1,77	1,93
6	1,52	1,53	1,53	0,0070	2,27	1,48	1,87	0,56
8	4,30	2,14	3,22	1,52	2,82	2,30	2,56	0,37
9	4,96	2,80	3,88	1,53	3,20	4,85	4,02	1,17

TABELA 32 - Acidez do vinho delevurado, expressa em g/l ácido láctico, na avaliação do efeito do tempo de fermentação

ciclo	controle					12 horas			
	repetição			média	desvio padrão	repetição		média	desvio padrão
	1	2	3			1	2		
1	3,94	3,94	3,91	3,93	0,0184	4,65	4,46	4,56	0,120
2	3,46	3,47	3,51	3,47	0,0255	3,93	3,97	3,95	0,018
3	3,21	3,00	3,14	3,12	0,106	3,79	3,82	3,80	0,018
4	3,39	3,16	3,64	3,40	0,245	3,56	3,56	3,56	0
5	3,87	3,86	4,08	3,94	0,122	3,29	3,34	3,31	0,036
6	4,73	3,94	4,42	4,38	0,400	3,60	3,42	3,51	0,120
7	5,74	5,92	5,56	5,74	0,173	3,56	3,38	3,47	0,129
8	6,18	6,02	5,71	5,97	0,237	3,91	3,91	3,91	0
9	6,91	7,05	6,42	6,83	0,371	3,56	3,56	3,56	0

TABELA 33 - pH do vinho delevurado no final de cada ciclo, na avaliação do efeito do tempo de fermentação.

ciclo	controle					12 horas			
	repetição			média	desvio padrão	repetição		média	desvio padrão
	1	2	3			1	2		
1	4,07	4,10	4,08	4,08	0,010	3,90	3,70	3,80	0,0283
2	4,28	4,28	4,28	4,28	0	3,55	3,65	3,60	0
3	4,28	4,28	4,28	4,28	0	3,30	3,33	3,31	0,0212
4	4,38	4,40	4,35	4,38	0,020	3,40	3,45	3,42	0,0353
5	4,15	4,20	4,17	4,17	0,020	3,39	3,39	3,39	0
7	3,93	3,91	3,94	3,93	0,010	3,50	3,52	3,51	0,0141
8	3,78	3,86	3,87	3,84	0,050	3,36	3,38	3,37	0,0141

TABELA 34 - Aminoácidos totais no vinho delevurado, na avaliação do efeito do tempo de fermentação.

ciclo	controle				12 horas			
	repetição		média	desvio padrão	repetição		média	desvio padrão
	1	2			1	2		
2	-	5,00	5,00	-	4,32	4,57	4,44	0,180
3	5,75	11,4	8,57	4,00	7,40	7,18	7,29	0,160
4	4,19	13,2	8,69	6,37	7,40	7,27	7,33	0,090
5	24,1	16,9	20,5	5,09	8,36	8,75	8,55	0,280
6	27,0	39,5	33,2	8,83	16,1	10,2	13,1	4,17
7	47,6	44,3	45,9	2,33	16,5	9,54	13,0	4,93
9	59,3	-	59,3	-	15,6	13,8	14,7	1,27

TABELA 35 - Viabilidade das células de leveduras com lavagem do fermento e adição de extrato de levedura no mosto

ciclo	Lavagem				Lavagem e extr leved.			
	repetição		média	desvio padrão	repetição		média	desvio padrão
	1	2			1	2		
1	98,6	98,3	98,4	0,210	99,0	98,0	98,5	0,710
3	95,9	93,1	94,5	1,98	93,2	93,3	93,2	0
5	89,0	93,1	91,0	2,90	86,1	87,1	86,6	0,710
6	84,9	93,2	89,0	5,87	85,7	80,5	83,1	3,68
8	84,0	86,4	85,2	1,70	74,1	66,5	70,3	5,37
10	81,2	83,9	82,5	1,91	65,0	57,6	61,3	5,23

TABELA 36 - Porcentagem de brotos vivos das células de leveduras nos tratamentos com lavagem do fermento e adição de extrato de levedura.

ciclo	Lavagem				Lavagem e extr leved			
	repetição		média	desvio padrão	repetição		média	desvio padrão
	1	2			1	2		
1	14,5	14,7	14,6	0,14	55,3	57,2	56,2	1,34
3	5,16	14,1	9,63	6,32	53,9	53,1	53,5	0,570
5	14,5	15,2	14,8	0,49	40,7	39,0	39,8	1,20
6	10,9	10,4	10,6	0,35	26,6	32,0	29,3	3,82
8	22,5	26,1	24,3	2,54	29,6	25,6	27,6	2,83
10	21,2	18,7	19,9	1,77	30,0	31,0	30,5	0,710

TABELA 37 - Porcentagem de brotos mortos das células de leveduras nos tratamentos com lavagem do fermento e adição de extrato de levedura.

ciclo	Lavagem				Lavagem e extr. leved.			
	repetição		média	desvio padrão	repetição		média	desvio padrão
	1	2			1	2		
1	0,260	0,350	0,305	0,064	0,600	0,950	0,775	0,247
3	1,03	0,300	0,660	0,520	0,970	1,40	1,18	0,304
5	1,26	1,44	1,35	0,130	6,48	5,88	6,18	0,420
6	1,41	1,80	1,60	0,280	4,54	4,33	4,43	0,150
8	1,88	1,51	1,69	0,260	6,60	8,90	7,75	1,63
10	2,79	0,300	1,54	1,76	15,0	14,4	14,7	0,420

TABELA 38 - Acidez do vinho delevurado, expressa g/l ácido láctico, no tratamento com lavagem do fermento e adição de extrato de levedura no mosto

ciclo	Lavagem				Lavagem e extr. leved			
	repetição		média	desvio padrão	repetição		média	desvio padrão
	1	2			1	2		
1	4,46	4,52	4,48	0,037	4,28	4,46	4,37	0,130
2	3,80	3,90	3,84	0,055	3,47	3,29	3,38	0,130
3	3,66	3,75	3,69	0,055	3,20	3,09	3,14	0,070
4	3,56	3,75	3,66	0,130	3,25	3,01	3,12	0,160
5	3,56	3,71	3,64	0,090	3,56	3,56	3,56	0
6	3,33	3,42	3,36	0,055	3,23	3,33	3,27	0,055
7	3,38	3,38	3,38	0	3,19	3,29	3,23	0,055
8	3,49	3,47	3,47	0,018	4,28	4,98	4,63	0,500
9	3,38	3,47	3,42	0,055	4,74	5,62	5,18	0,620
10	3,62	3,64	3,62	0,018	6,06	6,76	6,41	0,500

TABELA 39 - pH do vinho delevurado no final de cada ciclo, no
na tratamento com lavagem e a adição de extrato de levedura
no mosto

ciclo	Lavagem				Lavagem e extr. leved			
	repetição		média	desvio padrão	repetição		média	desvio padrão
	1	2			1	2		
1	3,19	3,19	3,19	0	3,40	3,49	3,44	0,0636
2	3,25	3,25	3,25	0	3,67	3,67	3,67	0
3	3,33	3,33	3,33	0	3,66	3,71	3,68	0,0353
4	3,36	3,40	3,38	0,0283	3,83	3,83	3,83	0
5	3,41	3,41	3,41	0	3,82	3,82	3,82	0
7	3,54	3,56	3,55	0,0141	3,90	3,90	3,90	0
8	3,39	3,53	3,46	0,100	3,90	3,79	3,84	0,0778
9	3,45	3,45	3,45	0	3,59	3,59	3,59	0
10	3,01	2,94	2,97	0,0495	2,98	2,87	2,92	0,0778

TABELA 40 - Viabilidade e brotamento das células de leveduras (%) na avaliação do efeito da velocidade de centrifugação do fermento na microbiota fermentativa

ciclo	tratam. c/ 5000 X g			tratam. c/ 870 X g		
	viabilidade	brotos		viabilidade	brotos	
		vivos	mortos		vivos	mortos
1	95,0	6,22	0,37	96,2	7,01	0,42
2	87,2	7,12	1,80	84,3	7,55	0,65
3	72,0	11,2	0,980	70,0	13,0	2,30
4	49,7	15,1	9,93	50,3	11,3	4,35
6	41,0	15,0	9,972	40,5	7,83	9,13
7	42,0	8,42	13,8	39,3	7,20	10,5
8	49,8	7,78	10,2	33,0	6,04	12,2

legenda: g = força gravitacional.

TABELA 41 - Acidez do vinho centrifugado, expressa g/l ácido láctico, na avaliação do efeito da velocidade de centrifugação do fermento na microbiota fermentativa.

ciclo	tratam. c/5000 X g				tratam. c/870 X g			
	média	dp	média	dp	média	dp	média	dp
1	5,60	5,46	5,53	0,0990	5,40	5,33	5,36	0,049
2	5,35	5,35	5,35	0	5,10	5,25	5,17	0,106
3	5,25	5,40	5,32	0,106	5,30	5,60	5,45	0,212
4	5,38	5,44	5,41	0,0424	5,40	5,80	5,60	0,283
5	5,30	5,31	5,30	0,00707	5,55	6,15	5,85	0,424
6	5,33	5,61	5,47	0,198	5,80	6,50	6,15	0,495
8	5,35	5,95	5,65	0,424	5,93	7,23	6,58	0,919

legenda: dp = desvio padrão.

g = força gravitacional.

TABELA 42 - pH do vinho delevurado no final de cada ciclo, na avaliação do efeito da velocidade de centrifugação do fermento na microbiota fermentativa.

ciclo	trat.c/5000 X g				tratam.c/870 X g			
	média	dp			média	dp		
1	3,55	3,53	3,54	0,0141	3,57	3,55	3,56	0,0141
2	3,53	3,53	3,53	0	3,55	3,50	3,52	0,0353
3	3,53	3,52	3,52	0,00707	3,53	3,52	3,52	0,00707
4	3,56	3,51	3,53	0,0353	3,50	3,52	3,51	0,0141
5	3,54	3,48	3,51	0,0424	3,49	3,47	3,48	0,0141
6	3,53	3,51	3,52	0,0141	3,40	3,45	3,43	0,0353
8	3,50	3,50	3,50	0	3,37	3,40	3,39	0,0212

legenda: dp = desvio padrão.

g = força gravitacional

TABELA 47 - Viabilidade das células de leveduras (%) na avaliação do uso de 1800 mg/l do biocida Desfloc na fermentação

ciclo	controle	trat.c/extr.leved.		média	desvio padrão
1	96,4	93,2	95,0	94,1	1,27
2	88,8	71,0	73,5	72,2	1,77
3	70,3	36,2	28,0	32,1	5,80
4	57,6	33,1	25,8	29,4	5,16
5	49,8	26,2	16,3	21,2	7,00
7	47,7	30,1	18,8	24,4	8,00
8	43,8	20,4	17,7	19,0	1,91

TABELA 47 -Viabilidade das células de leveduras (%) na avaliação do uso de 1800 mg/l do biocida Desfloc na fermentação - continuação.

ciclo	trat.c/desfloc		média	dp*	trat.c/defloc e extr.leved.		média	dp
1	96,6	96,0	96,3	0,420	96,6	97,1	96,8	0,350
2	95,9	95,0	95,4	0,636	87,2	85,2	86,2	1,41
3	89,9	91,0	90,4	0,778	41,1	44,8	42,9	2,62
4	89,1	88,0	88,5	0,780	45,4	43,0	44,2	1,70
5	89,8	86,4	88,1	2,40	49,2	39,9	43,0	8,70
7	84,7	87,5	86,1	1,98	53,1	45,2	47,6	7,78
8	89,1	89,9	89,5	0,570	59,7	47,2	53,4	8,84

legenda: * dp = desvio padrão.

TABELA 4B - Porcentagem de brotos vivos das células de leveduras na avaliação do uso de 1800 mg/l do biocida Desfloc na fermentação.

ciclo	controle	trat.c/extr.leved.	média	desvio padrão
1	9,24	6,80	22,5	14,6
2	12,2	8,30	18,9	13,6
3	11,9	7,72	8,40	8,06
4	19,1	7,02	8,16	7,59
5	9,15	4,58	7,30	5,94
7	14,0	5,60	7,04	6,32
8	8,23	6,06	3,20	4,63

TABELA 4B - Porcentagem de brotos vivos das células de leveduras na avaliação do uso de 1800 mg/l do biocida Desfloc na fermentação - continuação.

ciclo	trat.c/desfloc		média	dp*	trat.c/defloc e extr.leved		média	dp
1	16,6	16,6	16,6	0	10,8	11,2	11,0	0,282
2	15,7	14,8	15,2	0,636	35,9	38,3	37,0	1,70
3	10,7	13,6	12,1	2,05	13,6	13,1	13,3	0,350
4	19,2	13,7	16,4	3,89	10,4	12,4	11,4	1,41
5	15,7	12,1	13,9	2,54	17,6	8,20	12,9	6,65
7	18,9	17,4	18,1	1,06	15,5	12,2	13,8	2,33
8	13,9	12,1	13,0	1,27	13,3	20,9	17,4	4,95

legenda: * dp = desvio padrão.

TABELA 49 - Porcentagem de brotos mortos das células de leveduras na avaliação do uso de 1800 mg/l do biocida Desfloc na fermentação.

ciclo	controle	trat.c/extr.leved.		média	desvio padrão
1	0,750	1,83	2,30	2,06	0,332
2	2,72	7,65	9,23	8,44	1,12
3	5,60	16,5	23,2	20,0	4,74
4	3,27	10,5	24,4	17,4	9,83
5	6,78	12,9	28,1	20,5	10,7
7	7,72	16,5	15,0	15,7	1,10
8	6,42	17,4	17,7	17,5	0,210

TABELA 49 - Porcentagem de brotos mortos das células de leveduras na avaliação do uso de 1800 mg/l do biocida Desfloc na fermentação - continuação.

ciclo	trat.c/desfloc		média	dp*	trat.c/desfloc e extr.leved.		média	dp
1	0,290	0,230	0,260	0,0424	0,410	0,320	0,365	0,0640
2	0,310	0,350	0,330	0,0283	6,55	13,5	10,0	4,91
3	1,78	2,03	1,90	0,177	28,0	18,6	23,3	6,64
4	1,30	2,62	1,96	0,930	11,8	15,3	13,5	2,47
5	1,96	2,44	2,20	0,340	16,6	13,1	14,8	2,47
7	3,20	1,97	2,58	0,870	8,79	13,3	11,0	3,19
8	2,08	1,48	1,78	0,420	11,4	14,3	12,8	2,05

legenda: * dp = desvio padrão

TABELA 50 - Número de células de leveduras no inóculo de cada ciclo, expressos em u.f.c. $\times 10^7$ /ml, na avaliação do uso de 1800 ppm do biocida Desfloc na fermentação.

ciclo	controle		média	dp*	trat. c/extr. leved
1	150	150	150	0	150
3	68,5	73,3	70,9	3,39	42,0
5	57,0	60,5	58,7	2,47	5,70
7	30,5	74,5	52,4	31,1	6,40
8	26,0	20,0	23,0	4,24	7,30

legenda: * dp = desvio padrão.

TABELA 50 - Número de células de leveduras no inóculo de cada ciclo, expressos em u.f.c. $\times 10^7$ /ml, na avaliação do uso de 1800 mg/l do biocida Desfloc na fermentação - continuação.

ciclo	trat. c/desfloc	trat. c/desfloc e ext. leved.
1	150	150
3	80,0	79,5
5	58,5	20,4
7	63,0	11,5
8	50,0	3,50

TABELA 51 - Número de células de bactérias lácticas no inóculo de cada ciclo, expressos em u.f.c. $\times 10^7$ /ml, na avaliação do uso de 1800 mg/l do biocida Desfloc na fermentação

ciclo	controle		média	dp*	trat. c/extr. leved
1	130	130	130	0	130
3	128	112	120	11,3	157
5	122	96,0	109	18,4	165
7	74,5	69,7	72,1	3,39	212
8	57,0	53,0	55,0	2,83	205

legenda: * dp = desvio padrão.

TABELA 51 - Número de células de bactérias lácticas no inóculo de cada ciclo, expressos em u.f.c. $\times 10^7$ /ml, na avaliação do uso de 1800 mg/l do biocida Desfloc na fermentação - cont.

ciclo	trat. c/desfloc	trat. c/desfloc e extr. leved
1	130	130
3	37,0	141
5	8,00	78,0
7	4,00	63,0
8	3,80	67,5

TABELA 52 - Acidez do vinho delevurado, expressa g/l ácido láctico, na avaliação do uso de 1800 mg/l do biocida Desfloc na fermentação - continuação.

ciclo	controle		média	dp*	trat c/extr. leved.		média	dp
1	5,46	5,71	5,59	0,180	5,62	5,62	5,62	0
2	6,32	6,06	6,19	0,180	5,62	6,13	5,92	0,420
3	5,84	5,84	5,84	0	7,66	9,31	8,49	1,18
4	5,43	5,88	5,66	0,310	10,7	11,9	11,3	0,860
5	5,97	6,10	6,03	0,090	12,4	14,0	13,2	1,12
6	6,41	6,43	6,41	0,0180	14,2	14,5	14,4	0,180
7	6,69	7,11	6,89	0,290	-	15,1	15,1	-
8	6,51	7,90	7,20	0,970	17,9	15,8	16,8	1,49

legenda: * dp = desvio padrão.

TABELA 52 - Acidez do vinho delevurado, expressa g/l ácido láctico, na avaliação do uso de 1800 mg/l do biocida Desfloc na fermentação - continuação.

ciclo	trat. c/Desfloc		média	dp	trat. c/Desfloc e extr. leved.		média	dp
1	4,91	4,91	4,91	0	4,91	5,18	5,03	0,200
2	4,26	4,39	4,32	0,090	5,62	6,32	5,97	0,500
3	3,55	3,53	3,53	0,018	6,06	7,38	6,73	0,940
4	3,09	3,09	3,09	0	7,39	9,13	8,25	1,23
5	3,33	3,05	3,18	0,200	8,36	8,65	8,50	0,200
6	3,33	3,20	3,25	0,090	8,09	8,88	8,47	0,550
7	2,72	2,73	2,72	0,018	8,26	9,24	8,74	0,680
8	2,90	2,63	2,76	2,26	9,22	9,22	9,22	0

TABELA 53 - pH do vinho delevurado no final de cada ciclo, na avaliação do uso de 1800 mg/l do biocida Desfloc na fermentação

ciclo	controle		média	dp*	trat.c/extr leved.		média	dp
1	3,59	3,53	3,56	0,040	3,86	3,86	3,86	0
2	3,64	3,64	3,64	0	4,06	4,01	4,03	0,030
3	3,68	3,69	3,68	0,0071	3,93	3,78	3,85	0,110
4	3,37	3,58	3,47	0,150	3,62	3,49	3,55	0,090
5	3,63	3,54	3,58	0,060	3,55	3,43	3,49	0,080
6	3,55	3,54	3,54	0,010	3,42	3,41	3,41	0,010
7	3,64	3,64	3,64	0	3,43	3,43	3,43	0
8	3,60	3,58	3,59	0,010	3,58	3,44	3,51	0,100

legenda: * dp = desvio padrão.

TABELA 53 - pH do vinho delevurado no final de cada ciclo, na avaliação do uso de 1800 mg/l do biocida Desfloc na fermentação - continuação.

ciclo	trat.c/desfloc		média	dp	trat.c/desfloc e extr.leved.		média	dp
1	3,67	3,67	3,67	0	3,84	3,85	3,84	0,010
2	3,73	3,76	3,74	0,020	3,99	3,99	3,99	0
3	3,83	3,86	3,84	0,020	3,97	3,87	3,92	0,070
4	3,90	3,93	3,91	0,020	3,77	3,69	3,73	0,060
5	3,90	3,89	3,89	0,010	3,69	3,71	3,70	0,010
6	3,95	3,90	3,92	0,030	3,65	3,60	3,62	0,030
7	4,27	4,28	4,27	0,010	3,83	3,67	3,75	0,110
8	4,22	4,22	4,22	0	3,69	3,67	3,68	0,010

TABELA 54 - Açúcares totais no vinho delevurado (ART - g/l) ao final de 10 horas de fermentação, na avaliação do uso de 1800 mg/l do biocida Desfloc na fermentação

ciclo	controle		média dp*		trat.c/extr.leved		média dp	
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	4,04	3,79	3,91	0,180	4,08	3,85	3,96	0,160
4	3,60	3,34	3,47	0,180	4,62	6,95	5,78	1,65
5	3,98	3,18	3,58	0,570	6,69	8,29	7,49	1,13
6	3,73	3,73	3,73	0	6,37	5,96	6,16	0,290
7	7,08	7,49	7,28	0,290	9,18	8,61	8,89	0,400
8	7,12	7,54	7,33	0,297	9,20	8,80	9,00	0,283

legenda: * dp = desvio padrão.

TABELA 54 - Açúcares totais no vinho delevurado (ART - g/l) ao final de 10 horas de fermentação, na avaliação do uso de 1800 mg/l do biocida Desfloc na fermentação - continuação

ciclo	trat.c/desfloc		média dp		trat.c/desfloc e extr.leved		média dp	
2	3,82	4,46	4,14	0,450	3,85	4,14	3,99	0,200
4	3,12	3,44	3,28	0,230	3,66	4,94	4,30	0,900
5	3,73	3,02	3,37	0,500	4,49	4,36	4,42	0,090
6	2,96	2,61	2,78	0,250	6,18	6,92	6,55	0,520
7	2,64	2,55	2,59	0,060	2,55	3,76	3,15	0,850
8	2,39	2,39	2,39	0	2,32	2,64	2,48	0,230

TABELA 55 - Açúcares totais no mosto (ART - g/l) ao final de 10 horas de fermentação, na avaliação do uso de 1800 mg/l do biocida Desfloc na fermentação - continuação

ciclo	mosto	
	s/ext. leved.	c/ext. leved
1	182	183
2	189	197
4	190	194
5	188	172
6	180	190
7	183	186
8	183	186

TABELA 56 - Concentração de etanol no vinho delevurado após 10 horas de fermentação, expresso g/l, na avaliação do uso de 1800 mg/l do biocida Desfloc na fermentação.

ciclo	controle				trat. c/extr. leved.			
	média		dp*		média		dp	
2	54,4	51,7	53,1	1,86	51,6	54,8	53,2	2,26
4	51,6	53,6	52,6	1,45	43,4	42,9	43,1	0,350
5	54,3	54,5	54,4	0,141	45,5	44,9	45,2	0,440
6	52,3	56,0	54,1	2,63	36,0	38,2	37,1	1,56
7	51,9	51,1	51,5	0,620	42,4	43,8	43,1	0,980
8	50,1	50,5	50,3	0,283	42,2	37,3	39,7	3,44

legenda: * dp = desvio padrão.

TABELA 56 - Concentração de etanol no vinho delevurado após 10 horas de fermentação, expresso g/l, na avaliação do uso de 1800 mg/l do biocida Desfloc na fermentação - continuação.

ciclo	trat. c/desfloc				trat. c/desfloc e extr. leved.			
	média		dp		média		dp	
2	54,7	52,4	53,5	1,59	42,5	42,2	42,3	0,212
4	49,9	56,3	53,1	4,52	51,0	48,2	49,6	1,98
5	49,2	54,7	51,9	3,90	46,3	47,5	46,9	0,880
6	54,1	54,6	54,3	0,353	47,4	46,2	46,8	0,891
7	55,0	53,8	54,4	0,870	54,0	45,8	49,9	5,78
8	55,4	52,7	54,0	1,94	44,9	50,0	47,5	3,63

TABELA 57 - Eficiência da fermentação alcoólica na avaliação do uso de 1800 mg/l do biocida Desfloc na fermentação

ciclo	tratamento							
	controle		média	dp*	ext. leved.		média	dp
2	74,7	71,0	72,8	2,62	67,9	72,2	70,0	3,04
4	70,5	73,2	71,8	1,91	58,0	57,4	57,7	0,424
5	75,0	75,2	75,1	0,141	68,6	67,7	68,1	0,636
6	75,4	80,7	78,0	3,75	49,2	52,1	50,6	2,05
7	73,6	71,0	72,3	1,84	59,2	61,2	60,2	1,41
8	71,0	71,0	71,0	0	58,8	52,0	55,4	4,80

legenda: * dp = desvio padrão.

TABELA 57 - Eficiência da fermentação alcoólica na avaliação do uso de 1800 mg/l do biocida Desfloc na fermentação - continuação.

ciclo	tratamento							
	desfloc				desfloc e extr. levedura			
	média	dp	média	dp	média	dp	média	dp
2	75,1	71,9	73,5	2,26	56,0	55,6	55,8	0,283
4	68,1	77,0	72,5	6,29	68,2	64,5	66,3	2,61
5	67,9	75,5	71,7	5,37	69,9	71,6	70,7	1,20
6	78,0	78,7	78,3	0,495	64,8	63,1	63,9	1,20
7	78,0	76,3	77,1	1,20	75,3	63,8	69,5	8,13
8	78,5	74,8	76,6	2,62	63,6	70,9	67,2	5,16

legenda: * dp = desvio padrão.

TABELA 58 - Viabilidade das células de leveduras (%) no teste de determinação da atividade do Desfloc na fermentação alcoólica em diversas concentrações.

ciclo	controle	Desfloc - mg/l			
		1800	300	200	75
2	85,6	89,4	86,6	87,8	85,4
4	80,3	85,2	87,3	85,2	83,3
6	77,5	82,6	87,6	84,3	81,5
8	66,1	71,3	79,7	79,4	71,3
10	61,4	67,2	74,4	73,6	68,3

TABELA 59 - Porcentagem de brotos vivos e mortos das células de leveduras no teste de determinação da atividade do Desfloc na fermentação alcoólica em diversas concentrações

ciclo	Desfloc					
	controle		1800 mg/l		300 mg/l	
	BV	BM	BV	BM	BV	BM
2	13,2	1,74	13,6	2,55	24,4	1,22
4	12,2	2,55	6,70	1,87	16,5	1,86
6	11,9	3,98	4,19	1,63	10,0	2,50
8	9,80	4,20	5,30	1,95	10,2	2,73
10	9,57	4,63	7,17	2,63	8,00	3,65

legenda: BV e BM brotos vivos e mortos, respectivamente.

TABELA 59 - Porcentagem de brotos vivos e mortos das células de leveduras no teste de determinação da atividade do Desfloc na fermentação alcoólica em diversas concentrações - continuação.

ciclo	Desfloc			
	200 mg/l		75 mg/l	
	BV	BM	BV	BM
2	21,0	0,870	23,0	1,05
4	18,5	1,35	22,3	1,73
6	8,68	2,33	19,1	2,85
8	8,64	3,40	17,3	3,75
10	8,61	5,68	15,4	4,96

TABELA 60 - Acidez do vinho delevurado, expressa g/l ácido láctico, no teste de determinação da atividade do Desfloc na fermentação alcoólica em diversas concentrações

ciclo	controle		média	dp*	Desfloc 1800 mg/l		média	dp
1	8,18	7,63	8,14	0,200	7,02	7,11	7,05	0,0055
2	5,79	6,12	5,94	0,240	4,28	4,23	4,24	0,0400
3	5,59	4,78	5,18	0,570	4,32	4,50	4,41	0,130
4	5,77	6,67	6,21	0,640	4,41	4,65	4,52	0,160
5	5,77	5,03	5,40	0,510	4,13	4,37	4,24	0,160
6	5,77	4,91	5,33	0,110	4,12	4,17	4,13	0,0400
7	4,76	4,94	4,85	0,130	4,58	4,50	4,54	0,0550
8	5,83	4,78	5,29	0,730	4,50	5,00	4,74	0,350
9	5,31	5,31	5,31	0	4,28	4,28	4,28	0
10	6,35	6,23	6,29	0,0848	4,19	4,87	4,52	0,480
11	6,75	6,50	6,62	0,177	4,04	4,26	4,15	0,150

legenda: * dp = desvio padrão.

TABELA 60 - Acidez do vinho delevurado, expressa g/l ácido láctico, no teste de determinação da atividade do Desfloc na fermentação alcoólica em diversas concentrações - continuação.

ciclo	Desfloc							
	300mg/l				200mg/l			
			média	dp			média	dp
1	7,29	7,29	7,29	0	7,57	7,57	7,57	0
2	5,31	5,13	5,22	0,130	5,49	5,59	5,53	0,0550
3	4,69	4,74	4,70	0,0360	4,50	4,37	4,30	0,280
4	4,32	4,37	4,34	0,0360	4,32	4,10	4,21	0,150
5	4,04	3,93	3,99	0,0730	4,08	3,73	3,90	0,240
6	3,78	3,84	3,80	0,0380	4,28	3,80	4,04	0,330
7	4,00	4,00	4,00	0	4,00	4,41	4,21	0,276
8	4,04	4,01	4,02	0,0184	4,72	4,65	4,69	0,0550
9	4,08	4,23	4,15	0,110	4,50	4,04	4,26	0,330
10	4,91	4,94	4,92	0,0184	4,85	4,94	4,89	0,0550
11	5,00	5,07	5,03	0,0550	5,13	5,26	5,18	0,0920

TABELA 60 - Acidez do vinho delevurado, expressa g/l ácido láctico, no teste de determinação da atividade do Desfloc na fermentação alcoólica em diversas concentrações - continuação.

ciclo	Desfloc 75 mg/l		média	dp
1	7,57	7,57	7,57	0
2	5,40	5,68	5,33	0,202
3	5,84	5,84	5,84	0
4	5,40	5,46	5,42	0,0367
5	5,15	5,13	5,13	0,0184
6	4,94	4,91	4,92	0,0184
7	4,72	4,94	4,83	0,147
8	4,89	5,15	5,02	0,184
9	4,81	4,69	4,74	0,0919
10	5,38	5,03	5,20	0,239
11	5,62	5,37	5,49	0,184

TABELA 61 - pH do vinho delevurado no final de cada ciclo,
no teste de determinação da atividade do Desfloc na
fermentação alcoólica em diversas concentrações.

ciclo	controle		média	dp*	Desfloc 1800 mg/l		média	dp
1	3,60	3,56	3,58	0,0300	3,60	3,61	3,60	0,010
2	3,73	3,77	3,75	0,0300	3,92	3,96	3,94	0,030
3	3,67	3,82	3,74	0,110	3,74	3,83	3,78	0,060
4	3,66	3,76	3,71	0,0700	3,60	3,63	3,61	0,020
5	3,71	3,83	3,77	0,0800	3,70	3,67	3,68	0,020
6	3,70	3,87	3,78	0,120	3,83	3,81	3,82	0,010
7	3,72	3,77	3,74	0,0300	3,67	3,79	3,93	0,080
8	3,89	3,88	3,88	0,0100	3,89	3,88	3,88	0,010
9	3,94	3,95	3,94	0,0100	3,83	3,83	3,83	0
10	3,87	3,90	3,88	0,0200	3,83	3,86	3,84	0,020
11	3,79	3,82	3,80	0,0200	3,81	3,80	3,80	0,010

legenda: * dp = desvio padrão.

TABELA 61 - pH do vinho delevurado no final de cada ciclo, no teste de determinação da atividade do Desfloc na fermentação alcoólica em diversas concentrações - continuação

ciclo	Desfloc							
	300mg/l				200mg/l			
			média	dp			média	dp
1	3,62	3,62	3,62	0	3,60	3,60	3,60	0
2	3,73	3,88	3,80	0,110	3,78	3,81	3,79	0,0200
3	3,86	3,87	3,86	0,0100	3,84	3,87	3,85	0,0200
4	3,75	3,75	3,75	0	3,84	3,82	3,83	0,0100
5	3,82	3,85	3,83	0,0200	3,85	3,88	3,86	0,0200
6	4,00	4,00	4,00	0	4,00	4,00	4,00	0
7	3,92	3,96	3,94	0,0300	3,90	4,02	3,96	0,0800
8	3,84	3,90	3,87	0,0400	3,84	3,86	3,85	0,0100
9	4,00	4,00	4,00	0	3,93	3,95	3,94	0,0100
10	3,92	3,91	3,91	0,0100	3,90	3,92	3,91	0,0100
11	3,82	3,80	3,81	0,0100	3,84	3,82	3,83	0,0100

TABELA 61 - pH do vinho delevurado no final de cada ciclo, no teste de determinação da atividade do Desfloc na fermentação alcoólica em diversas concentrações - continuação

ciclo	Desfloc 75 mg/l		média	dp
1	3,61	3,62	3,61	0,0100
2	3,84	3,73	3,78	0,0800
3	3,78	3,79	3,78	0,0100
4	3,78	3,77	3,77	0,0100
5	3,77	3,77	3,77	0
6	3,90	3,94	3,92	0,0300
7	3,95	3,92	3,93	0,0200
8	3,87	3,88	3,87	0,0100
9	4,00	4,00	0	0
10	3,90	3,90	3,90	0
11	3,83	3,78	3,80	0,0300

TABELA 62 - Viabilidade das células de leveduras (%) no teste do Desfloc imobilizado com potencializador e a adição de diversas concentrações de extrato de levedura.

ciclo	tratam. c/ extr. levedura								
	controle	200 mg/l		média	dp*	600 mg/l		média	dp
1	96,4	97,0	96,5	96,7	0,350	96,0	98,0	97,0	1,41
2	85,4	83,2	-	83,2	-	65,2	-	65,2	-
4	49,7	54,3	-	54,3	-	16,0	-	16,0	-
7	45,2	43,8	-	43,8	-	42,8	-	42,8	-
8	49,7	39,2	-	39,2	-	39,2	43,1	41,1	2,76
9	47,2	42,2	-	42,2	-	-	43,0	-	-
11	50,3	43,7	45,0	44,3	0,920	46,8	-	46,8	46,8
14	48,0	58,4	-	58,4	-	50,5	-	50,5	-
19	45,2	54,0	55,0	54,5	0,707	47,0	47,3	47,1	0,212
25	45,0	50,8	52,1	51,4	0,920	43,5	45,8	44,6	1,63
27	43,0	47,7	47,3	47,5	0,280	45,3	44,4	44,8	0,636
30	33,0	42,3	38,8	40,5	2,47	28,3	27,5	27,9	0,566

legenda: * dp = desvio padrão.

TABELA 62 - Viabilidade das células de leveduras (%) no teste do Desfloc imobilizado, com potencializador e a adição de diversas concentrações de extrato de levedura - continuação

ciclo	tratam. c/ extr. levedura							
	1800mg/l				5000mg/l			
			média	dp			média	dp
1	98,3	97,0	97,6	0,920	98,1	97,5	97,7	0,350
2	51,0	-	51,0	-	40,6	-	40,6	-
4	< 5	-	< 5	-	< 5	-	< 5	-
7	25,6	-	25,6	-	26,4	-	26,4	-
11	37,0	-	37,0	-	-	-	-	-
14	38,9	-	38,9	-	36,2	-	36,2	-
19	43,5	-	43,5	-	46,2	-	46,2	-
25	47,4	54,6	51,0	5,09	53,4	46,1	49,7	5,16
27	45,4	50,6	48,0	3,68	31,6	38,7	35,1	5,02
30	38,8	40,5	39,6	1,20	13,6	20,6	17,1	4,95

TABELA 63 - Porcentagem de brotos vivos das células de leveduras no teste do Desfloc imobilizado, com potencializador e a adição de diversas concentrações de extrato de levedura

ciclo	tratam.c/ extr.levedura							
	controle	200mg/l	média	dp*		600 mg/l	média	dp
1	27,5	16,0	15,1	15,5	0,640	17,0	16,0	16,5 0,710
2	14,0	19,3	-	19,3	-	13,0	-	13,0 -
4	15,1	28,7	-	28,7	-	0,920	-	0,920 -
7	13,8	9,74	-	9,74	-	9,50	-	9,50 -
8	9,45	2,99	-	2,99	-	14,0	15,0	14,5 0,710
9	7,78	8,40	-	8,40	-	-	-	- -
11	6,41	6,88	7,20	7,04	0,230	6,70	-	6,70 -
14	7,30	7,68	-	7,68	-	9,50	-	9,50 -
19	8,57	13,5	-	13,5	-	9,97	-	9,97 -
25	8,20	16,7	12,0	14,3	3,32	14,1	12,1	13,1 1,41
27	8,05	13,6	8,52	11,1	3,59	12,1	9,24	11,0 1,48
30	7,83	19,1	14,3	16,7	3,39	12,7	10,0	11,3 1,91

legenda: * dp = desvio padrão.

TABELA 63 - Porcentagem de brotos vivos das células de leveduras no teste do Desfloc imobilizado, com potencializador e adição de diversas concentrações de extrato de levedura - continuação.

ciclo	tratam. c/ extr. levedura							
	1800mg/l				5000mg/l			
			média	dp			média	dp
1	20,0	22,5	21,2	1,77	28,0	30,5	29,2	1,77
2	18,0	-	18,0	-	25,7	-	25,7	-
4	0	0	0	0	0	0	0	0,
7	4,18	-	4,18	-	4,00	-	4,00	-
8	7,08	-	7,08	-	-	-	-	-
11	7,70	-	7,70	-	-	-	-	-
14	14,7	-	14,7	-	13,7	-	13,7	-
19	15,6	-	15,6	-	25,2	-	25,2	-
25	15,2	17,7	16,4	1,77	23,3	17,0	20,1	4,45
27	9,79	13,8	11,8	2,83	16,0	14,1	15,0	1,34
30	15,5	18,5	17,0	2,12	3,20	6,87	5,03	2,59

TABELA 64 - Porcentagem de brotos mortos das células de leveduras no teste do Desfloc imobilizado, com potencializador e adição de diversas concentrações de extrato de levedura

ciclo	Desfloc								
	controle	200mg/l		média	dp*	600 mg/l		média	dp
1	2,47	1,10	1,32	1,21	0,160	1,35	1,71	1,53	0,250
2	16,3	12,3	-	12,3	-	15,4	-	15,4	-
4	9,93	14,3	-	14,3	-	33,0	-	33,0	-
7	13,8	19,0	-	19,0	-	15,3	-	15,3	-
8	12,9	17,7	-	17,7	-	14,6	16,3	15,4	1,20
9	10,2	17,9	-	17,9	-	-	-	-	-
11	12,5	21,8	6,83	14,3	10,6	16,0	-	15,4	-
14	11,4	11,7	-	11,7	-	13,9	-	13,9	-
19	14,2	16,8	-	16,8	-	13,4	-	13,4	-
25	10,5	12,4	13,8	13,1	0,990	9,70	10,3	10,0	0,420
27	8,75	9,95	11,4	10,7	1,02	13,6	18,8	16,2	3,68
30	9,13	15,3	14,1	14,7	0,848	17,5	19,0	18,2	1,06

legenda: * dp = desvio padrão.

TABELA 64 - Porcentagem de brotos mortos das células de leveduras no teste do Desfloc imobilizado, com potencializador e com adição de diversas concentrações de extrato de levedura - continuação.

ciclo	Desfloc							
	1800mg/l				5000mg/l			
			média	dp			média	dp
1	1,80	1,73	1,76	0,050	2,15	2,40	2,27	0,177
2	18,6	-	18,6	-	23,2	-	23,2	-
4	35,0	-	35,0	-	37,2	-	37,2	-
7	15,3	-	15,3	-	18,7	-	18,7	-
8	13,7	-	13,7	-	-	-	-	-
11	15,4	-	15,4	-	16,0	-	16,0	-
14	16,4	-	16,4	-	15,6	-	15,6	-
19	15,1	-	15,1	-	15,0	-	15,0	-
25	7,58	9,60	8,59	1,43	10,3	9,35	9,82	0,671
27	13,3	17,5	15,4	2,67	15,6	11,1	13,3	3,18
30	16,5	11,6	14,0	3,46	28,0	15,3	21,6	9,00

TABELA 65 - Acidez (expressa g/l ácido láctico) e pH do vinho de-
levurado do tratamento controle, no teste do Desfloc
imobilizado, com potencializador e adição de diversas
concentrações de extrato de levedura.

ciclo	controle							
	acidez		média	dp*	pH		média	dp
2	6,16	6,56	6,36	0,283	3,55	3,59	3,57	0,0283
3	5,88	6,06	5,97	0,127	3,69	3,70	3,69	0,00707
4	6,30	6,39	6,34	0,0636	3,60	3,64	3,62	0,0283
5	6,38	6,43	6,40	0,0353	3,52	3,60	3,56	0,0566
6	5,51	6,06	5,78	0,389	3,52	3,51	3,51	0,00707
7	5,99	5,79	5,89	0,141	3,66	3,61	3,63	0,0353
8	6,10	6,06	6,08	0,0283	3,56	3,56	3,56	0
9	5,32	5,80	5,56	0,339	3,50	3,57	3,53	0,0495
10	6,34	6,16	6,25	0,127	3,56	3,62	3,59	0,0424
11	6,43	6,30	6,36	0,0919	3,51	3,52	3,51	0,00707
12	5,42	5,70	5,56	0,198	3,49	3,55	3,52	0,0424
13	5,33	5,70	5,51	0,262	3,59	3,61	3,60	0,0141
14	5,25	5,60	5,42	0,247	3,89	3,85	3,87	0,0283
15	5,60	5,88	5,74	0,198	3,85	3,83	3,84	0,0141
16	6,25	5,51	5,88	0,523	3,90	3,92	3,91	0,0141
17	5,14	5,60	5,37	0,325	3,91	3,89	3,90	0,0141
18	5,97	6,34	6,15	0,262	3,80	3,80	3,80	0
19	5,60	5,38	5,49	0,156	3,72	3,72	3,72	0
20	5,51	6,06	5,78	0,389	3,71	3,75	3,73	0,0283
22	5,82	5,70	5,76	0,0848	3,70	3,72	3,71	0,0848
24	4,96	6,01	5,48	0,742	3,70	3,60	3,65	0,0707
26	7,44	7,53	7,48	0,0636	3,60	3,58	3,59	0,0141
27	6,06	7,99	7,02	1,36	3,61	3,49	3,55	0,0848
28	6,43	7,53	6,98	0,778	3,52	3,43	3,47	0,0636
29	6,80	8,09	7,44	0,912	3,47	3,35	3,41	0,0848
30	6,80	8,82	7,81	1,43	3,50	3,42	3,46	0,0566

legenda: * dp = desvio padrão.

TABELA 66 - Acidez do vinho delevurado, expressa g/l ácido láctico, no teste do Desfloc imobilizado, com potencializador e adição de diversas concentrações de extrato de levedura

ciclo	tratam. c/ extr. levedura							
	200 mg/l		média	dp*	600 mg/l		média	dp
2	6,23	6,10	6,16	0,0919	6,67	6,49	6,58	0,129
3	5,73	5,88	5,81	0,110	6,23	5,97	6,10	0,184
4	5,79	5,83	5,81	0,0184	10,6	6,47	10,3	0,294
5	7,02	6,93	6,98	0,0551	8,25	7,72	7,98	0,367
6	5,27	5,79	5,53	0,367	5,27	5,97	5,62	0,496
7	5,18	5,09	5,13	0,0551	4,77	4,70	4,74	0,0550
8	5,44	5,44	5,44	0	5,18	5,62	5,40	0,312
9	5,40	5,59	5,49	0,129	5,70	5,62	5,66	0,0550
10	5,97	5,97	5,97	0	5,79	5,79	5,79	0
11	5,70	5,53	5,60	0,110	5,27	5,44	5,35	0,110
12	4,74	5,35	5,03	0,423	5,53	5,35	5,44	0,129
13	5,35	5,53	5,44	0,129	5,18	5,59	5,38	0,276
14	4,74	4,56	4,65	0,129	5,40	5,09	5,24	0,220
15	5,79	5,70	5,73	0,0551	5,44	5,62	5,53	0,129
16	5,09	5,09	5,09	0	4,65	5,44	5,03	0,551
17	5,18	5,79	5,48	0,423	5,79	5,70	5,73	0,0550
18	4,56	5,18	4,87	0,441	5,00	5,00	5,00	0
19	4,65	4,52	4,58	0,0919	5,09	5,02	5,05	0,0550
20	4,74	5,79	5,26	0,735	5,09	5,22	5,14	0,0919
22	4,83	5,00	4,91	0,110	5,35	5,62	5,48	0,202
24	4,39	5,02	4,70	0,441	5,20	5,09	5,14	0,0735
26	5,35	5,75	5,55	0,276	6,93	6,71	6,82	0,147
27	6,06	5,70	5,88	0,255	6,76	6,55	6,65	0,148
28	5,70	5,70	5,70	0	7,11	6,76	6,93	0,239
29	5,53	5,79	5,66	0,184	6,84	7,02	6,93	0,127
30	6,00	6,35	6,17	0,247	7,11	7,19	7,15	0,0566

legenda: * dp = desvio padrão.

TABELA 66 - Acidez do vinho delevurado, expressa g/l ácido láctico, no teste do Desfloc imobilizado, com potencializador e adição de diversas concentrações de extrato de levedura - continuação.

ciclo	tratam. c/ extr. levedura							
	1800mg/l		média	dp	5000mg/l		média	dp
2	6,76	6,43	6,60	0,233	6,32	6,38	6,35	0,0424
3	6,45	6,73	6,59	0,195	7,24	7,46	7,35	0,156
4	7,77	9,13	8,45	0,962	11,6	12,7	12,1	0,792
5	14,2	11,9	13,1	1,64	17,1	13,0	15,0	2,83
6	13,5	9,30	11,4	2,97	14,4	11,2	12,8	2,26
7	11,8	7,02	9,41	3,38	12,7	9,19	10,9	10,9
8	9,10	5,70	7,40	2,40	10,9	8,75	9,82	1,52
9	9,30	5,27	7,28	2,85	9,33	9,30	9,31	0,0212
10	7,99	5,44	6,71	1,80	8,25	8,43	8,34	0,127
11	6,49	5,27	5,88	0,863	6,58	6,14	6,36	0,311
12	5,27	4,74	5,00	0,375	5,44	5,35	5,39	0,0636
13	6,14	5,82	5,98	0,226	6,58	6,76	6,67	0,127
14	5,79	5,97	5,88	0,127	7,20	6,95	7,08	0,177
15	7,28	7,90	7,59	0,438	9,48	9,30	9,39	0,127
16	6,17	6,32	6,24	0,106	6,85	6,58	6,71	0,191
17	6,14	5,79	5,96	0,247	7,02	6,67	6,84	1,41
18	4,91	4,91	4,91	0	5,62	5,35	5,49	0,191
19	4,74	4,65	4,69	0,064	5,79	5,53	5,66	0,184
20	5,35	5,09	5,22	0,184	5,35	5,18	5,26	0,120
21	4,74	4,83	4,78	0,0636	5,48	5,27	5,37	0,148
22	5,09	4,65	4,87	0,311	4,91	5,53	5,22	0,438
24	4,43	4,65	4,54	0,155	5,62	5,09	5,35	0,375
26	5,44	6,14	5,79	0,495	6,08	7,11	6,59	0,728
27	6,34	6,80	6,57	0,325	6,85	6,89	6,87	0,0283
28	5,79	6,23	6,01	0,311	7,46	7,72	7,59	0,184
29	5,44	5,79	5,61	0,247	8,91	9,04	8,97	0,0919
30	5,79	6,18	5,98	0,276	11,7	12,5	12,1	0,566

TABELA 67 - pH do vinho delevurado no final de cada ciclo, no teste do Desfloc imobilizado, com potencializador e adição de diversas concentrações de extrato de levedura.

ciclo	tratam. c/ extr levedura							
	200 mg/l		média	dp*	600 mg/l		média	dp
2	3,52	3,42	3,47	0,0700	3,49	3,57	3,53	0,0600
3	3,27	3,35	3,31	0,0600	3,55	3,40	3,47	0,110
4	3,75	3,75	3,75	0	3,27	3,61	3,44	0,240
5	3,58	3,58	3,58	0	3,46	3,53	3,49	0,0500
6	3,48	3,48	3,48	0	3,54	3,48	3,51	0,0400
7	3,60	3,73	3,66	0,0900	3,52	3,79	3,65	0,190
8	3,60	3,65	3,62	0,0300	3,68	3,69	3,68	0,0800
9	3,63	3,63	3,63	0	3,67	3,68	3,67	0,0800
10	3,65	3,65	3,65	0	3,60	3,56	3,58	0,0300
11	3,59	3,62	3,60	0,0200	3,61	3,60	3,60	0,0100
12	3,60	3,60	3,60	0	3,65	3,63	3,64	0,0100
13	3,51	3,57	3,54	0,0424	3,56	3,56	3,56	0
14	3,89	3,92	3,87	0,0636	3,92	3,81	3,86	0,0800
15	3,81	3,89	3,85	0,0600	3,85	3,84	3,84	0,0800
16	3,91	3,93	3,92	0,0100	3,93	3,82	3,87	0,0800
17	3,90	3,89	3,89	0,0100	3,90	3,86	3,88	0,0300
18	3,85	3,85	3,85	0	3,79	3,78	3,78	0,0800
19	3,76	3,74	3,75	0,0100	3,72	3,68	3,70	0,0300
20	3,77	3,84	3,80	0,0500	3,73	3,72	3,72	0,0800
21	3,76	3,76	3,76	0	3,73	3,72	3,72	0,0800
22	3,72	3,75	3,73	0,0200	3,70	3,69	3,69	0,0800
23	4,00	4,00	4,00	0	3,96	3,82	3,89	0,1000
24	3,76	3,76	3,76	0	3,74	3,74	3,74	0
25	3,68	3,65	3,66	0,0200	3,63	3,64	3,63	0,0800
26	3,72	3,73	3,72	0,00710	3,74	3,75	3,74	0,00710
27	3,67	3,67	3,67	0	3,58	3,64	3,61	0,0420
28	3,57	3,62	3,59	0,0353	3,51	3,49	3,50	0,0141
29	3,63	3,67	3,65	0,0283	3,61	3,63	3,61	0,00707
30	3,61	3,63	3,62	0,0141	3,60	3,59	3,59	0,00707

legenda: * dp = desvio padrão.

TABELA 67 - pH do vinho delevurado no final de cada ciclo, no teste do Desfloc imobilizado, com potencializador e adição de diversas concentrações de extrato de levedura - continuação.

ciclo	tratam. c/ extr levedura							
	1800mg/l		média	dp	5000mg/l		média	dp
2	3,63	3,63	3,63	0	3,70	3,70	3,70	0
3	3,67	3,83	3,75	0,110	4,12	4,25	4,18	0,090
4	3,55	3,51	3,53	0,030	3,41	3,35	3,38	0,0400
5	3,38	3,34	3,36	0,030	3,34	3,39	3,36	0,0300
6	3,08	3,25	3,16	0,120	3,20	3,34	3,27	0,100
7	3,29	3,50	3,39	0,140	3,29	3,51	3,40	0,150
8	3,54	3,70	3,62	0,110	3,49	3,65	3,57	0,110
9	3,40	3,62	3,51	0,150	3,42	3,51	3,46	0,0600
10	3,32	3,65	3,48	0,230	3,47	3,51	3,49	0,0300
11	3,49	3,55	3,52	0,0400	3,49	3,56	3,52	0,0500
12	3,56	3,54	3,55	0,0100	3,52	3,60	3,56	0,0600
13	3,47	3,56	3,51	0,0600	3,56	3,56	3,56	0
14	3,71	3,79	3,75	0,0566	3,73	3,79	3,76	0,0424
15	3,82	3,88	3,85	0,0400	3,89	3,93	3,91	0,0300
16	3,68	3,74	3,71	0,0400	3,70	3,78	3,74	0,0600
17	3,81	3,88	3,84	0,0500	3,90	3,93	3,91	0,0200
18	3,79	3,82	3,80	0,0200	3,87	3,88	3,87	0,0100
19	3,71	3,80	3,75	0,0600	3,71	3,71	3,71	0
20	3,85	3,88	3,86	0,0200	3,92	3,95	3,93	0,0200
21	3,83	3,83	3,83	0	3,85	3,89	3,87	0,0300
22	3,83	3,82	3,82	0,0100	3,83	3,79	3,81	0,0300
23	4,05	4,04	4,04	0,0100	4,07	4,00	4,03	0,0500
24	3,81	3,81	3,81	0	3,81	3,85	3,83	0,0300
25	3,74	3,66	3,70	0,0600	3,63	3,71	3,67	0,0600
26	3,81	3,78	3,79	0,0212	3,83	3,84	3,83	0,00707
27	3,78	3,78	3,78	0	3,75	3,74	3,74	0,00707
28	3,73	3,66	3,69	0,0495	3,56	3,62	3,59	0,0424
29	3,83	3,81	3,82	0,00707	3,63	3,67	3,65	0,0283
30	3,85	3,80	3,82	0,0353	3,53	3,49	3,51	0,0283