

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E INFECÇÃO
LÁTICA NA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA

24/89

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

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

Influência da Temperatura e Infecção
Lática na Fermentação Alcoólica

Denise Akiko Kaji

Orientador: Prof^o Dr. Vanderlei Perez Canhos

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos
da Universidade Estadual de Campinas

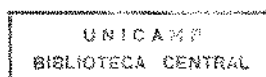
para a obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos

Parecer

Este exemplar corresponde a edição final da tese
defendida por Denise Akiko Kaji e aprovada pela
Comissão Julgadora em CAMPINAS 16/08.89.
Campinas, 18 de agosto/89. 1989

[Assinatura]

Presidente da Banca



AGRADECIMENTOS

Ao Prof^o Dr. Vanderlei Perez Canhos pela orientação, pelo estímulo demonstrado ao longo desses anos e por ter concedido acesso ao laboratório de Microbiologia de Alimentos (FEA-UNICAMP) e da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia *André Tosello*.

Sou grata também as pessoas relacionadas abaixo pela inestimável ajuda e/ou sugestões durante a realização da tese:

Prof^o Aldo Alessandro Milanese Rubilar,
Prof^o Carlos Grosso,
Cícera de Souza,
Eliane Maria Ferrarezzo,
Prof^o Dr. Fumio Yokoya,
Prof^o Hélia Harumi Sato,
Ilse Paschoal Moreira,
Prof^o Dr. Gil Eduardo Serra,
Jaqueline Girnos,
Jardette Lourenço Thomaz Favery Campassi,
Luis Antonio B. Aguiar,
Marcos Antonio de Castro,
Mariko Ueno,
Neusely da Silva,
Prof^o Pedro Antonio Muniz Vazquez,
Prof^o Dra. Pilar Rodrigues de Massaguer,
Rosa Maria Tavares Andrasso Tosello,
Sidnei T. G. Bastos,
Dra. Silvia Yuko Eguchi
e demais funcionários da FEA.

Agradeço também, as entidades abaixo pelo apoio financeiro para a confecção da tese e a bolsa acadêmica:

Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação (ABIA),
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES),
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP),
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

RESUMO

O trabalho enfoca a influência da temperatura e o efeito da infecção lática sobre a produção de álcool e a viabilidade de duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (NRRL Y-2342 e FTPT 0472) cultivadas em caldo de cana enriquecido com N e P, a pH 4,5, e incubadas em um gradiente de temperatura na faixa entre 28 e 40 °C. Determinações da concentração de leveduras (plaqueamento e microscopia), bactérias (plaqueamento), CO₂ (gravimetria), massa celular seca (gravimetria), pH (potenciometria), açúcar (colorimetria) e etanol (cromatografia gasosa) foram quantificadas no substrato inicial e no fermentado. A partir desses dados, verificou-se que as temperaturas ótimas para a produção de etanol foram 38 °C para a linhagem de NRRL Y-2342 e 34 °C para a linhagem FTPT 0472. O valor do coeficiente de rendimento alcoólico máximo apresentou o mesmo valor para ambas as linhagens ($Y_p/S = 0,47$) e uma produtividade global ligeiramente maior para a linhagem NRRL Y-2342 (11 %). A reprodução das leveduras foi prejudicada a 40 °C e beneficiada a temperaturas mais baixas que as indicadas para a produção máxima de etanol. A presença de *Leuconostoc* ou *Lactobacillus* no início das fermentações ocasionou respectivamente, a redução (5 %) ou aumento (6 %) do rendimento alcoólico quando comparadas às fermentações realizadas com culturas puras de *S. cerevisiae*. As produtividades obtidas com as culturas contaminadas foram superiores, exceto em algumas fermentações contaminadas com *Lactobacillus*. Ambos os contaminantes afetaram adversamente o brotamento da linhagem NRRL Y-2342 e pouco influenciaram no brotamento da linhagem FTPT 0472. No final das fermentações, o *Leuconostoc* não pode ser detectado enquanto que o nível de *Lactobacillus* se manteve praticamente constante. A ausência do *Leuconostoc* no final das fermentações pode ser atribuído à característica de crescimento do *Leuconostoc* e ao etanol produzido pelas leveduras, no meio utilizado.

SUMMARY

The goal of this work is to study the influence of temperature and infection of lactic acid bacteria on alcoholic yield and viability of two strains of *Saccharomyces cerevisiae* (NRRL Y-2342 and FTPT 0472) growing on cane sugar broth at pH 4.5 supplemented with N and P. The incubation was carried on a temperature gradient incubator between 28 and 40 °C. Determination of yeast concentration (plate count and microscopy), bacterial concentration (plate count), CO₂ (gravimetry), dry cell mass (gravimetry), pH (potenciometry), sugar concentration (colorimetry) and ethanol (gas chromatography) was done in the initial and final samples. The optimum temperature for ethanol production was found to be 38 °C for strain NRRL Y-2342 and 34 °C for strain FTPT 0472. The maximum alcoholic yield coefficient obtained was the same for both strains ($Y_p/g = 0.47$). However the productivity was slightly higher (11 %) for the strain NRRL Y-2342. The reproduction of yeasts was adversely affected above 40 °C but was enhanced at lower temperatures (28 to 32 °C). There was a decrease in the alcoholic yield of 5 % in the presence of *Leuconostoc* and an increase of 6 % in the presence of *Lactobacillus*. The productivity obtained with contaminated cultures was higher, with the exception of some experiments contaminated with *Lactobacillus*. Both bacterial contaminants affected adversely the budding of strain NRRL Y-2342 but did not affect the budding of strain FTPT 0472. At the end of fermentation the level of the *Lactobacillus* contamination remained constant, whereas viable cells of *Leuconostoc* could not be detected. This was due to the sensitivity of *Leuconostoc* against the ethanol produced during the alcoholic fermentation, and the growth characteristics of *Leuconostoc* in the medium tested.

íNDICE

RESUMO	i
SUMMARY	ii
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1. ASPECTOS GERAIS DA PRODUÇÃO DO ALCÓOL	5
1.1. Tecnologia da produção de álcool	5
1.2. Microrganismos produtores de etanol	8
1.3. Metabolismo da glicose	9
1.4. Fatores limitantes do crescimento das leveduras e da produção alcoólica ...	11
1.4.1. Requerimento nutricional	11
1.4.2. Efeito da temperatura	13
1.4.3. Efeito do dióxido de carbono	14
1.4.4. Efeito do pH	14
1.4.5. Efeito da concentração de glicose	15
1.4.6. Inibição pelo etanol	16
1.5. Estudos para melhoramento de leveduras de interesse industrial	20

2. CONTAMINANTES DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DO ALCOOL	21
2.1. Contaminantes no campo e na colheita da cana de açúcar	21
2.2. Contaminantes na extração e no tratamento físico e químico do caldo de cana	24
2.3. Contaminação na fermentação alcoólica	30
3. ADIÇÃO DE AGENTES ANTIMICROBIANOS NAS DORNAS DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	34
 MATERIAL & MÉTODOS	36
1. CULTURAS DE MICROORGANISMOS	36
2. CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS	37
3. FERMENTAÇÕES ALCOÓLICAS	42
3.1. Preparo do inóculo	42
3.2. Ensaio das fermentações alcoólicas	44
3.3. Análises microbiológicas, físicas e químicos	47
3.3.1. Análises microbiológicas	47
3.3.1.1. Análise microscópica de leveduras	47
3.3.1.2. Contagens de leveduras e bactérias	47
3.3.2. Análises físicas	48
3.3.2.1. Determinação de CO ₂	48
3.3.2.2. Massa celular seca	48

3.3.3. Análises químicas	49
3.3.3.1. Determinação qualitativa dos ácidos	49
3.3.3.2. Determinação dos açúcares	49
3.3.3.2.1. Análise qualitativa	49
3.3.3.2.2. Análise quantitativa	50
1. Açúcares redutores	50
2. Açúcares totais	51
3.3.3.3. Determinação de álcool	51
3.3.3.4. Determinação do pH	51
4. EFEITO DA TEMPERATURA E DO ETANOL SOBRE O <i>Leuconostoc</i> <i>mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	52
4.1. Crescimento do <i>Leuconostoc</i> a diversas temperaturas	52
4.2. Crescimento do <i>Leuconostoc</i> a diversas concentrações de etanol	52
5. RELAÇÃO DA CONTAGEM DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NRRL Y-2342 E DE <i>Leuconostoc</i> DURANTE A FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA	53
RESULTADOS & DISCUSSÃO	54
1. IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS LÁTICAS	54
2. FERMENTAÇÕES ALCÓOLICAS	60
2.1. Características do substrato inicial (Si)	60
2.2. Características do inóculo	61
2.3. Tempo de fermentação	65

2.4. Análises dos microrganismos no término das fermentações	66
2.4.1. Características de viabilidade, morte e brotamento das leveduras	66
2.4.2. Concentração dos microrganismos	70
2.4.3. Densidade celular	74
2.5. Valores de pH	77
2.6. Análise qualitativa dos ácidos	79
2.7. Degradação e utilização dos açúcares	82
2.7.1. Análise qualitativa dos açúcares	82
2.7.2. Análise quantitativa dos açúcares residuais	88
2.8. Produção de etanol e de dióxido de carbono	89
2.9. Relação entre os coeficientes de rendimento celular ($Y_{X/S}$), rendimento alcoólico ($Y_{p/S}$) e produtividade global (Pr) ..	92
3. EFEITO DA TEMPERATURA E ETANOL SOBRE <i>Leuconostoc</i> <i>mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	98
4. RELAÇÃO DA CONTAGEM DE <i>S. cerevisiae</i> NRRL Y-2342 e DE <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> DURANTE A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	104
CONCLUSÕES	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
APÊNDICE	127

INTRODUÇÃO

Vários trabalhos de pesquisa sugerem que a contaminação bacteriana afeta o rendimento da produção de álcool por haver perda dos açúcares devido a reprodução dessas bactérias e formação dos metabólitos indesejáveis (SERRA *et alii*, 1980, AMORIM & OLIVEIRA, 1982 e ALTERTHUM *et alii*, 1984) que podem ser tóxicos para as leveduras. Significativos problemas no processamento podem ocorrer devido a produção de goma e indução da floculação no mosto (SERRA *et alii*, 1980 e YOKOYA, 1989) causando o entupimento de canalizações, bombas e centrífugas (AMORIM & OLIVEIRA, 1982, LIMA *et alii*, 1974 e STUPIELLO, 1982).

Na tentativa de prevenir a ocorrência desses problemas muitos pesquisadores realizaram levantamentos microbiológicos nas várias etapas do processo de produção do álcool.

Constatou-se que a maioria dos microrganismos infectantes na fermentação alcoólica pode ser proveniente do solo (MAYEUX, 1960) e flora epifítica aderida à cana de açúcar (BEVAN & BOND, 1971 e TILBURY, 1975). A colheita mecanizada e as condições de armazenamento como altas temperaturas e umidade podem favorecer o aumento da população de microrganismos (EGAN, 1968).

A cana por si só apresenta boas qualidades nutricionais para o desenvolvimento destes microrganismos contaminantes, principalmente as bactérias lácticas, devido às suas características de tolerância a baixos pHs e altos teores de açúcares (TILBURY, 1975 e ANÔNIMO, 1983a).

Para minimizar o número destes contaminantes muitas usinas de álcool fazem intermitentemente lavagem dos equipamentos com sanitizantes e tratamentos de calagem e de pasteurização no caldo de cana antes deste ser direcionado para as dornas de fermentação (ANÔNIMO, 1983a).

Entretanto, as condições de operação do processo do álcool de muitas usinas como baixa assepsia (FINGUERUT *et alii*, 1983), resfriamento do caldo em tipo torre de resfriamento (SILVA, 1988) e reciclagem de células de leveduras (YOKOYA, 1989) propiciam a recontaminação por vários microrganismos.

Para controlar a infecção bacteriana nas dornas de fermentação muitos estudos têm sido desenvolvidos visando a aplicação de agentes antimicrobianos. Porém, esses tratamentos nem sempre são eficazes. É imprescindível que estes agentes antimicrobianos atuem o mínimo possível nas leveduras. Outra dificuldade é que o mosto de fermentação por apresentar normalmente uma grande variedade de microrganismos, torna-se difícil combatê-los adequadamente.

Trabalhos realizados no laboratório de Microbiologia de Alimentos (FEA - UNICAMP) indicaram que o uso de determinados agentes antimicrobianos para o controle da infecção láctica, como penicilina e pentaclorofenato, podem induzir a produção de goma (dados não publicados).

Considerando estes fatos em adição aos custos envolvidos com o emprego de antibióticos e/ou produtos químicos em usinas de álcool para contornar o problema da infecção láctica na fermentação alcoólica, este trabalho visa obter maior conhecimento do comportamento do *Leuconostoc* e do *Lactobacillus* sobre a fermentação por leveduras, em cultura *batch*.

Assim, foram realizados ensaios de fermentação alcoólica com duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (NRRL Y-2342 e FTPT 0472) na presença e ausência de contaminantes em diferentes temperaturas na faixa de 20-40 °C. O substrato utilizado foi caldo de cana diluído a 12 °Brix, suplementado com N e P e pH ajustado a 4,5. Através das análises físicas, químicas e microbiológicas das amostras do substrato inicial e do fermentado foram obtidos dados que permitiram analisar a influência da temperatura e algumas modificações ocorridas no meio e nas leveduras ocasionadas pelos contaminantes bacterianos.

Para obter maiores informações sobre as duas bactérias utilizadas no experimento como contaminantes e citadas freqüentemente na literatura como causadores dos distúrbios nas fermentações, foram realizados testes comumente empregados em taxonomia bacteriana para identificação a nível de espécie.

A outra etapa foi averiguar o efeito da temperatura e do etanol no crescimento do *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. Assim, o cultivo da bactéria foi observado através de leituras de densidade óptica no mesmo caldo de cana utilizado nos ensaios de fermentações a várias temperaturas (28-40 °C) e em diferentes concentrações de etanol (0-9 % (v/v)) à temperatura ótima de crescimento.

A última etapa do trabalho foi acompanhar o desenvolvimento do *S. cerevisiae* NRRL Y-2342 e do *Leuconostoc*, com o tempo, em uma fermentação simultânea com os dois microrganismos à temperatura ótima de crescimento da bactéria.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. ASPECTOS GERAIS DA PRODUÇÃO DO ÁLCOOL

1.1. Tecnologia da Produção de Alcool

Devido a incentivos resultantes da política do governo federal, a produção de álcool carburante tem aumentado continuamente nos últimos anos. Em 1975, a produção de álcool que foi de 600.10^6 L, aumentou para $4\ 000.10^6$ L, em 1981 e em 1985 foi prevista para aproximadamente $11\ 000.10^6$ L (KEIM, 1983), o que corresponde a 160 mil barris diários de etanol. Segundo GUSMÃO (1985) 90 % da produção automobilística constituem de veículos movidos a álcool.

Os dados da produção de álcool das usinas cooperadas a COPERSUCAR obtidos na safra de 76/77 a 82/83 demonstraram aumento considerável utilizando praticamente a mesma tecnologia da produção. Porém, as instalações das usinas foram ampliadas e procedeu-se maior controle nas etapas de produção de álcool, o que refletiu em apreciável aumento na produtividade e rendimento alcoólico até 1979, tendendo à uma estabilização nos anos posteriores (FINGUERUT *et alii*, 1983).

A matéria-prima mais utilizada para a produção de etanol no Brasil é a cana de açúcar, ou a sacarose, por constituir aproximadamente 85 % dos sólidos solúveis do caldo de cana (LINDEMAN & ROCCHICCIOLI, 1979).

O processo de produção de etanol utilizado pela maioria das usinas cooperadas a COPERSUCAR é o de *Melle-Boinot*. As principais etapas da produção estão indicadas na Figura 1 (ANÔNIMO, 1983b) e descritas abaixo.

A cana é lavada para remoção de solo e areia antes de se proceder a extração do caldo. Depois desta, é tratado quimicamente (calagem) e termicamente. O mosto é constituído basicamente de caldo tratado e melão suplementado com nutrientes (principalmente de nitrogênio e fósforo). Adiciona-se grandes quantidades de leveduras (10 %) no mosto para a conversão dos açúcares (geralmente 12-18 %) em álcool, CO_2 e subprodutos em reatores cilíndricos de fundo ligeiramente cônicos. O mosto fermentado é centrifugado resultando em vinho delevurado, que é direcionado à destilação e 10-20 % do volume é constituído basicamente de leveduras (leite), que é tratado com ácido sulfúrico (pé-de-cuba) e retornado ao mosto (CAMHI, 1979, LIMA *et alii*, 1982 e FINGUERUT *et alii*, 1983).

FINGUERUT *et alii* (1983) sugerem pelo menos três aspectos a serem estudados para melhor aproveitamento do processo *Melle-Boinot*: (1) otimização da fermentação alcólica através do controle da temperatura, pH, composição e concentração de nutrientes do mosto, (2) avaliação do controle microbiológico e (3) seleção de leveduras mais resistentes a alterações químicas e físicas (pH, temperatura, etanol, agentes químicos e etc).

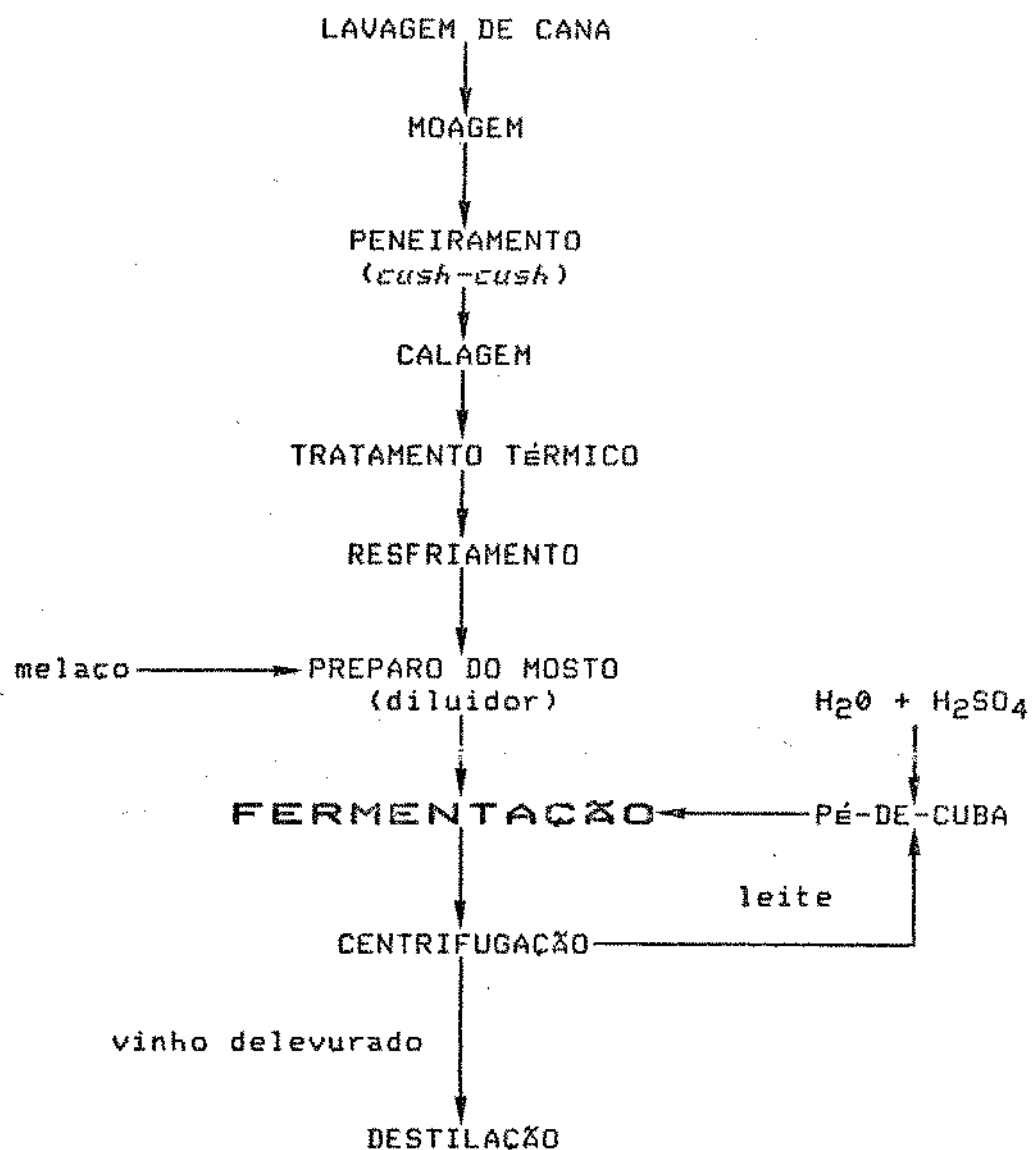


Figura 1. Esquema geral das etapas da produção de álcool utilizando o processo *Helle-Boinot* (ANÔNIMO, 1983b).

1.2. Microrganismos Produtores de Etanol

CORREY (1978) cita em seu trabalho uma grande variedade de bactérias, fungos filamentosos e leveduras capazes de converter açúcar em etanol. As diferentes rotas metabólicas adotadas por alguns desses microrganismos estão descritas no trabalho de DAWES (1963).

Os ascomicetos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Neurospora* não são indicados para a produção industrial de álcool por fornecerem baixo rendimento alcoólico. As bactérias termófilas, além do baixo rendimento são menos tolerantes a concentração de etanol acima de 5 % (ESSER & KARSCH, 1984).

Dessa forma, apenas as leveduras e a *Zymomonas mobilis* têm se mostrado promissoras na produção industrial de álcool.

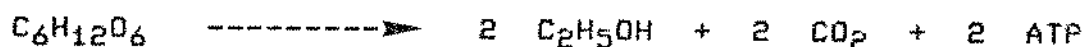
A *Z. mobilis* tem despertado grandes atenções pela sua capacidade de produzir rendimento alcoólico (97 %) superiores as leveduras (89 %). Entretanto, esta bactéria possui a característica de menor tolerância a concentração de etanol (7 %) e baixo pH (5,0) do que as leveduras (8-10 % e 3,0 respectivamente). Nas aquelas condições favorecem o desenvolvimento de muitos microrganismos contaminantes. Outra característica negativa da *Z. mobilis* é a capacidade de fermentar um reduzido número de açúcares (ESSER & SCHMIDT, 1982 e ESSER & KARSCH, 1984).

As espécies de leveduras comumente utilizadas para fermentar açúcares são *Saccharomyces cerevisiae*, *S. uvarum* (*carlsbergensis*), *Schizosaccharomyces pombe* e *Kluyveromyces* sp (KOSARIĆ *et alii*, 1983), sendo o *S. cerevisiae* preferido industrialmente por ser mais tolerante a mudanças das condições do meio (ROSE, 1980, JONES *et alii*, 1981, D'AMORE & STEWART, 1987).

1.3. Metabolismo da Glicose

O *S. cerevisiae* pode metabolizar a glicose por vias catabólicas ou biossintéticas, dependendo das condições do meio.

Concentrações de glicose (acima de 50-100 mg/L) ou ausência de oxigênio induzem a fermentação da glicose para etanol via *Embden-Meyerhof* (JONES *et alii*, 1981 e VAN DIJKEN & SCHEFFERS, 1984). A reação global está representada segundo a equação abaixo (LIEVENSE & LIM, 1982).



Assim, cada grama de glicose pode teoricamente fornecer 0,51 grama de etanol. Entretanto, na prática o rendimento alcoólico não ultrapassa a 90-95 % do teórico devido a necessidade da levedura em utilizar nutrientes para a síntese de massa celular. Além disso, quantidades de glicerol, ácido succínico podem ser produzidos (4-5 % do substrato total) dependendo do tipo de levedura e das condições da fermentação. A síntese desses metabólitos permite a regeneração do NAD em anaerobiose (DURÃO, 1977).

Além destes produtos são comumente produzidos em quantidades menores ácidos orgânicos, tais como: acético, pirúvico e lático; álcoois do tipo amílico, isoamílico, butanol, isobutanol, n-propanol e seus respectivos ésteres, bem como, compostos como acetoína, acetaldeído, 2, 3-butanodiol e outros (PHAFF *et alii*, 1966 e FINGUERUT *et alii*, 1985).

Na ausência ou indisponibilidade de carboidratos pode ocorrer também, a oxidação de etanol, segundo a reação global indicada abaixo:



Com isto, são fornecidos cerca de 4-11 ATP por mol de etanol.

Entretanto, condições de aerobiose e baixas concentrações de glicose (abaixo de 50-100 mg/L) favorecem o mecanismo da oxidação da glicose pela via dos ácidos tricarboxílicos e cadeia respiratória. Nestas condições são produzidos 16-28 APT por mol de glicose (LIEVENSE & LIM, 1982). A estequiometria da reação está descrita abaixo:



1.4. Fatores Limitantes do Crescimento das Leveduras e da Produção Alcoólica

As mudanças físico-químicas do mosto de fermentação podem ocasionar alterações favoráveis ou prejudiciais ao funcionamento celular da levedura, tais como:

1.4.1. Requerimento Nutricional

Tanto o melaço como o caldo de cana contém os principais componentes nutritivos (C:N:P) para a realização da fermentação alcoólica. Mesmo assim, freqüentemente é necessário suplementar o caldo de cana com sais de fosfato e amônia para a obtenção de uma boa fermentação. A proporção de 200:1:0,5 dos respectivos componentes é exigida para a obtenção de vinhos com alto teor alcoólico (10-12 %) (CAMHI, 1979).

Os elementos, K, Mg, Ca, Zn, Fe, Mn e Cl são requeridos em quantidades variando entre 0,1-1,0 mM, enquanto que Co, B, Cd, Cr, Cu, I, Mo, Ni e Va são desejados no meio fermentativo em concentrações de 0,1-100 μ M para aumentar a atividade do crescimento da levedura e da fermentação (JONES *et alii*, 1981). DOMBEK & INGRAM (1986b) sugerem que o Mg na concentração de 0,5 mM favorece o crescimento da levedura e a atividade fermentativa.

Em determinadas concentrações alguns destes nutrientes podem atuar como antagonistas e inibir o crescimento da levedura e da fermentação alcoólica. (JONES *et alii*, 1981 e JONES & GREENFIELD, 1984).

Vitaminas como biotina e pantotenato, por serem compostos essenciais a todas as linhagens de *Saccharomyces*, são desejadas no meio fermentativo.

A suplementação do oxigênio e ácidos graxos insaturados em mostos de cervejaria favorece o aumento de viabilidade das leveduras e a tolerância ao etanol, enquanto que a adição de esterol e ácidos graxos favorecem aumento da massa celular de leveduras (TYAGI, 1984).

Mesmo na presença desses compostos, a levedura requer oxigênio para o seu crescimento (JONES *et alii*, 1981). Entretanto, de acordo com KOSARIC *et alii* (1983) e TYAGI (1984) na presença desses nutrientes essenciais não há necessidade de se adicionar oxigênio no meio.

Após a levedura consumir o oxigênio inicialmente presente no meio de cultura em *batch*, o processo se torna anaeróbico. Nestas condições, as leveduras são incapazes de reproduzirem mais do que 4 ou 5 gerações por causa da deficiência de lipídeos, ácidos graxos insaturados e esterol (TYAGI, 1984).

Porém, altas concentrações de oxigênio inibem as vias fermentativa e respiratória. Tensões de oxigênio superiores a 300 mmHg inibem tanto o crescimento celular como a produção de etanol (OURA, 1974a, 1974b e TYAGI, 1984).

KOSARIC *et alii* (1983) recomendam a manutenção de quantidades de 0,05-0,10 mmHg de oxigênio no caldo de fermentação para a produção de componentes necessários para biossíntese de ácidos graxos poliinsaturados e lipídeos da levedura.

1.4.2. Efeito da Temperatura

JONES *et alii* (1981) descreveram que as espécies de *Saccharomyces* apresentam altas taxas de crescimento a temperatura entre 28 e 35 °C e acima de 40 °C não ocorre crescimento da levedura. De acordo com NAVARRO & DURAND (1978) a concentração de etanol intracelular atinge valores máximos sob altas temperaturas, induzindo a morte da célula.

Estima-se que a temperatura ótima da taxa de produção de álcool, ocorre 5 a 10 °C acima da temperatura ótima do crescimento celular. Em meios não favoráveis à fermentação como alta concentração de etanol, a temperatura ótima para produção de álcool torna-se mais baixa (JONES *et alii*, 1981).

CIFTCI *et alii* (1983) observaram que a produtividade do álcool aumenta drasticamente de 30 a 35 °C, atingindo valores máximos entre 40 e 42,5 °C. O fato da produção máxima de etanol ocorrer a altas temperaturas pode ser devido ao fato de que a atividade da álcool desidrogenase é favorecida a 40 °C (JONES *et alii*, 1981) e ao aumento da permeabilidade da membrana plasmática ocasionado pela alteração da composição de ácidos graxos (D'AMORE & STEWART, 1987). Ocorre um acréscimo de ácido graxos insaturados com aumento da temperatura proporcionando ótima fluidização na membrana para as atividades celulares. Enquanto que a quantidade de esterol não foi observada alterações significativas decorrente da variação da temperatura.

O mecanismo de ação da temperatura sobre o comportamento do *S. cerevisiae* ocorre ao nível de membrana mitocondrial (VAN UDEN *et alii*, 1984).

1.4.3. Efeito do Dióxido de Carbono

A presença de CO₂ em meio aeróbico e anaeróbico inibe o crescimento da levedura (JONES *et alii*, 1981).

Embora não se conheça muito sobre a magnitude da influência do CO₂ na produção do álcool, CHEN & GUTMANIS (1976) notaram que concentrações de CO₂ superiores a 0,016 M em meio com aeração e baixa concentração de glicose provocam drástica inibição no crescimento do *S. cerevisiae*.

Segundo LYNEN (1961) o CO₂ pode influir na permeabilidade e composição da membrana celular resultando em algumas alterações na atividade enzimática, permeabilidade e no transporte de soluto.

1.4.4. Efeito do pH

Muitas linhagens de *S. cerevisiae* crescem em amplo intervalo de pH (2,4 a 8,6) e fermentam em intervalo de pH mais restrito (3,5 a 6,0) (JONES *et alii*, 1981).

A própria levedura, acarreta a diminuição do pH do meio (pH final = 3,5) devido à produção de ácidos orgânicos. Entretanto, o pH intracelular se mantém relativamente constante perto da neutralidade (6,7 a 7,0) durante a fermentação em *batch* (DOMBEK & INGRAM, 1987).

1.4.5. Efeito da Concentração de Glicose

Em condições aeróbicas e baixas concentrações de glicose (inferior a 1,0 g/L) a levedura degrada o açúcar em gás carbônico e água através da via do ciclo do ácido tricarboxílico e cadeia respiratória (efeito *Pasteur*) (OURA, 1974a, 1974b)

Concentrações de glicose na faixa de 0,2 a 1,0 g/L ou superiores, implicam na repressão de síntese e atividades respiratórias (JONES *et alii*, 1981), favorecendo a formação de etanol e gás carbônico através do efeito *Crabtree* (OURA 1974a, 1974b e FIECHTER, 1981).

Concentrações de substrato mais elevados, na faixa de 150 a 250 g/L, inibem o crescimento da levedura e atividade fermentativa (JONES *et alii*, 1981). Porém, DOMBEK & INGRAM (1987) demonstraram *in vitro* que as enzimas glicolíticas e as de fermentação alcoólica mantêm a atividade alta durante a fermentação em cultura *batch*.

Elevadas concentrações de açúcar estão associados à baixa atividade de água (a_w) e pressão osmótica (BEUCHAT, 1983), que podem dificultar a passagem do etanol para fora da célula (STREHAIANO & GOMA (1983).

1.4.6. Inibição pelo Etanol

Alta concentração final de etanol é desejada por oferecer diminuição nos custos de destilação e dificultar o desenvolvimento de muitos microrganismos contaminantes (BROWN *et alii*, 1981), além de proporcionar redução nos custos de investimento da dimensão da planta da usina de álcool por unidade do produto (INGRAM, 1986).

Porém, segundo ROLZ (1981, 1982) concentrações de etanol acima de 70-80 g/L inibem completamente o crescimento de leveduras e níveis de etanol na faixa de 87 a 115 g/L provocam a total inibição da produção de etanol.

BROWN *et alii* (1981) demonstraram através de seus experimentos com duas linhagens de *Saccharomyces* (*S. cerevisiae* NCYC 479 - levedura de sake e *S. uvarum* 5D-cyc - haplóide resistente a ciclohexamida) que o efeito do etanol atua mais intensamente no crescimento da levedura do que na atividade fermentativa.

O efeito do etanol no crescimento da levedura pode ser analisado através da redução na velocidade específica máxima de crescimento e/ou decréscimo na viabilidade celular. A redução na velocidade específica máxima de crescimento provém da inibição da síntese de proteína enquanto a morte da levedura resulta da desnaturação das proteínas afetadas pelo etanol. Neste aspecto a inibição é considerada não competitiva.

Para explicar o mecanismo da inibição pelo produto INGRAM (1986) propôs duas hipóteses básicas: (1) danos na membrana celular e (2) inibição das enzimas glicolíticas.

Esta última hipótese não tem apresentado significância em estudos realizados *in vitro* na presença de níveis de etanol comumente detectados durante a fermentação alcoólica (MILLAR *et alii*, 1982 e LAURE *et alii*, 1984).

Porém, há controvérsias da hipótese da concentração intracelular de etanol apresentar índices bem mais elevados do que a concentração de etanol extracelular ocasionando inativação da enzima álcool desidrogenase (NAGODAWITHANA & STEINKRAUS, 1976), hexoquinase (NOVAK *et alii*, 1981), perda da viabilidade celular (NAGODAWITHANA & STEINKRAUS, 1976) e inibição da reprodução da levedura (NAVARRO & DURAND, 1978).

NAGODAWITHANA & STEINKRAUS (1976) compararam o efeito tóxico do etanol inicialmente introduzido ao meio e do etanol produzido pelas leveduras. A viabilidade celular da levedura foi menos afetada no meio com o etanol adicionado (13,8 %) (p/v) em concentração de aproximadamente 30 % superior ao etanol produzido (9,4 %) (p/v).

Segundo NOVAK *et alii* (1981) o etanol produzido induz uma toxicidade de aproximadamente 20-25 vezes maior que o etanol introduzido ao meio devido a baixa permeabilidade do etanol para o interior da célula.

Os mesmos autores sugerem que a toxicidade do etanol é maior no início da fermentação por provocar a desnaturação das enzimas, principalmente a hexoquinase devido à alta concentração de etanol intracelular (125 g/L). No final da fermentação essa concentração diminui drasticamente para valores de 21 g/L e a concentração de etanol extracelular atinge valores de 45 g/L.

Porém, existem fortes evidências de que o etanol flui livremente através da membrana celular, equilibrando rapidamente a concentração de etanol intra e extracelular (INGRAM, 1986). Através do estudo com carbono marcado (^{14}C) GUIJARRO & LAGUNAS (1984) concluíram que o etanol extracelular se difunde rapidamente para o interior da célula, atingindo equilíbrio molar.

Da mesma forma, os estudos de DASARI *et alii* (1985) mostraram que as diferenças entre a concentração de etanol intra e extracelular são insignificantes em todos os estágios da fermentação. Os autores recomendam certos cuidados na determinação de etanol intracelular. Esta análise deve ser realizada com pré-congelamento durante a coleta da amostra, alta densidade de células a fim de reduzir o tempo de preparo da amostra e subsequente filtração. Estes resultados demonstraram serem concordantes com DOMBEK & INGRAM (1986a).

Outros estudos propõem que o etanol altera a organização da membrana, modificando a permeabilidade e as atividades das enzimas e o sistema de transporte associados a membrana (LAURE *et alii*, 1984 e INGRAM, 1986).

VIEGAS *et alii* (1985) atribuem a discrepância entre os efeitos do etanol adicionado e o produzido aos subprodutos (ácido octanóico e decanóico) da fermentação alcoólica em vinhos e cervejarias. Estes compostos causaram significativo decréscimo na taxa de crescimento de *Saccharomyces bayanus*.

Muitas pesquisas indicam também, que a tolerância ao etanol está correlacionada com o aumento do comprimento da cadeia de ácidos graxos e proporção de ácidos graxos insaturados (C_{18:1}), esterol (ergosterol) na membrana do *S. cerevisiae* (BEAVAN *et alii*, 1982, LAURE *et alii*, 1984 e INGRAM, 1986) e proteolipídeo (fosfatidilcolina e proteína) proveniente do *A. oryzae* (HAYASHIDA *et alii*, 1974,, 1975). A diminuição de quantidades de esterol na membrana celular afeta o transporte de açúcar acarretando inibição no crescimento e fermentação (LAURE *et alii*, 1984).

Em condições anaeróbicas, as leveduras são incapazes de sintetizar ácidos graxos e esterol. Assim, subsequentes trabalhos tem estudado o efeito da adição de vários lipídeos, ácidos graxos insaturados e esterol no meio de cultura com leveduras na tentativa de obter alta produtividade de álcool (ALTERTHUM & ROSE, 1973, THOMAS & ROSE, 1979 e BEAVAN *et alii*, 1982).

Os efeitos de inibição do açúcar e etanol indicam um sinergismo. Embora, não se tenha muitos conhecimentos sobre a interação destes compostos, a inibição pelo etanol tem demonstrado ser mais drástica do que a inibição pelo substrato (JONES *et alii*, 1981 e CIFTCI *et alii*, 1983).

1.5. Estudos para Melhoramento de Leveduras de Interesse Industrial

Com intuito de obter leveduras com características desejadas, tal como, alta produtividade de etanol, tolerância ao etanol, temperatura e osmose, muitas pesquisas tem sido feitas visando a seleção de leveduras através de meios de cultura e manipulação genética clássica, fusão de protoplasmas, hibridização, transformação e DNA recombinante (ROSE, 1980, SPENCER & SPENCER, 1983, CASEY *et alii*, 1986, D'AMORE & STEWART, 1987).

As características da levedura de produzir alta concentração de etanol e a tolerância a este produto demonstram ser independentes. A maioria das células tolerantes ao etanol não produzem altas concentrações de etanol e vice-versa (D'AMORE & STEWART, 1987) indicando independência entre esses dois caracteres. Há evidências da existência de pelo menos quatro genes envolvidos com a tolerância ao etanol.

Embora, não se tenha obtido resultados promissores para o desenvolvimento de linhagens de leveduras com alta produtividade e tolerância ao etanol, as pesquisas desenvolvidas até hoje, indicam que alta tolerância ao etanol pode ser obtida através da adição de componentes celulares e derivados fisiológicos da respiração aeróbica. Assim, D'AMORE & STEWART (1987) propõem o estudo bioquímico e genético com mutantes lipídicos.

2. Contaminantes do Processo de Produção do Alcool

Os processos da colheita de cana de açúcar, extração do caldo da cana e fermentação alcoólica envolvem a participação de diferentes contaminantes bacterianos, em maior ou menor intensidade dependendo do tipo e das condições de operação utilizadas.

2.1. Contaminantes no Campo e na Colheita da Cana de Açúcar

A cana utilizada em usinas de açúcar e álcool, pode sofrer ou não o processo de queima no campo, antes da colheita.

A cana não queimada, cortada e despalhada apresenta ótima qualidade como matéria prima: os resíduos vegetais, tais como, folhas e palmitos, proporcionam uma cobertura vegetal no solo, combatendo a erosão e favorecendo a conservação da umidade. Entretanto, estes podem interferir no brotamento das soqueiras, favorecendo a proliferação de pragas e doenças, aumentando os riscos de incêndios e dificultando as operações de mecanização (RIGHI, 1975).

As folhas e colmos de cana sadia podem conter 10^4 - 10^8 bactérias por grama e 10^3 - 10^4 fungos por grama (DUNCAN & COLLIER, 1964).

BEVAN & BOND (1971) isolaram aproximadamente 50 microrganismos diferentes da cana de açúcar. Entre eles: *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Actinomyces*, *Saccharomyces*, *Torula*, *Pichia* e *Penicillium*.

A queima das folhas de cana visa diminuir as impurezas vegetais e facilitar o corte (RIGHI, 1975). Geralmente não favorece a redução de microrganismos. Embora a temperatura da cana possa atingir 85 °C, o *Leuconostoc mesenteroides* não é totalmente eliminado (BEVAN & BOND, 1971).

O processo da queima da cana pode remover a cera do colmo, que parece ter função bacteriostática (BEVAN & BOND, 1971), além de poder provocar rachaduras da casca da cana facilitando a entrada de microrganismos (STUPIELLO, 1982).

De acordo com EGAN (1965) e STUPIELLO (1982) pode haver uma rápida penetração e colonização por *Leuconostoc* nos tecidos da cana, embora os mecanismos de entrada não tenham sido bem elucidados.

No processo de colheita da cana, pode ocorrer contaminação por bactérias no corte com machados ou podões (TILBURY, 1969), por resíduos do solo (TILBURY, 1975) e pela flora epifítica da cana (MAYEUX, 1960, DUNCAN & COLMER, 1964 e TILBURY, 1975).

O tipo de processo utilizado na colheita da cana de açúcar pode propiciar o aumento do nível de deterioração em decorrência da proliferação dos microrganismos nas regiões da cana com danos físicos.

A colheita mecanizada, por colhedoras que seccionam o colmo em toletes curtos, causa o aumento do grau de infecção dos toletes e consequentemente a deterioração. Aproximadamente uma hora e meia após o corte mecanizado os microrganismos predominantes são: leveduras, *Leuconostoc*, *Xanthomonas* e *Aerobacter* (BEVAN & BOND, 1971).

Observações realizadas por STUPIELLO (1982) mostraram perdas de açúcar de até 28 % no decorrer de 4 dias após o corte, sendo maior a perda nos toletes menores.

A deterioração ocorre em média 60 horas após a colheita mecânica, enquanto que no corte manual a deterioração ocorre em média após 70 horas (EGAN, 1968). No caso da cana queimada e cortada em toletes curtos (20 a 30 cm) o período de armazenamento no pátio das usinas deve ser no máximo 24 horas após a colheita para evitar indesejáveis aumentos da microflora contaminante (STURION *et alii*, 1975).

Colmos de canas queimados e cortados inteiros apresentaram a formação de dextrana após duas semanas, enquanto que canas não queimadas isto não ocorreu (FERRARI e RODELLA, 1977).

Porém, a dextrana pode ser degradada pelo *Penicillium* frequentemente presente na própria cana (BEVAN & BOND, 1971).

O aumento do tempo de armazenamento da cana contribui para perdas de açúcares devido a atividade dos microrganismos, principalmente as bactérias lácticas. Além disso, pode ocorrer acréscimo no teor das fibras com a eliminação da água do caldo através da respiração e transpiração com reflexos negativos na extração dos açúcares (STUPIELLO, 1982).

O armazenamento após colheita da cana pode acarretar a elevação da contagem bacteriana, principalmente em dias quentes e úmidos, atingindo concentrações de até 10^9 bactérias por grama de cana (MAYEUX, 1960).

2.2. Contaminantes na Extração e no Tratamento Físico e Químico do Caldo de Cana

Segundo TILBURY *et alii* (1977) a perda de sacarose em moendas de cana-de-açúcar é de cerca de 1,0 kg de sacarose por tonelada de cana, podendo atingir 2,5 kg de sacarose por tonelada de cana devido a falta de limpeza nas operações do processo. As perdas de sacarose são atribuídas à inversão química (12 %), atividade de enzimas extracelulares, principalmente a invertase (25 %) e atividade microbiana (62 %).

Além disso, pode haver perdas de sacarose no bagaço, torta de filtro, mel final, bem como por perdas mecânicas provenientes de vazamentos em tubos, arrastes nos filtros, evaporadores e tachos de cozimento (PAYNE e ZAPERLON, 1976).

Para melhor compreensão destas perdas de sacarose eventualmente ocasionadas pela contaminação microbiana nos processos envolvidos na produção de açúcar e álcool muitos autores analisaram quantitativamente e qualitativamente a flora microbiana em diversas etapas do processo.

A contagem microbiana da água reciclada para lavagem do colmo de muitas usinas frequentemente apresenta níveis elevados de 10^8 Unidades Formadores de Células (UFC)/mL (ANÔNIMO, 1983a) que são facilmente introduzidos ao processo (STUPIELLO, 1982), ao invés de serem diminuídos com a retirada do solo e areia.

O pH do caldo misto de muitas usinas brasileiras é monitorado de forma a manter a contaminação abaixo de 10^7 UFC/mL (ANÔNIMO, 1983a), ou seja, valores de pH do caldo misto entre 4,79 e 5,80, próximos ao do caldo provenientes de cana maduras, sadias e recém cortadas (pH ao redor de 5,5) (BAYMA, 1973), que indica um baixo teor de ácido produzido pelos contaminantes.

Foi observado também, que as bactérias lácticas são predominantes no caldo misto e que se reproduzem facilmente nos equipamentos de extração do caldo.

PEDERSON & HUCKER (1946) notaram predominância de *L. mesenteroides* seguidos de *Bacillus* sp, *Achromabacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus* e *Escherichia* no caldo de cana.

FAVILLE (1947) isolou do caldo de cana 740 colônias formadoras de gomas em Ágar com 10 % de Açúcar e classificou-as em 4 grupos distintos de acordo com as características macroscópicas: tamanho, elevação, coloração, etc.

Posteriormente, Mc CLESKEY & FAVILLE (1947) estudaram mais detalhadamente 160 colônias das 740 isoladas por FAVILLE (1947), identificando-as como sendo *Leuconostoc mesenteroides*. Observaram também, que a produção de goma foi favorecida à temperatura ambiente (25 a 30 °C) e a baixa temperatura (8 a 10 °C) em meios de cultura com alta e baixa acidez, respectivamente.

TILBURY (1975) analisou a deterioração do caldo de cana em condições naturais, durante 10 dias. Verificou que a contagem inicial de bactérias lácticas foi de 10^4 a 10^5 por mL, atingindo 10^7 a 10^9 por mL no 3º e 4º dia após a colheita, com predominância do *Leuconostoc*. Entretanto, nos dias posteriores de incubação do caldo, o gênero predominante foi o *Lactobacillus*. A contagem dos demais microrganismos aumentou de 10^3 a 10^4 por mL do caldo para 10^6 por mL, após 10 dias de incubação. E o pH do caldo foi reduzido de 5,1 a 4,3.

Segundo Mc MASTER & RAVNÖ (1977) a quantidade de ácido láctico no caldo misto pode aumentar em dias com chuvas.

LIMA *et alii* (1974) isolaram e identificaram microrganismos em caldo bruto, caldo misto e água de embebição. A flora microbiana encontrada foi constituída de leveduras como: *Candida didensii*, *C. fabiani*, *C. intermedia*, *C. santamariae*, *Criptococcus kvetzingii*, *Hansenula polymorpha*, *Kloeckera corticis*, *Rodhotorula pallida*, *R. rubra*, *Saccharomyces uvarum*, *Torulopsis norvegica* e *Trichosporon cutaneum* e bactérias como: *Leuconostoc citrovorum*, *L. dextranicum*, *L. mesenteroides*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus coagulans*, *B. circulans*, *B. megatherium*, *Paracolobactrum aerogenoides* e *Pseudomonas incognita*.

Análises microbiológicas em caldo de cana misto floculado, feitas por BEVAN & BOND (1971) revelaram a presença de três tipo de microrganismos: *Leuconostoc mesenteroides*, levedura (*Hansenulla* sp ou *Pichia* sp) e um pequeno microrganismo com forma de bastonete (não identificado). A levedura parece contribuir com os fatores de crescimento para o *Leuconostoc*, que produz ácido láctico, enquanto que o microrganismo com forma de bastonete remove o excesso do ácido láctico, utilizando-o como substrato. A interação destes microrganismos indica ser uma tríplice simbiose por propiciar um meio favorável para os três.

EGAN (1965), BEVAN & BOND (1971), LIMA *et alii* (1974), ANÔNIMO (1983a) e outros constataram a predominância das bactérias lácticas em várias etapas do processo do açúcar e álcool, devido às suas características acidofílicas e de tolerância a soluções ricas em açúcares. Além disso, muitas espécies produzem polissacarídeos capsulares e excretam gomas extracelulares que protegem as células dos efeitos letais como aquecimento e produtos químicos. Dessa forma, as bactérias lácticas podem sobreviver nas diferentes etapas de tratamento do caldo de cana.

Os tratamentos de calagem e térmicos podem permitir uma redução substancial na contagem microbiana. No processo de clarificação pode haver um decréscimo de 99,999 % de leveduras e células vegetativas de bactérias. Porém, as bactérias produtoras de dextrana e bactérias esporuladas costumam sobreviver a este tratamento (SKOLE *et alii*, 1977). Neste caso, os níveis de contaminantes observados foram sempre inferiores a $5,0 \cdot 10^6$ mL, com predominância do grupo das bactérias lácticas (ANÔNIMO, 1983a).

BEVAN & BOND (1971) também verificaram a sobrevivência de *Actinomyces*, *Leuconostoc* e grande número de *Bacillus* após a clarificação e tratamento térmico a 92 °C.

YOKOYA *et alii* (1984) também notaram a presença de *Leuconostoc mesenteroides* no caldo de cana tratado a 115 °C. Os autores sugeriram provável reinfecção seguida de reprodução destas durante o resfriamento do caldo para a fermentação.

O caldo de cana é considerado de má qualidade quando o pH decresce substancialmente devido à provável formação de ácido acético e ácido láctico, bem como, pelo aumento de goma e de açúcares redutores (EGAN, 1968). A formação de goma pode acarretar problemas nas etapas de operação das usinas de açúcar e álcool, tais como: entupimento em canalizações, bombas e centrífugas (LIMA *et alii*, 1974, AMORIM E OLIVEIRA, 1982 e STUPIELLO, 1982), bem como, dificuldades na clarificação, evaporação e cristalização do açúcar (ANÔNIMO, 1971, SILVA, 1974 e AYALA *et alii*, 1977).

A presença de dextrana no caldo, além de poder provocar redução na taxa de cristalização ou em casos mais extremos não efetuar a cristalização pode acarretar alongamento no cristal de açúcar (ANÔNIMO, 1971).

SILVA (1988) analisou qualitativamente e quantitativamente os microrganismos aeróbicos presentes no caldo de cana previamente clarificado e pasteurizado, coletados na entrada e saída da torre de resfriamento. Os resultados mostraram que o número e a variação de contaminantes aumentou paralelamente com a redução do pH do caldo. O *Leuconostoc* apresentou elevação de 46 % em relação ao seu número inicial enquanto que o de *Lactobacillus* e de leveduras foi reduzido a 24 % e 46 % respectivamente. A população microbiana representou predominância bacteriana (88 %), Gram positiva (87 %) e do grupo das lácticas (50 %). A distribuição populacional das bactérias identificadas apresentou a seguinte ordem decrescente: *Lactobacillus* (38 %), *Micrococcaceae* (22 %), *Leuconostoc* (12 %), *Bacillus* (3 %) e *Enterobacteriaceae* (1 %). Os lactobacilos predominantes foram os heterofermentativos (98 %) e termodúricos (79 %) destacando-se o *L. fermentum* e os leuconostóques produtores de goma, sendo que houve predominância de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*.

Normalmente o melão, subproduto da fabricação do açúcar das usinas de álcool anexas, é diluído com caldo de cana e água para o preparo do mosto a ser fermentado.

O número de microrganismos encontrados por SOUZA *et alii* (1977) nas amostras de melão de cristal e demerara após três anos de armazenamento foi 102 e 513 microrganismos por grama, respectivamente. Estes microrganismos foram identificados como bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Enterobacter* e *Sarcina*, fungos filamentosos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Papulaspora*, *Monilia* e *Gliocladium* e espécies de

leveduras, tais como, *Candida melinii*, *Cryptococcus albidus* var. *albidus*, *Cryptococcus infirmominiatus*, *Debaryomyces cantarelli*, *Hansenula henricii*, *Hansenula canadensis*, *Oosporidium margaritifera*, *Rhodotorula graminis*, *R. pallida*, *Sporobolomyces roseus*, *Torula* sp e *Torulopsis candida*. Apesar da constatação destes microrganismos no melão de açúcar cristal e de demerara, não foi observado diminuição drástica na quantidade de sólidos solúveis.

2.3. Contaminação na Fermentação Alcoólica

A contaminação microbiana nas dornas de fermentação das usinas de álcool tem sido citada por alguns autores do Brasil.

SERRA *et alii* (1979) escreveram uma excelente revisão bibliográfica sobre esse assunto.

Segundo os autores acima, NEVES (1938) foi o precursor do assunto no Brasil sobre as infecções acética, láctica, butírica e dextrânica em fermentações alcoólicas a partir de caldo de cana de açúcar ou de melão. NEVES (1938) foi quem descreveu, os principais sintomas característicos de cada tipo de contaminação.

Posteriormente, ALMEIDA (1940) descreveu os fatores que propiciam o aparecimento dessas infecções na fermentação alcoólica de caldo de cana.

GALLI (1961) identificou várias bactérias envolvidas na contaminação de fermentações alcoólicas. As bactérias responsáveis pela contaminação acética pertencem ao gênero *Acetobacter*, sendo as principais espécies *A. acetii*, *A. pasteurianum*, *A. acetosum*, *A. kintzeigianum* e *A. suboxydans*. As espécies responsáveis pela fermentação láctica mais comuns foram *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. delbruckii*, *L. casei*, *L. leischmanii* e *S. lactis*. As bactérias responsáveis pela fermentação butírica mostraram ser dos gêneros *Clostridium*, sendo as principais as espécies *Cl. pasteurianum* e *Cl. saccharobutyricum*. A fermentação dextrânica, conhecida como canjica, foi devido ao *Leuconostoc mesenteroides* e a fermentação levânica foi causada pelas bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Aerobacter* e *Streptococcus*.

Dando sequência a estes trabalhos SERRA *et alii* (1979) estudaram a floculação de fermentos em várias destilarias do Estado de São Paulo e verificaram a presença de várias espécies de *Bacillus* em mostos fermentados. Destes isolados, um deles foi identificado como *Sporolactobacillus* sp, resistente a tratamentos ácido (pH 1,9 - 2,0) e térmico (próximo de 100 °C). O efeito desta infecção resultou em um aumento progressivo do tempo de fermentação e um decréscimo de aproximadamente 15 % no rendimento alcoólico. De acordo com os autores essa contaminação foi proveniente do uso de águas residuais com recirculação contínua para lavagem de cana de açúcar, onde a contagem de microrganismos totais apresentou $2,0.10^6$ UFC/mL.

Posteriormente, os mesmos autores (SERRA *et alii*, 1980), notaram novamente a presença de *Sporolactobacillus* sp em outra usina de álcool do Estado de São Paulo, com processo *Helle-Boillot*. A presença destas bactérias provocou a floculação do fermento, tempo de fermentação mais prolongado, acidez mais alta e menor rendimento alcoólico.

Este último aspecto foi atribuído principalmente ao número elevado (em torno de 10^8 UFC/mL) de bactérias contaminantes. Para combatê-los, foi realizado um rigoroso tratamento químico, o que resultou também em um índice elevado de leveduras mortas (aproximadamente 50 %). Portanto, a simples redução de bactérias através da aplicação de agentes químicos pode não melhorar o rendimento alcoólico.

Os gêneros das bactérias contaminantes mais atuantes na fermentação alcoólica, segundo AMORIM e OLIVEIRA (1982) são: *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Aerobacter*, *Streptococcus* e *Leuconostoc*. A temperatura entre 30 e 40 °C favorece o crescimento dessas bactérias em forma de cocos e bastonetes acarretando quedas na porcentagem de viabilidade de levedura e no rendimento alcoólico. Isto é relevante a temperaturas acima de 34 °C onde o nível de bastonetes apresentou valores mais elevados.

ALTERTHUM *et alii* (1984, 1985) estudaram a contaminação bacteriana de bacilos e cocos comumente encontradas nas microdestilarias de álcool com processo de reciclagem de células. Eles obtiveram reduções abruptas de quase 100 % e 60 % no rendimento alcoólico nas fermentações contaminadas por bacilos e cocos, respectivamente. A concentração bacteriana aumentou de 10^7 a 10^9 UFC/mL e a morte de levedura foi drástica, atingindo valores em torno de 90 % e 74 % na presença de bacilos e cocos, respectivamente. É curioso notar que mesmo na ausência de contaminantes a viabilidade de leveduras decaiu, chegando a apresentar valores de até 56 % de células mortas. Porém, o rendimento alcoólico foi ligeiramente aumentado em relação a fermentação do primeiro ciclo. Por outro lado, na última reciclagem o rendimento alcoólico foi reduzido em 10 % embora a porcentagem de leveduras tenha melhorado ligeiramente.

RODINI (1985) identificou 66 bactérias presentes em amostras de mosto fermentado de usinas de álcool do país, onde a população bacteriana apresentava níveis de 10^7 UFC/mL. A presença de *Leuconostoc mesenteroides* foi notada apenas em destilarias onde o caldo não era tratado por aquecimento ou por biocidas. Além disso, a incidência de *Leuconostoc* foi pouco representativa (1,5 % de um total de isolados). As destilarias que empregam tratamento térmico no caldo de cana apresentaram uma população grande de bastonetes esporulados (62,1 %) e pequena de *Lactobacillus* sp (3 %).

GALLO (1989) notou também uma maior quantidade de bactérias Gram positiva em forma de bastonetes com predominância de *Lactobacillus* e *Bacillus* nas amostras coletadas nos seguintes pontos: mosto a ser adicionado nas dornas, meio fermentativo, fermentado e leite de leveduras antes e após a adição de H_2SO_4 . Outras bactérias isoladas foram: *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Leuconostoc* e alguns isolados de *Enterobacter*.

3. Adição de Agentes Antimicrobianos nas Dornas de Fermentação

Industrialmente, muitos produtos químicos e antibióticos, principalmente a penicilina, vem sendo utilizados na tentativa de controlar a infecção bacteriana na fermentação alcoólica. O desempenho da maioria desses agentes anti-microbianos tem sido insatisfatório.

A nível de laboratório, diversos estudos foram realizados nesse sentido. SATO *et alii* (1980a) obtiveram um aumento no rendimento alcoólico de 10 a 12 % com a aplicação de diversas associações de antibióticos: penicilina G potássica, hexaclorofenol e cloranfenicol nas concentrações de 1 000 U, 4 mg e 3 mg por litro respectivamente.

A aplicação de sulfato de aminosidina e lucensomicina (FARMITALIA) na concentração de 0,4 mg/L realizados pelos mesmos autores (1980b) não apresentou praticamente nenhuma ação de desinfetante.

FURLETTI *et alii* (1981) sugerem que a utilização de 40 ppm de dois biocidas, 2-hidroxietil 2, 3-dibromopropionato e 2-(tiocianometiltio) benzotiazol nas dornas de fermentação não interferem no metabolismo fermentativo e na viabilidade celular das leveduras, embora não tenha sido realizados análises referentes aos contaminantes, tal como, viabilidade dos contaminantes ou controle dos principais metabólitos.

AMORIM & OLIVEIRA (1982) recomendam a adição de penicilina V-ácida no meio fermentativo para o combate de cocos e micrococos.

ALTERTHUM *et alii* (1984, 1985) constataram a ineficiência da penicilina V-ácida (500 UI) sobre bacilo *Gram* positivo presentes no mosto de melaco de cana. Embora, a utilização deste antibiótico tenha contribuído para a estagnação do número dessas bactérias, o rendimento alcoólico não foi melhorado, apresentando valores semelhantes ao da fermentação sem tratamento com biocida.

ALTERTHUM *et alii* (1984) citam também, a ineficiência de 20 mg/L de Bioquim BD-70 no controle de bactérias *Gram* positivas com formas de bastonetes e cocos.

MATERIAL & MÉTODOS

1. CULTURAS DE MICRORGANISMOS

Os microrganismos utilizados nos experimentos foram linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e bactérias lácticas obtidas junto à Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello (FTPT). As designações e a procedência dos microrganismos utilizados estão indicadas no Quadro 1.

Quadro 1. Microrganismos utilizados nos experimentos

microrganismos	coleção	procedência
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	FTPT 0122	NRRL Y-2342
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	FTPT 0472	Mosto de Usina
<i>Lactobacillus</i> sp	FTPT 0694	Mosto de Usina
<i>Leuconostoc</i> sp	FTPT 0367	Caldo de Cana

FTPT = Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello, Campinas, SP.

NRRL = Northern Regional Research Laboratory, USDA, Peoria, Illinois, USA.

2. CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS

A caracterização e identificação das bactérias lácticas foi feita de acordo com as recomendações descritas por HARRIGAN & Mc CANCE (1973), INGRAM (1975), GARVIE (1984, 1986) e KANDLER & WEISS (1986).

Os meios de cultura e reagentes utilizados para a identificação dos isolados, FTPT 0367 e 0694, e as respectivas bibliografias adotadas encontram-se sumarizadas no Quadro 2.

Os testes realizados para a identificação dos gêneros das bactérias lácticas estão indicados em forma de chave dicotômica na Figura 2.

A identificação do *Leuconostoc* e do *Lactobacillus* a nível de espécie foi feita segundo os testes de produção de ácidos a partir de diversos carboidratos recomendados por GARVIE (1986) e KANDLER & WEISS (1986). A chave para a diferenciação das subespécies do *Leuconostoc* e das espécies do *Lactobacillus* está indicada nas Figuras 3 e 4, respectivamente.

Foram realizados também, testes adicionais, como diferenciação do crescimento de bactérias a diferentes temperaturas (15, 37 e 45 °C), concentrações de etanol (5, 10 e 15 % (v/v)) e concentrações de cloreto de sódio (3,0; 6,5 e 7,0 % (p/v)).

Estes testes foram sempre realizados a partir das culturas crescidas em *Man, Rogosa & Sharpe* Ágar (MRSA, Merck) incubadas à 30 °C durante 24 horas.

Quadro 2. Relação dos testes para identificação das bactérias lácticas segundo Mc FADDIN (1980).

testes	meio de cultura	reagentes
morfologia	MRS Ágar	---
coloração <i>Gram</i>	MRS Ágar	sol. cristal violeta, iodo <i>Lugol</i> e safranina-o
esporos	MRS Ágar	verde malaquita e safranina-o
catalase	MRS Ágar	sol. de H_2O_2 3 %
motilidade	MRS Ágar	---
gelatinase	Nutriente Gelatina	---
hidrólise de amido	Ágar Amido	sol. de iodo <i>Lugol</i>
produção de CO_2^{**}	caldo MRS	sol. $Ba(OH)_2$ saturada
desaminação da arginina*	caldo de Arginina	reagente de <i>Nessler</i>
reação no leite	<i>Litmus Milk</i>	---
produção de ácidos	<i>Phenol Red Agar Base</i>	sol. de açúcar teste*** 1,0 %
temperatura	caldo MRS	---
tolerância a NaCl	caldo MRS	sol. NaCl 3,0; 6,5 e 7,0 %
tolerância a etanol	caldo MRS	sol. C_2H_5OH 5, 10, e 15 %

* segundo SKERMAN (1969)

** segundo SILVA (1988)

*** açúcares testes: L-arabinose, celobiose, esculina, frutose, galactose, glicose, lactose, maltose, manitol, manose, melizitose, rafinose, ramnose, ribose, salicina, sacarose, sorbitol, trealose e xilose.

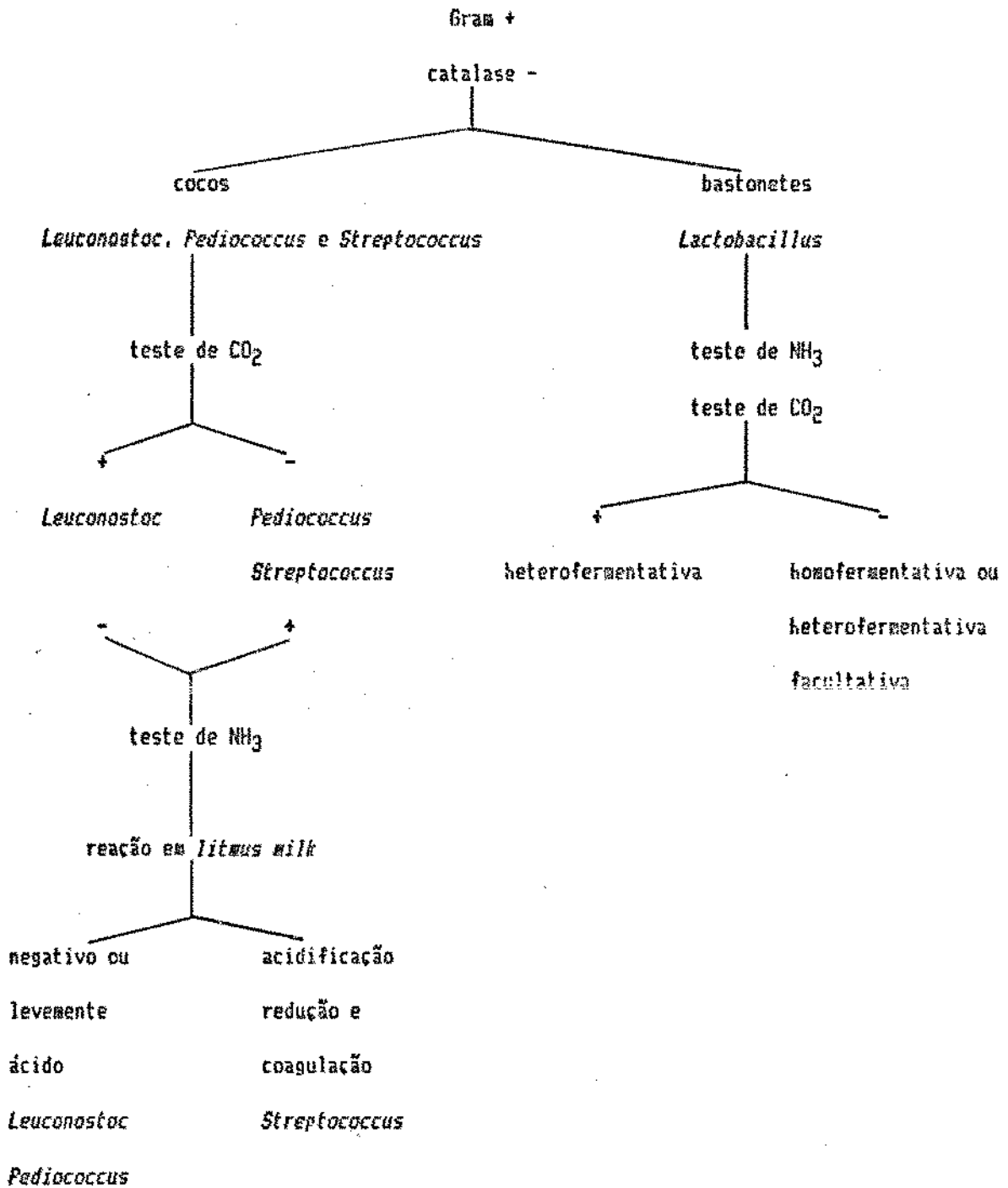


Figura 2. Chave para classificação dos gêneros das bactérias lácticas segundo HARRIGAN & Mc CANCE (1973), INGRAM (1975), GARVIE (1984, 1986) e KANDLER & WEISS (1986).

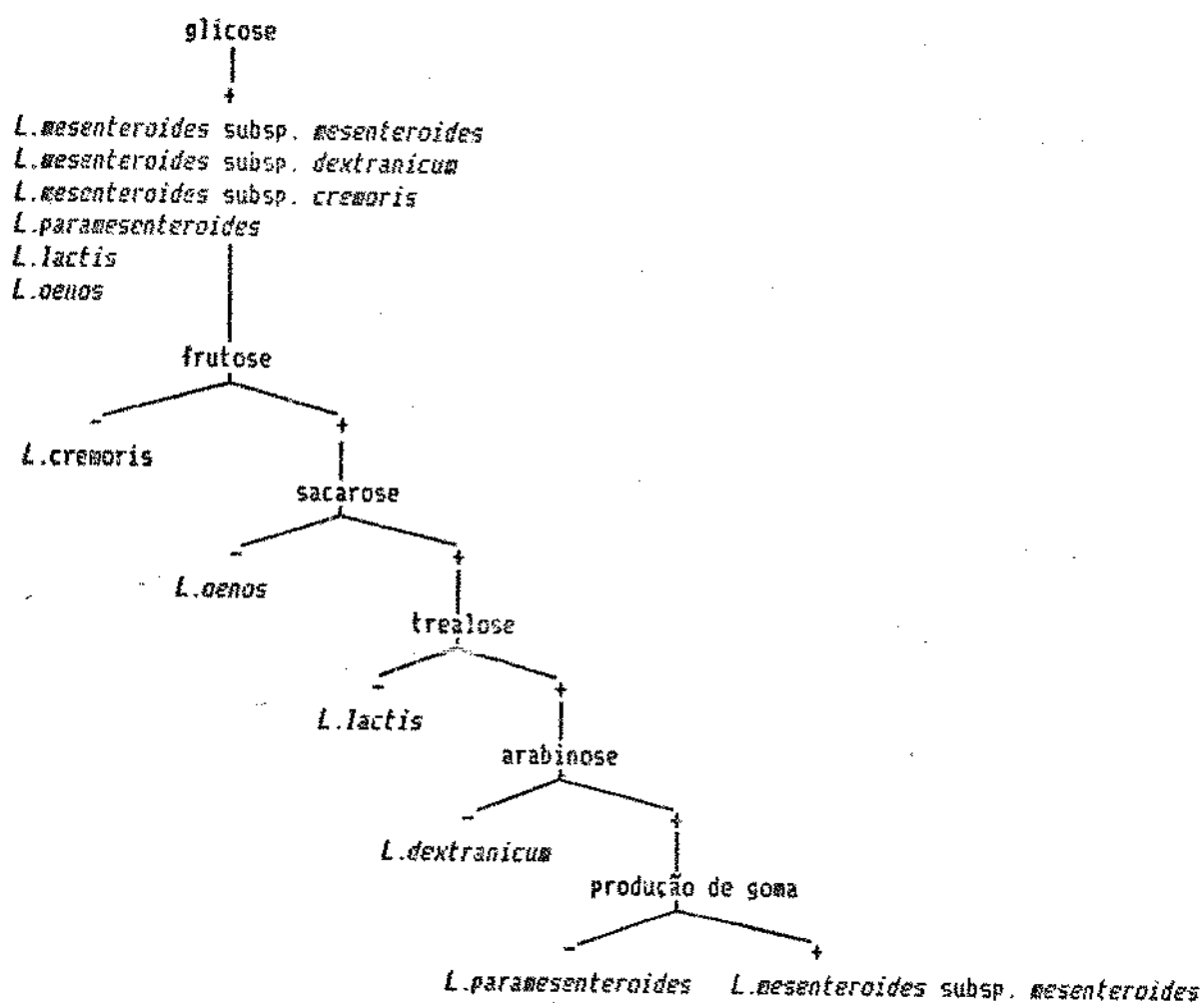


Figura 3. Chave diferencial da produção de ácidos a partir de diversos carboidratos para identificação do *Leuconostoc* a nível de subespécie segundo GARVIE (1984, 1986).

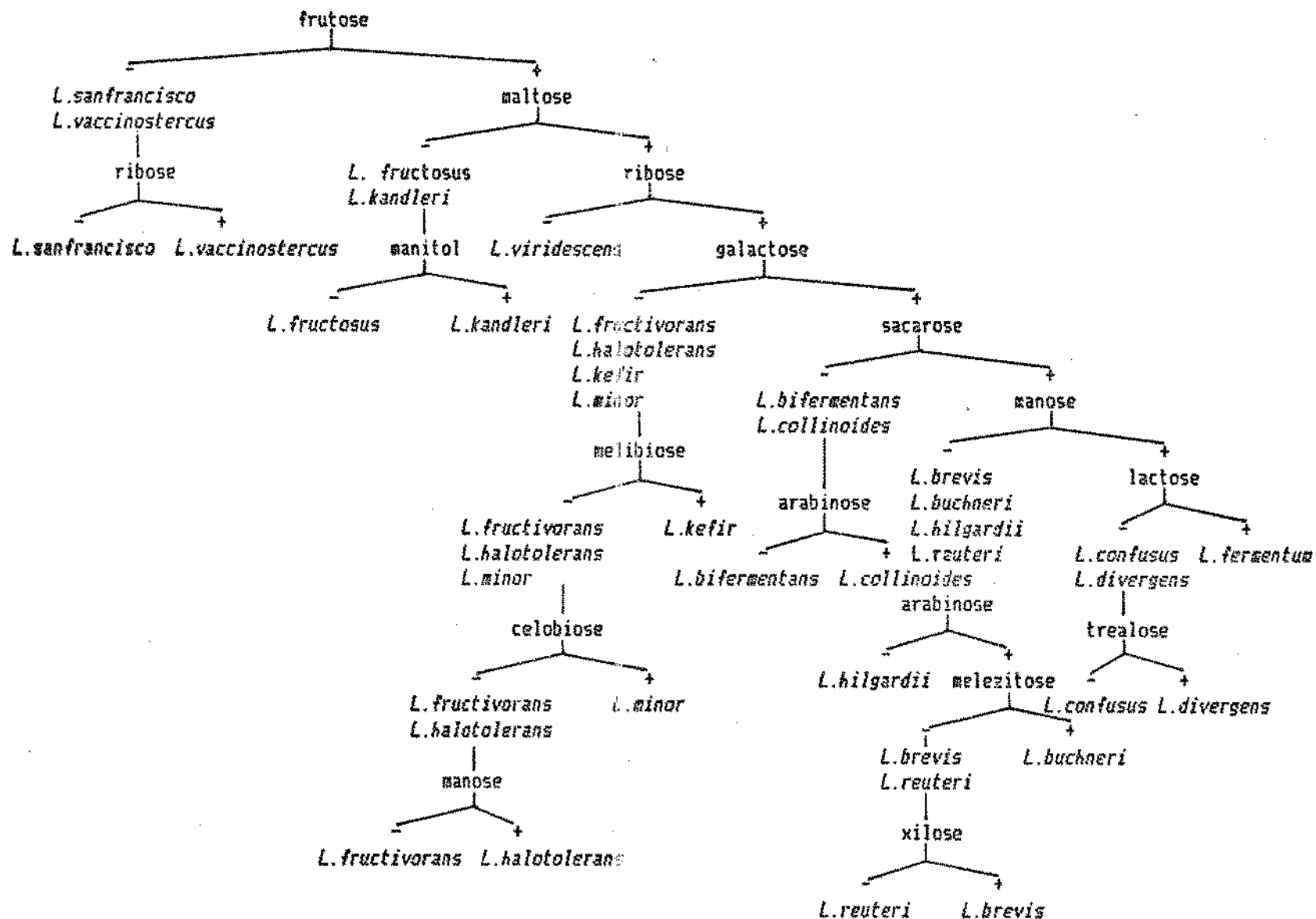


Figura 4. Chave diferencial da produção de ácidos a partir de diversos carboidratos para identificação do *Lactobacillus* heterofermentativo a nível de espécie segundo KANDLER & WEISS (1986).

3. FERMENTAÇÕES ALCÓOLICAS

O trabalho experimental das fermentações alcoólicas foi dividido em três partes: (3.1.) preparo do inóculo, (3.2.) ensaios de fermentação alcoólica e (3.3.) análises físicas, microbiológicas e químicas (Figura 5).

3.1. Preparo do Inóculo

Os microrganismos (Quadro 1) foram inicialmente reativadas em caldo MRS. Após 24 horas de incubação à 30 °C, os microrganismos foram inoculados em caldo de cana diluído a 12 °Brix e enriquecido com 240 µg/mL de uréia e 24 µg/mL de ácido fosfórico, a pH 4,5 (DAHIYA *et alii*, 1980), previamente esterilizados a 121 °C por 15 minutos. Os microrganismos foram transferidos consecutivamente a cada 24 horas no meio acima (por no mínimo três vezes), visando a sua adaptação a esse substrato. Aliquotas de 0,1 mL da suspensão de leveduras foram inoculados em erlenmeyer de 500 mL contendo 250 mL do mesmo substrato (população inicial = 10^8 UFC/mL) e 0,1 mL da suspensão de bactérias foram transferidas em tubos de ensaio contendo 7,0 mL do substrato, obtendo-se assim, um inóculo de 10^7 UFC/mL.

A incubação dos microrganismos foi feita à 30 °C por 24 a 26 horas. Após a fermentação, a suspensão de células foi centrifugada a 5 000 rpm e 4 °C durante 5 minutos para a obtenção do inóculo da etapa seguinte.

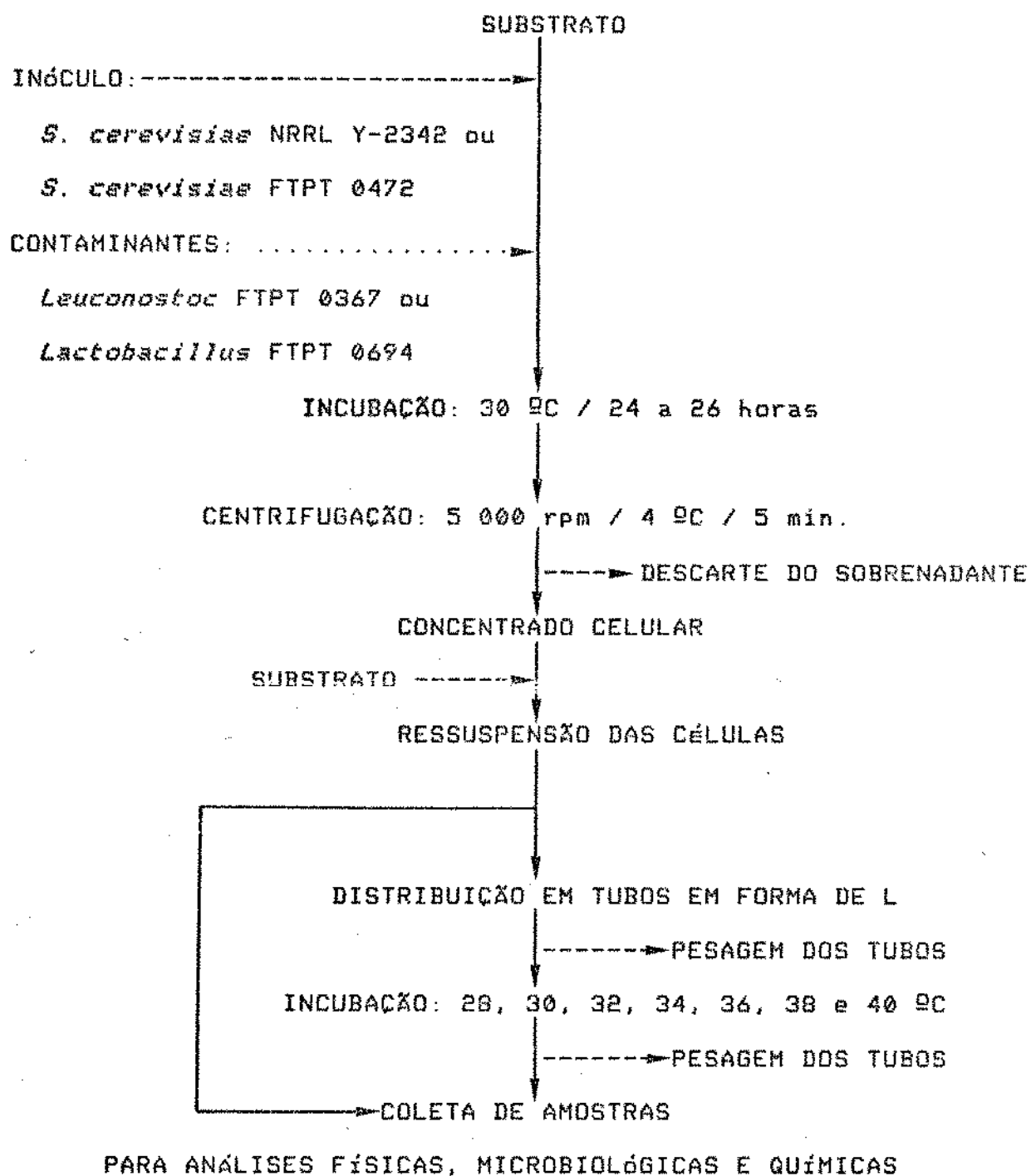


Figura 5. Etapas envolvidas nos experimentos da fermentação alcoólica por leveduras na ausência e na presença de contaminantes.

3.2. Ensaios de Fermentação Alcolólica

O inóculo foi ressuspensão com 130 mL do substrato de caldo de cana descrito no item 3.1. e quantidades de 15 mL foram imediatamente transferidas para tubos em forma de L (17,5 mm de diâmetro x 170 mm de comprimento). Agulhas hipodérmicas foram inseridas nas rolhas de vedação dos tubos (Figura 6) para a liberação do CO₂ produzido durante a fermentação.

Os tubos inoculados com os diferentes microrganismos (Quadro 3) foram incubados sem agitação em um incubador gradiente de temperatura (Scientific Industries Inc., Figura 7) na faixa de 28 a 40 °C, de modo a obter entre cada tubo uma diferença de temperatura de 2 °C.

Quadro 3. Inóculo das fermentações alcoólicas

=====	
ensaios	microrganismos

1	<i>S. cerevisiae</i> NRRL Y-2342
2	<i>S. cerevisiae</i> NRRL Y-2342 e <i>Lactobacillus</i> FTPT0694
3	<i>S. cerevisiae</i> NRRL Y-2342 e <i>Leuconostoc</i> FTPT 0367
4	<i>S. cerevisiae</i> FTPT 0472
5	<i>S. cerevisiae</i> FTPT 0472 e <i>Lactobacillus</i> FTPT 0694
6	<i>S. cerevisiae</i> FTPT 0472 e <i>Leuconostoc</i> FTPT 0367
=====	

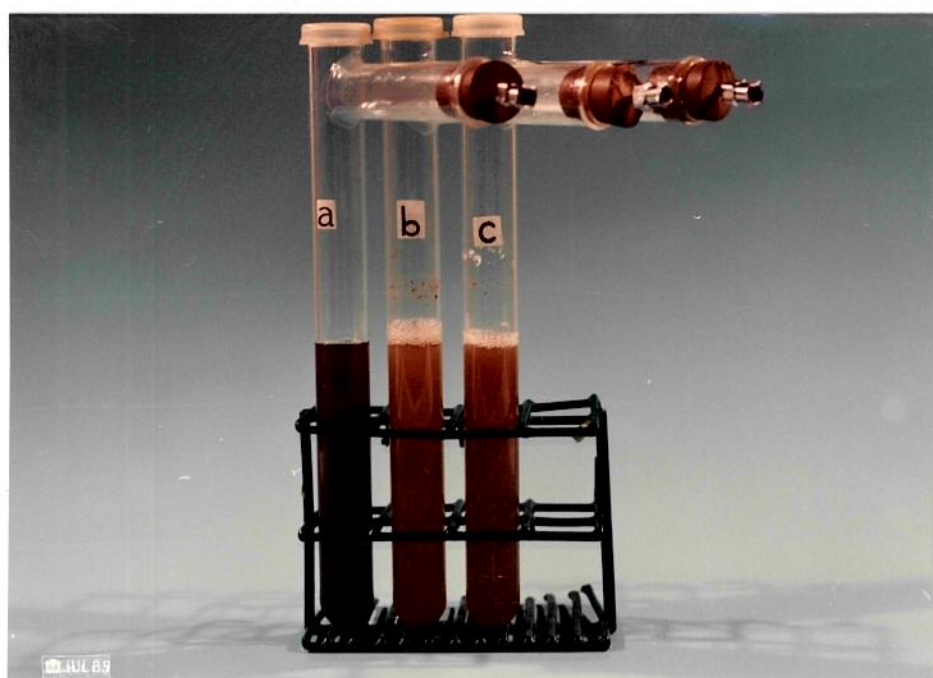


Figura 6. Tubos em forma de L utilizados nos ensaios de fermentação: (a) início da fermentação, (b) final da fermentação por *S. cerevisiae* NRRL Y-2342 e (c) final da fermentação por *S. cerevisiae* FTPT 0472.

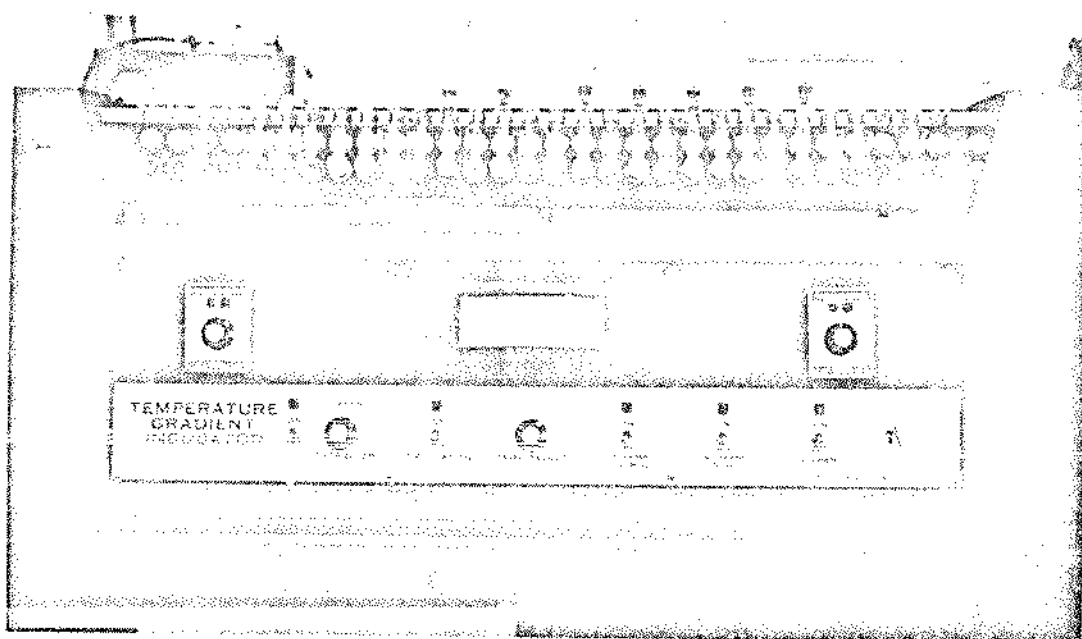


Figura 7. Equipamento (*Scientific Industries Inc.*) utilizado para a incubação dos microrganismos a diferentes temperaturas.

3.3. Análises Microbiológicas, Físicas e Químicas

As análises realizadas para as amostras de substrato inicial (Si) e de substrato fermentado (Sf) foram as seguintes:

3.3.1. Análises Microbiológicas

3.3.1.1. Análise Microscópica de Leveduras - As contagens dos números de células viáveis, mortas e com brotamentos no início e término das fermentações alcoólicas foram efetuadas através da coloração com azul de metileno (LEE *et alii*, 1981) utilizando-se câmara de *Neubauer*.

3.3.1.2. Contagens de Leveduras e Bactérias - As contagens dos números de unidades formadoras de colônias (UFC) foram feitas por plaqueamentos de acordo com a metodologia descrita em ANÔNIMO (1983b). A contagem total de células foi feita por plaqueamento em *Plate Count Agar* (PCA). As leveduras foram contadas nos plaqueamentos feitos em PCA suplementado com 100 µg/mL de tetraciclina e 100 µg/mL de cloranfenicol (PCA+). As bactérias foram contadas nos plaqueamentos em MRS suplementado com 10 µg/mL de actidiona (MRS+).

Antes e após cada fermentação, alíquotas de 10 mL foram centrifugadas a 7 000 rpm e 4 °C por 15 minutos. Os sobrenadantes foram preservados em um congelador para posteriores análises químicas. O precipitado foi utilizado para a determinação da massa celular seca por gravimetria.

3.3.2. Análises Físicas

3.3.2.1. Determinação de CO₂ - Os tubos em L foram pesados em balança semi-analítica, no início e no final de cada fermentação, para medir a perda de massa decorrente da liberação de CO₂ durante a fermentação.

3.3.2.2. Massa Celular Seca - O precipitado foi lavado duas vezes com solução de NH₄OH 4N e posteriormente com água destilada a 4 °C. As células lavadas foram ressuspensas em etanol 95 °GL e transferidas para uma placa de Petri (diâmetro 60 mm) previamente tarada. As células foram submetidas a secagem sucessivas em estufa a 55 °C por 24 horas e estufa a vácuo a 60 °C por 24 horas. Após o resfriamento em dessecador, as placas foram pesadas em balança analítica (THOMPSON *et alii*, 1977).

3.3.3. Análises Químicas

3.3.3.1. Determinação Qualitativa dos Ácidos - A análise qualitativa dos ácidos presentes no substrato inicial e no fermentado foi realizado por cromatografia de camada delgada (CCD). Os padrões e amostras foram previamente neutralizados com sal de cloreto de amônio (BLOCK *et alii*, 1955). Aliquotas de 5 μ L de cada solução foram aplicadas sobre uma placa de sílica *Kieselgel 60G* (Merck) com uma espessura de 250 μ m. A concentração dos padrões utilizados (ácido fórmico e ácido acético) foi de 4,0 mg/mL. As amostras do substrato inicial e do fermentado foram diluídas a 1:1 e 1,0:2,5, respectivamente. O solvente de eluição foi etanol:água:amônia 20 % na proporção de 100:10:10 (BRAUN & SEENEN, 1962).

A revelação do cromatograma foi feita com solução indicadora de pH, com a seguinte formulação: verde de bromocresol 0,3 g, metanol 80 mL e 8 gotas de solução NaOH 30 % para cada 100 mL de revelador (TOUCHSTONE & DOBBINS, 1983). Este revelador foi aspergido sobre as placas eluídas e previamente secas.

3.3.3.2. Determinação dos Açúcares

3.3.3.2.1. Análise Qualitativa - A análise qualitativa dos açúcares presentes no substrato inicial e no fermentado foi realizado por cromatografia de camada delgada (CCD). Quantidades de 5 μ L de padrões de açúcares e amostras foram aplicadas em placa de *Kieselgel 60G* (Merck) com espessura de 250 μ m. As concentrações

ribose 1,0 mg/mL, glicose 2,0 mg/mL, melezitose 2,0 mg/mL, sacarose 2,0 mg/mL e frutose 3,0 mg/mL. Sómente as amostras do substrato inicial foram diluídas com água (1,0:2,5). O eluente utilizado foi clorofórmio:ácido acético:água na proporção de 30:35:5. Após o eluente ter percorrido 15 cm com as amostras, procedeu-se a revelação do cromatograma com a solução preparada da seguinte maneira:

Reagente 1: 1,0 g de difenilamina e 1,0 mL de anilina dissolvidos em 100 mL de acetona.

Reagente 2: ácido fosfórico 85 %.

Os reagentes 1 e 2 foram misturados a uma proporção de 9:1, imediatamente antes do uso (STEFANIS & PONTE, 1968).

Após a aplicação da solução acima por aspersão, a placa foi revelada por aquecimento a 100 °C durante 15 minutos.

3.3.3.2.2. Análise Quantitativa - Os açúcares foram quantificados em duas categorias:-

3.3.3.3.1. Açúcares Redutores - Amostras com teores de 0.1 a 1.0 mg de açúcares foram quantificadas pelo método colorimétrico de MILLER (1959), através da redução do ácido dinitrosalicílico. A curva de calibração foi feita com solução de glicose na faixa de concentração de 0,05 a 1,5 g/L. A leitura foi realizada a $\lambda = 540$ nm no espectrofotômetro (Bausch & Lomb - modelo Spectronic 20).

3.3.3.3.2. Açúcares Totais - Amostras com teores de 1 a 10 mg de açúcar foram previamente tratadas com solução de invertase 1.0 g/L a pH 6,0. Após a incubação a 40 °C por 30 minutos, o produto resultante foi analisado pelo mesmo método descrito no item anterior (3.3.3.3.1). A curva de calibração para esta análise foi feita com solução de sacarose na faixa de concentração de 0,05 a 1,5 g/L e medida colorimetricamente a $\lambda = 540$ nm. Os padrões foram hidrolizados com a enzima invertase, da mesma forma que as amostras.

3.3.3.3. Determinação de Alcool - O teor de etanol foi determinado por cromatografia gasosa (Instrumentos Científicos CG Ltda. - modelo 37B) acoplado um integrador (Instrumentos Científicos CG Ltda. - modelo CG200). A pré-coluna PAD-2499 e coluna PAC-2626 foram utilizadas sob fluxo de gás de arraste (N_2) a 60 mL/min. O intervalo do eletrômetro foi marcado para 10^{-11} A/mV e a chave atenuadora foi fixada em 2. As temperaturas utilizadas foram: vaporizador a 165 °C, coluna a 135 °C e detector de ionização de chama a 162 °C. A curva de calibração foi feita por padronização externa.

3.3.3.4. Determinação do pH - A calibração do potenciômetro foi feita com soluções tampão de fosfato a pH 7,0 e 4,0 a temperatura ambiente. Após esse ajuste, foi determinado o valor do pH das amostras anteriormente congeladas e resfriadas a temperatura ambiente.

4. EFEITO DA TEMPERATURA E DO ETANOL SOBRE O *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*.

O inóculo de *Leuconostoc* e o meio de fermentação foram preparados segundo descrito anteriormente (item 3.1).

Após o cultivo de adaptação do *Leuconostoc* neste meio, o fermentado foi centrifugado a 5 000 rpm e 4 °C por 5 minutos. O precipitado foi ressuspensão em 130 mL de meio de fermentação previamente filtrado em papel *Whatman* nº 1.

As curvas de crescimento do *Leuconostoc* foram obtidas nas seguintes condições:

4.1. Crescimento do *Leuconostoc* a Diversas Temperaturas

Volumes de 15 mL da suspensão de *Leuconostoc* no meio de fermentação foram distribuídos em 7 tubos em forma de L (Figura 5). A incubação foi feita a um gradiente de temperatura na faixa de 28 a 40 °C.

4.2. Crescimento do *Leuconostoc* a Diversas Concentrações de Etanol

A influência do etanol sobre o *Leuconostoc* foi observada através do crescimento da bactéria em meio de fermentação acrescido de etanol na faixa de concentração de 0 a 9 % (v/v). A incubação foi feita em banho maria a 30 °C, em cubetas previamente desinfetadas com álcool etílico 70 %. O crescimento da bactéria

foi monitorado por leituras de absorvância em um espectrofotômetro (Bausch & Lomb - modelo Spectronic 20), $\lambda = 600$ nm, a intervalos de 30 minutos.

Da mesma forma, foi realizado também, leituras de crescimento de *Leuconostoc* em caldo contendo: triptona 1,5 % (p/v), extrato de levedura 0,9 % (p/v) e glicose 0,5% (p/v).

A determinação da população inicial de bactéria foi feita através de plaqueamento em MRSA+ (ANÔNIMO, 1983b), no início de cada experimento.

5. RELAÇÃO DA CONTAGEM DE *S. cerevisiae* NRRL Y-2342 E DE *Leuconostoc* DURANTE A FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA

O preparo do inóculo e o meio de fermentação utilizado neste ensaio foi feito conforme descrito no item 3.1.. A fermentação foi feita em erlenmeyer de 250 mL contendo 130 mL do meio de fermentação, à 30 °C. Foram coletados 1,1 mL de amostra, a intervalos de tempo, para a realização das análises microbiológicas conforme foram descritas no item 3.3.1.

RESULTADOS & DISCUSSÃO

1. IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS LÁTICAS

As bactérias isoladas, FTPT 0367 e FTPT 0694, apresentaram as características relevantes de bactérias lácticas de acordo com HARRIGAN & Mc CANCE (1973) e INGRAM (1975): colônias com forma circular, bordas lisas, elevação convexa, coloração branca a translúcida, de aspecto viscoso a leitoso com tamanho de aproximadamente um milímetro (FTPT 0367) ou três milímetros (FTPT 0694); morfologia das células com forma de coco-bacilos (FTPT 0367) ou bastonetes (FTPT 0694); reação *Gram* positiva; ausência de esporos e testes de: catalase, motilidade, gelatinase e hidrólise de amido negativos.

Os resultados obtidos dos testes mencionados no Quadro 2 para a identificação das bactérias estão indicados na Tabela 1.

De acordo com estes dados e o esquema da Figura 2, o isolado FTPT 0367 pode ser identificado como bactéria do gênero *Leuconostoc* por apresentar morfologia celular em forma de coco-bacilos, divisão das células em um plano (Figura 8a), produção de CO₂ a partir de glicose, não alteração no *litmus milk* e não apresentar arginina desaminase.

Segundo a chave de utilização dos carboidratos pelos leuconostóques, indicada na Figura 3, e as análises adicionais das características do isolado FTPT 0367 a diversas condições de cultivo (Tabela 1), ele foi identificado como *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* por apresentar principalmente as características de produção de goma a partir de sacarose e de ácido a partir de arabinose. Esta última característica o distingue do *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* e *Lactobacillus confusus*, que possuem morfologia celular e testes bioquímicos similares ao *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (SHARPE et alii, 1972 e GARVIE, 1975), mas são incapazes de fermentar a arabinose (GARVIE, 1986 e KANDLER & WEISS, 1986).

Embora o *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *paramesenteroides* seja muito similar ao *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, o primeiro não possui a capacidade de produzir goma (GARVIE, 1984 e 1986).

O *L. oenos* e o *L. mesenteroides* possuem a capacidade de realizar a fermentação malolática em vinhos. Porém, a subespécie *mesenteroides* não é utilizada neste processo, por não apresentar crescimento a baixos pH e a altas concentrações de etanol (GARVIE, 1984). Por não apresentar crescimento à concentração de 10 % (v/v), o isolado FTPT 0367 tem reforçado a sua identificação como *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*.

Tabela 1. Resultados dos testes realizados para identificação das bactérias lácticas.

=====			
número da bactéria isolada	FTPT 0367	FTPT 0694	
morfologia da célula	coco-bacilos	bastonetes	
crescimento em caldo	turvo homogêneo	turvo com sedimento	
dimensão da célula	0,8-1,0 µm	0,5 x 1,5-2,0 µm	
divisão em um plano	+	+	
reação em <i>litmus milk</i>	I	ARC	
produção de CO ₂ a partir de glicose	+	+	
produção de NH ₃ a partir de arginina	-	-	
produção de goma a partir de sacarose	+	+	
produção de ácido a partir de:			
L-arabinose	+	±	
celobiose	-	+	
esculina	-	+	
frutose	+	+	
galactose	+	+	
glicose	+	+	
lactose	-	+	
maltose	+	+	
manitol	-	±	
manose	-	+	
melezitose	nd	+	
rafinose	±	±	
raminose	-	±	
ribose	-	+	
salicina	-	+	
sacarose	+	+	
sorbitol	-	+	
trealose	+	+	
xilose	-	±	
crescimento a:			
15 °C	+	+	
37 °C	+	+	
45 °C	-	+	
cloreto de sódio 3.0 %	+	+	
cloreto de sódio 6.5 %	-	+	
cloreto de sódio 7.0 %	-	-	
etanol 5 %	+	+	
etanol 10 %	-	+	
etanol 15 %	-	±	
=====			

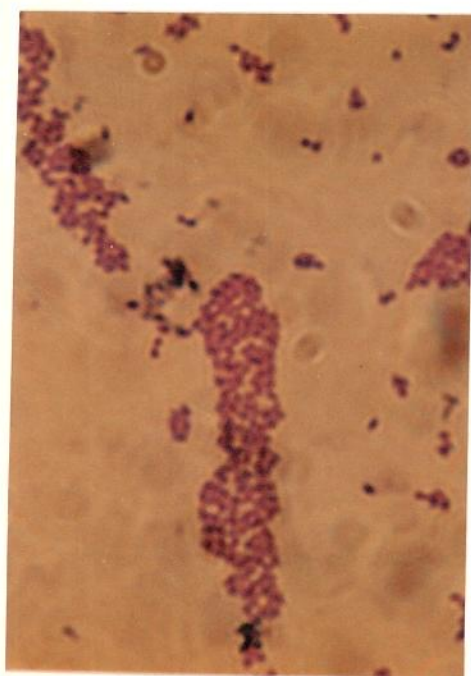
+ resultado positivo
 - resultado negativo
 ± resultado ligeiramente positivo
 nd não determinado
 I inalterado (levemente ácido)
 ARC acidificação, redução e coagulação

O outro isolado, FTPT 0694, pode ser identificado como pertencente ao gênero *Lactobacillus* por ter apresentado as seguintes características: células em forma de bastonetes, divisão celular em um plano (Figura 8b), produção de gás a partir de glicose e capacidade de acidificar, reduzir e coagular o *litmus milk* que condizem com o esquema da Figura 2.

A Figura 8b ilustra também as células da cultura FTPT 0694 que apresenta algumas estruturas filamentosas.

Os testes de produção de ácido a partir de açúcares (Tabela 1) foram positivos, sendo que arabinose, rafinose, raminose e xilose apresentaram alterações fracas na mudança do pH do meio. Comparando esses resultados com os dados de KANDLER & WEISS (1986) pode-se notar maior similaridade com o *L. fermentum* (Figura 4). Embora este não seja produtor de ácido a partir de esculina, manitol, melezitose, raminose, salicina e sorbitol. Além disso, a bactéria em análise não apresentou resultados concordantes com dois importantes testes indicados para a sua identificação: produção de NH_3 a partir da arginina e a não ocorrência de crescimento a 15 °C.

No entanto, com referência a outras características, como o *habitat* (isolados de material fermentado e de leveduras), crescimento a alta temperatura (45 °C) e dimensão da célula (0,5 x 1,5-2,0 μm), o isolado FTPT 0694 se assemelha ao *L. fermentum*, de acordo com a descrição de KANDLER & WEISS (1986).



(a)



(b)

Figura 8. Microfotografias das bactérias lácticas utilizadas como contaminantes nos experimentos de fermentação:

(a) *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FTPT 0367 e (b) *Lactobacillus fermentum* FTPT 0694.

Aumento de 3600 vezes.

Por ter sido isolado de mosto fermentado com sérios problemas de formação de goma (canjiquinha), o isolado FTPT 0694 pode ter alterado algumas de suas características para a melhor adaptação a este meio.

O isolado FTPT 0694 assemelha-se ao *L. frutivorans* (*L. heterohiochii*) e *L. homohiochii* por apresentar característica de tolerância a altas concentrações de etanol (10-15 %) (INGRAM, & BUTTKE, 1984). Por outro lado, o isolado FTPT 0694 difere destas bactérias por fermentar vários carboidratos enquanto que *L. frutivorans* e *L. homohiochii* fermentam um reduzido número de açúcares (KANDLER & WEISS, 1986).

A confirmação definitiva de que o isolado FTPT 0694 é *Lactobacillus fermentum* poderia ser obtida por análises de quimiotaixonomia e/ou porcentagem de G + C. Entre os lactobacilos heterofermentativos obrigatórios, apenas o *L. fermentum* possui ornitina no peptidoglicano da parede celular e alta porcentagem de G + C (58-54 %) (KANDLER & WEISS, 1986).

2. FERMENTAÇÕES ALCÓOLICAS

2.1. Características do Substrato Inicial (Si)

Os valores de pH e dos açúcares dos substratos inicial estão indicados na Tabela 2. Os ensaios das fermentações foram conduzidos em substratos a pHs próximos de 4,5. De acordo com CAMHI (1979), JONES *et alii* (1981) e KEIM (1983) o desenvolvimento da maioria das leveduras é favorecido a pH ao redor de 4,5. O teor de açúcar no início das fermentações se situou ao redor de 120 g/L, ou seja, em níveis de substrato não inibitórios. De acordo com ESSER & SCHMIDT (1982) concentrações de açúcar na faixa de 3,5 a 150 g/L favorecem a produção de etanol.

Tabela 2. Características do substrato inicial

ensaio*	pH	teor de açúcares (g/L)	
		totais	redutores
1	4,56	125,3	45,2
2	4,58	120,0	37,0
3	4,49	142,1	39,1
4	4,51	121,8	42,1
5	4,22	124,1	43,1
6	4,34	129,9	49,4

* vide Material & Métodos, Quadro 3, p. 44.

2.2. Características do Inóculo

As características de viabilidade, morte e brotamento das leveduras inoculadas nos diferentes ensaios de fermentação estão indicadas na Figura 9 e Tabela 1 do Apêndice.

Os dados indicam alta porcentagem de viabilidade de leveduras (acima de 97 %) sendo que aproximadamente 10 a 20 % apresentaram célula com brotamento.

A quantidade de inóculo de leveduras utilizada nos ensaios foi na ordem de 10^8 UFC/mL e de contaminantes foi em torno de 10^7 UFC/mL (Figura 10).

Através de um extenso levantamento microbiológico das amostras coletadas em diversas etapas da produção de álcool das usinas durante a safra de 82/83, a Coordenadoria de Processos da COPERSUCAR observou que para obter boa condução na fermentação alcoólica, níveis de leveduras superiores a 10^8 UFC/mL e contaminantes inferiores a 10^6 UFC/mL devem ser mantidos nas dornas de fermentação (ANÔNIMO, 1983a).

Assim, o teor de leveduras nestes experimentos foi fixado dentro dos valores estabelecidos pela COPERSUCAR. Entretanto, o nível de bactérias foi superior ao recomendado com o intuito de simular uma fermentação contaminada.

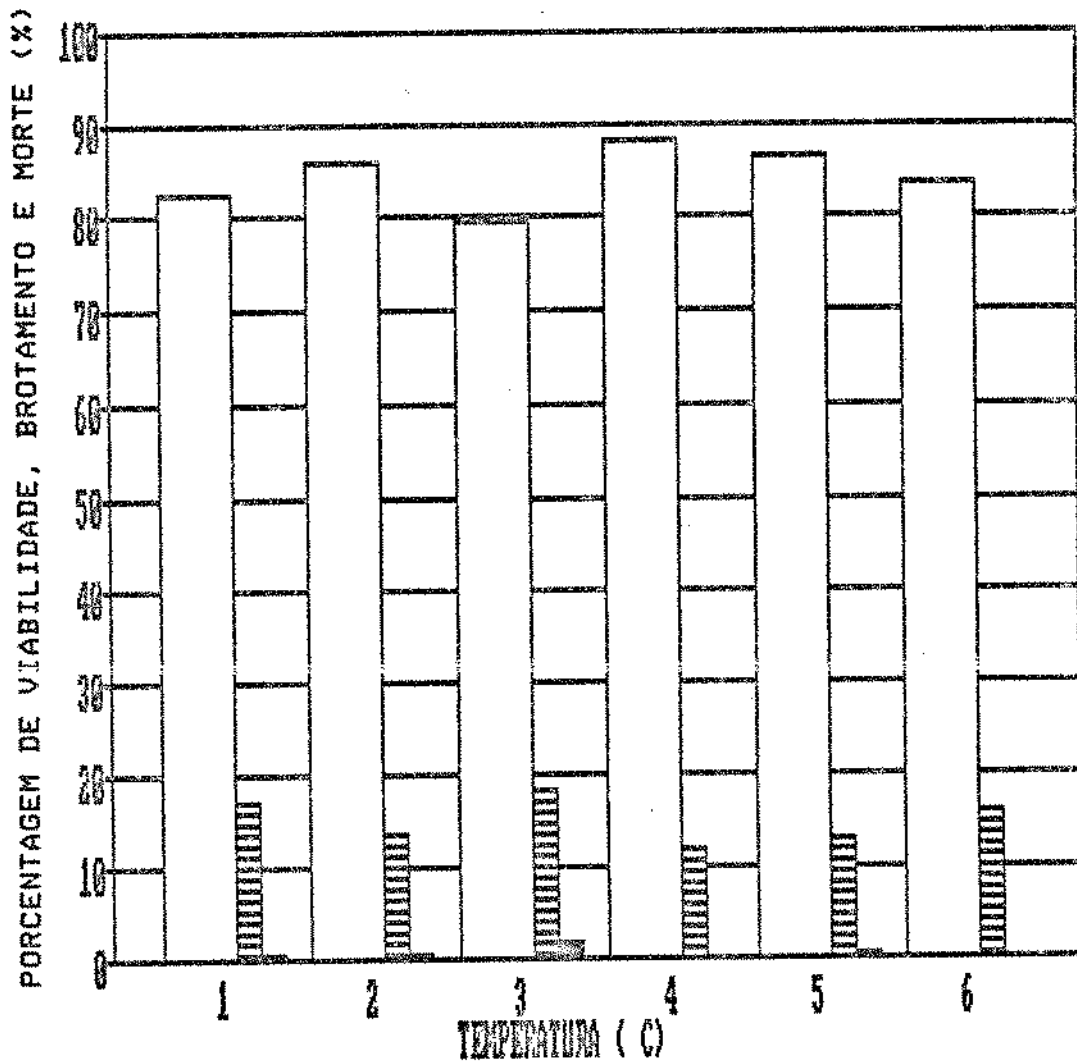


Figura 9. Características de viabilidade, brotamento e morte das leveduras no início das fermentações: (1) NRRL Y-2342, (2) NRRL Y-2342 + *Lactobacillus*, (3) NRRL Y-2342 + *Leuconostoc*, (4) FTPT 0472, (5) FTPT 0472 + *Lactobacillus*, (6) FTPT 0472 + *Leuconostoc*, (□) levedura viável, (▨) com brotamento e (■) morta.

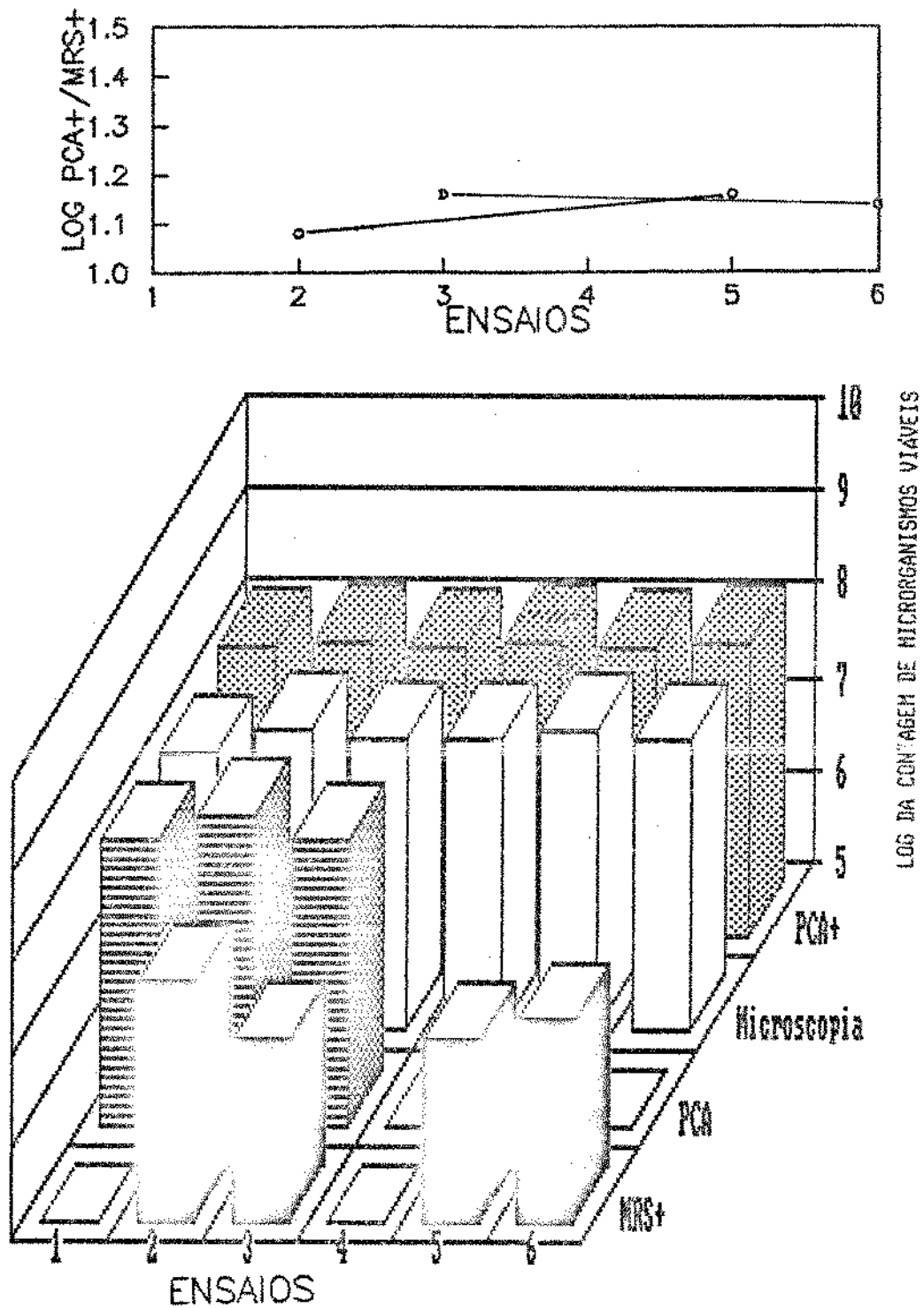


Figura 10. Microorganismos viáveis no início das fermentações: (▨) contagem total em PCA, (▤) contagem de leveduras em PCA+, (□) microscopia e (▩) contagem de bactérias em MRS+. Ensaio 1 e 4 cultura pura, 2 e 5 presença de *Lactobacillus* e 3 e 6 presença de *Leuconostoc*.

A massa celular seca do inóculo de *S. cerevisiae* NRRL Y-2342 e FTPT 0472 foi em média de 4,0 e 6,0 g/L, respectivamente (Tabela 3). Embora estes valores não reflitam o valor real da massa celular seca, devido à presença de precipitados formados durante a esterilização do caldo de cana, os resultados indicam que a linhagem FTPT 0472 produz mais biomassa que a linhagem NRRL Y-2342.

Tabela 3. Valores de massa celular seca dos inóculos

=====	
ensaio	massa celular seca (g/L)

1	4,20
2	4,55
3	3,84
4	6,62
5	5,89
6	5,96
=====	

2.3. Tempo de Fermentação

A conversão do açúcar a etanol pelo processo de *Melle-Bainot* decorre em um tempo variável entre 8 e 18 horas (LOPES, 1985). Assim, os valores de tempo adotados como término de fermentação para ambas as linhagens (NRRL Y-2342 e FTPT 0472) ficaram na faixa de 14 a 17 horas, nas diferentes temperaturas utilizadas (Tabela 4).

Tabela 4. Relação da temperatura e do tempo de fermentação

=====	
temperatura (°C)	tempo de fermentação (h)

28	17,0
30	16,0
32	15,5
34	15,0
36	14,0
38	14,0
40	16,0
=====	

2.4. Análises dos Microrganismos no Término das Fermentações

2.4.1. Características de Viabilidade, Morte e Brotamento das Leveduras

As características de viabilidade, morte e brotamento das leveduras, em termos percentuais após o término das fermentações alcoólicas pelas linhagens NRRL Y-2342 e FTPT 0472 encontram-se representadas na Figura 11 e Tabelas 2 a 7 do Apêndice.

Esses resultados indicam que apenas a 40 °C a porcentagem de leveduras mortas foi significativa, sendo que a morte foi mais acentuada no ensaio com *S. cerevisiae* NRRL Y-2342 realizado na presença de *Leuconostoc* e nos ensaios com *S. cerevisiae* FTPT 0472 na presença de ambos os contaminantes.

Dependendo da fase de crescimento em que as células de leveduras se encontram, estas podem apresentar maior ou menor resistência térmica. Segundo VAN UDEN (1984) as células de leveduras na fase estacionária apresentam maior resistência térmica do que as células em crescimento exponencial.

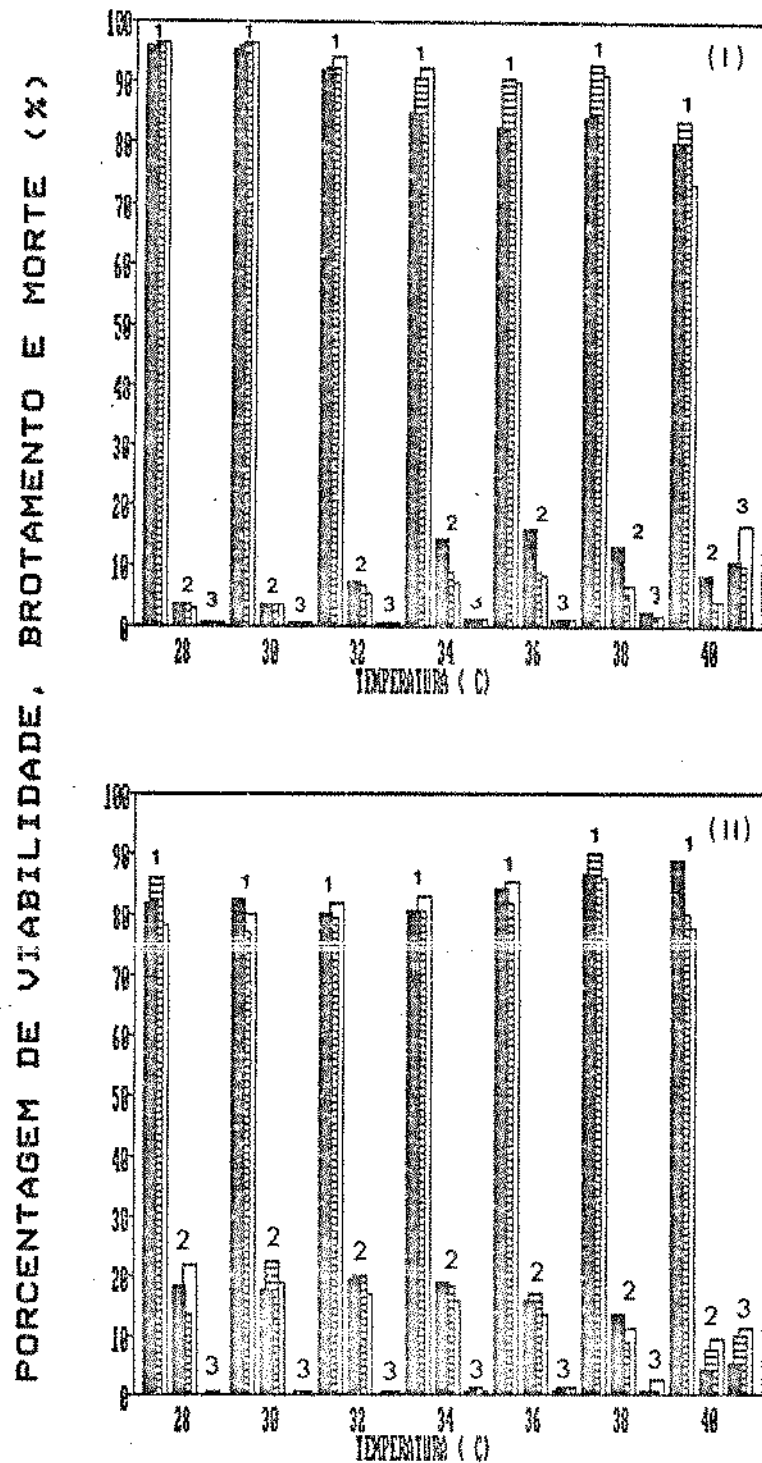


Figura 11. Características de viabilidade, brotamento e morte das leveduras após o término das fermentações: (I) *S. cerevisiae* NRRL Y-2342, (II) *S. cerevisiae* FTPT 0472, (■) cultura pura, (▨) presença de *Lactobacillus*, (□) presença de *Leuconostoc*, (1) levedura viável, (2) com brotamento e (3) levedura morta.

A porcentagem de células de leveduras com brotamento obtida nas diferentes temperaturas da Figura 11, estão plotados na Figura 12. Os valores máximos de células com brotamento obtidos na *S. cerevisiae* NRRL Y-2342 ocorreram a 34 e 36 °C. Observa-se também, que no ensaio da fermentação alcoólica realizada na presença de contaminantes, os valores máximos de células com brotamento foram inferiores àqueles obtidos nas fermentações realizadas na ausência de contaminantes (Figura 12-I). Isto indica que a presença de contaminantes afeta adversamente o desenvolvimento do *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-2342.

Nos ensaios de fermentação por *S. cerevisiae* FTPT 0472 os valores máximos de brotamento foram obtidos na faixa de temperatura entre 28 e 32 °C (Figura 12-II). Esses valores máximos foram maiores do que os obtidos com o *S. cerevisiae* NRRL Y-2342 e não apresentaram diferenças significativas entre os ensaios realizados na presença ou na ausência de contaminantes.

Os resultados obtidos contrariam os de AMORIM *et alii* (1985) que indicam que o aumento da temperatura (no intervalo de 33-38 °C) implica concomitantemente num acréscimo de brotamento das leveduras.

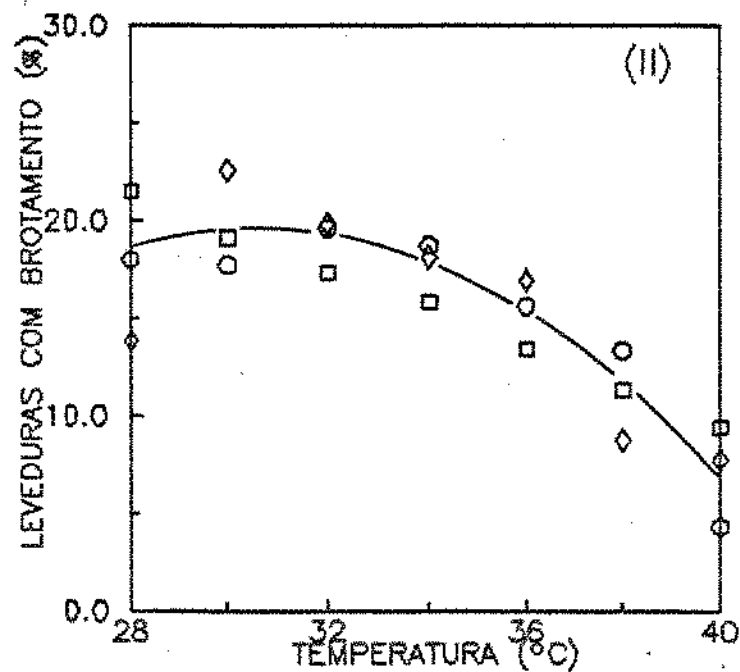
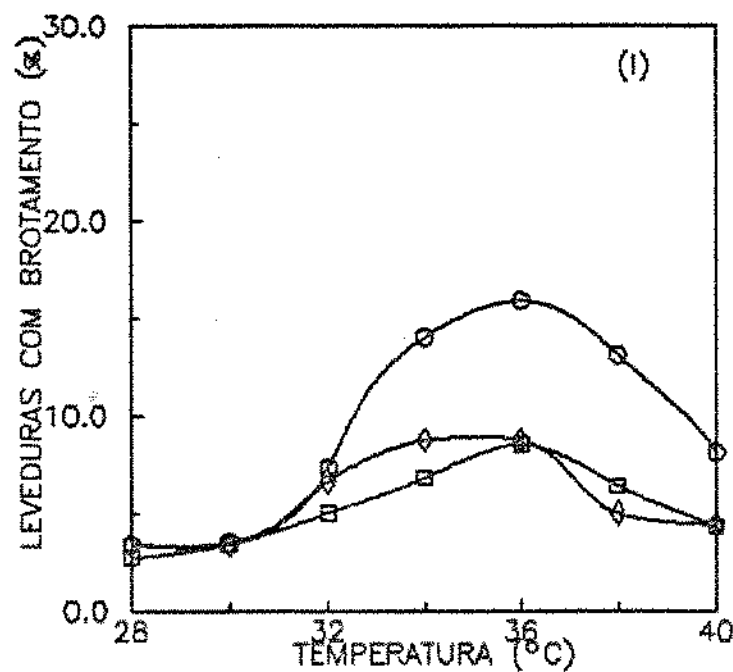


Figura 12. Viabilidade de brotamento das leveduras após o término das fermentações alcoólicas. (I) *S. cerevisiae* NRRL Y-2342, (II) *S. cerevisiae* FTPT 0472, (○) cultura pura, (◇) presença de *Lactobacillus* e (□) presença de *Leuconostoc*.

2.4.2. Concentração dos Microrganismos

Os resultados das contagens de *S. cerevisiae* NRRL Y-2342 e de bactérias lácticas após o término das fermentações (ensaios 1 a 3) estão indicados na Figura 13-I. A contagem de células totais e a de leveduras viáveis feita por plaqueamento apresentaram valores semelhantes. Isto era de se esperar, pois a concentração de leveduras utilizada no experimento foi aproximadamente dez vezes maior que a concentração de bactérias. Nota-se também, que os antibióticos (cloranfenicol e tetraciclina) adicionados na quantidade de 100 µg/mL ao meio PCA para a contagem de leveduras não acarretaram inibição no desenvolvimento das leveduras. Isto pode ser confirmado através dos dados obtidos no ensaio da fermentação alcoólica com cultura pura (Figura 13-Ia), onde os plaqueamentos com e sem antibióticos resultaram em valores próximos. Assim, as contagens de células totais foram excluídas dos outros ensaios de fermentação (ensaios 4 a 6).

Os dados dos ensaios 4 a 6 representam os resultados das contagens de *S. cerevisiae* FTPT 0472 e de bactérias lácticas após o término das fermentações alcoólicas (Figura 13-II).

As contagens de leveduras obtidas por plaqueamento e microscopia apresentaram valores semelhantes. Isto indica que não ocorreu floculação ou aglomeração de células na fermentação.

Como indicado na Figura 13-Ib, os resultados das contagens de *Lactobacillus* no final das fermentações por *S. cerevisiae* NRRL Y-2342 foram praticamente iguais nas diferentes temperaturas utilizadas, com exceção a 40 °C. Nota-se que a concentração final de *Lactobacillus* aumentou ligeiramente. Por outro lado, a concentração de *Lactobacillus* decaiu cerca de 10 % nas fermentações por *S. cerevisiae* FTPT 0472 a temperaturas de 34 a 38 °C e nas demais temperaturas, se mantiveram praticamente constante (Figura 13-IIb). Entretanto, a razão do logarítmo da contagem de leveduras e de *Lactobacillus* entre o início e término das fermentações apresentaram valores praticamente constantes ao redor de 1,0 a 1,3 (Figuras 10 e 13-b).

Já os resultados das contagens de *Leuconostoc* (Figura 13-c) indicam que o microrganismo não sobreviveu até o final das fermentações. A ausência de *Leuconostoc* tem sido notada também em amostras de mosto fermentado onde o substrato inicial sofreu algum tratamento térmico (RODINI, 1985) ou ácido (pH 2,5) (KAJI & CANHOS, 1986).

Os dados confirmam os resultados obtidos por TILBURY (1975) onde os números de *Leuconostoc* ficaram reduzidos e os de *Lactobacillus* prevaleceram após 5 dias de incubação em caldo de cana, em condições naturais.

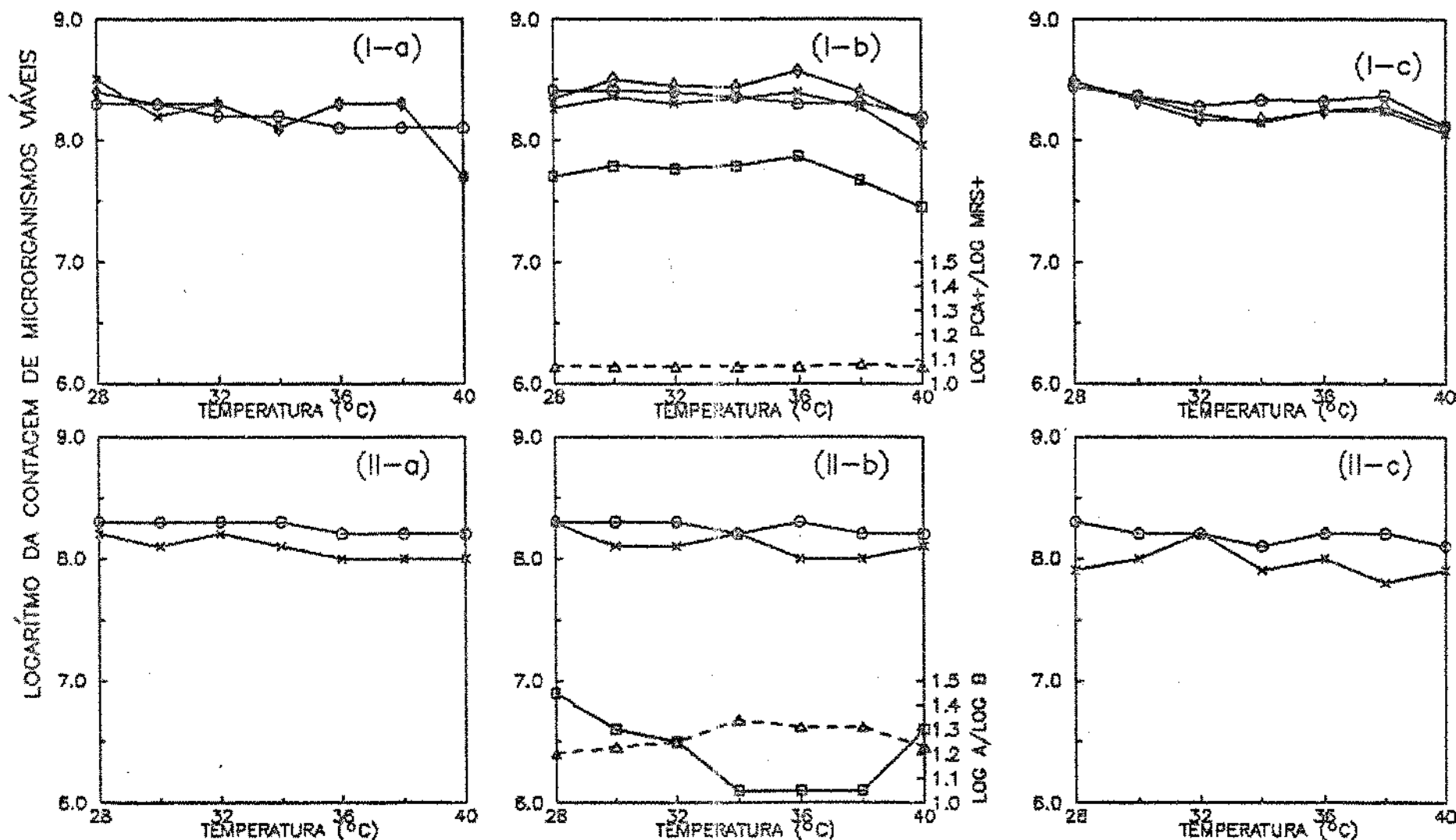


Figura 13. Células viáveis após o término das fermentações. (I) *S. cerevisiae* NRRL Y-2342, (II) *S. cerevisiae* FTPT 0472, (a) cultura pura, (b) presença de *Lactobacillus* e (c) presença de *Leuconostoc*. Contagem: (○) total em PCA (x) leveduras em PCA+, (o) microscopia, (□) bactérias em MRS+, (Δ) LOG PCA+/LOG MRS+. OBS.: Não foram detectadas *Leuconostoc* sobreviventes.

De acordo com YOKOYA *et alii* (1986) o cultivo de *Leuconostoc* em quantidades iniciais de até 30 vezes a de *Saccharomyces* sp L-5 em meio contendo sacarose 20 %, sais minerais e vitaminas; não puderam ser recuperadas no 7º dia de incubação, sendo que já no 3º dia a proporção de leveduras e bactérias apresentou um valor 10 vezes superior ao do inicial. Entretanto, as células de *Lactobacillus* incubadas nas mesmas condições, puderam ser recuperadas e apresentaram um crescimento durante o período. Ainda no mesmo trabalho, em experimentos onde o número de contaminantes inicial foi por volta de 4 vezes maior do que o número de leveduras, os autores mostraram que após 3 dias de incubação o número de leveduras ultrapassou o de contaminantes e no sétimo dia o número de *Lactobacillus* voltou a superar o de leveduras, enquanto que a presença de *Leuconostoc* não pode ser detectado.

MUNDT & HAMMER (1966) notaram também alterações na porcentagem de distribuição populacional em uma cultura mista de *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus* e *Lactobacillus fermentum* quando cultivadas em meio Rogosa SL (Difco) com e sem a adição de 7 % de etanol. Na ausência de etanol, a população de *L. mesenteroides*, *Pediococcus* e *L. fermentum* ficou distribuída em 82, 13 e 4 %, respectivamente. Porém, a adição de etanol ao meio propiciou a predominância de *L. fermentum* com uma drástica redução na população de *L. mesenteroides*, enquanto que a de *Pediococcus* permaneceu constante.

2.4.3. Densidade Celular

Apesar dos inóculos das duas leveduras terem sido praticamente iguais (Figura 10) e ambas as linhagens possuírem dimensões semelhantes (3,0-4,0 μm de largura por 4,0-5,0 μm de comprimento), o incremento de massa celular seca da linhagem FTPT 0472 foi superior ao da NRRL Y-2342, em todos os ensaios, exceto nas temperaturas mais altas (38 e 40 $^{\circ}\text{C}$) (Figura 14).

O incremento da massa celular seca apresentou valores menores com o aumento gradual da temperatura, ficando ainda mais acentuado nas fermentações realizadas com a linhagem FTPT 0472. Isto indica que temperaturas elevadas afetam adversamente a reprodução das leveduras em estudo e confirmam os dados da Figura 11 onde aparece uma alta porcentagem de células mortas à temperatura mais elevada quando comparada às outras temperaturas, no final de cada fermentação.

Segundo ESSER & SCHMIDT (1982) fermentações realizadas à temperatura acima de 40 $^{\circ}\text{C}$ inibem o crescimento da levedura e a produção de etanol.

Temperaturas na faixa de 28 a 32 $^{\circ}\text{C}$ favoreceram a reprodução das leveduras e conseqüentemente a produção de massa celular.

Nota-se também (Figura 14), que nos ensaios realizados na presença de *Lactobacillus* o incremento da massa celular seca foi geralmente superior ao obtido com a cultura pura. Isto pode ser devido à produção de polímeros pelas bactérias ou à ocorrência de simbiose benéfica para o crescimento da levedura (por exemplo, a produção bacteriana de vitaminas ou compostos que favorecem o crescimento da levedura).

A presença de *Leuconostoc* favoreceu também o aumento da massa celular seca da linhagem NRRL Y-2342 quando comparada à fermentação com cultura pura ou na presença de *Lactobacillus*. Porém, a 40 °C o incremento de massa celular seca foi ligeiramente inferior à obtida com a cultura contaminada com *Lactobacillus* (Figura 14-I).

Já nos ensaios de fermentação alcoólica por *S. cerevisiae* FTPT 0472 não houve diferenças significativas nos resultados obtidos na presença ou ausência de *Leuconostoc*, indicando que ele pouco influi sobre esta linhagem (Figura 14-II).

Os valores de massa celular seca após o término de cada fermentação estão indicadas na Figura 18-a.

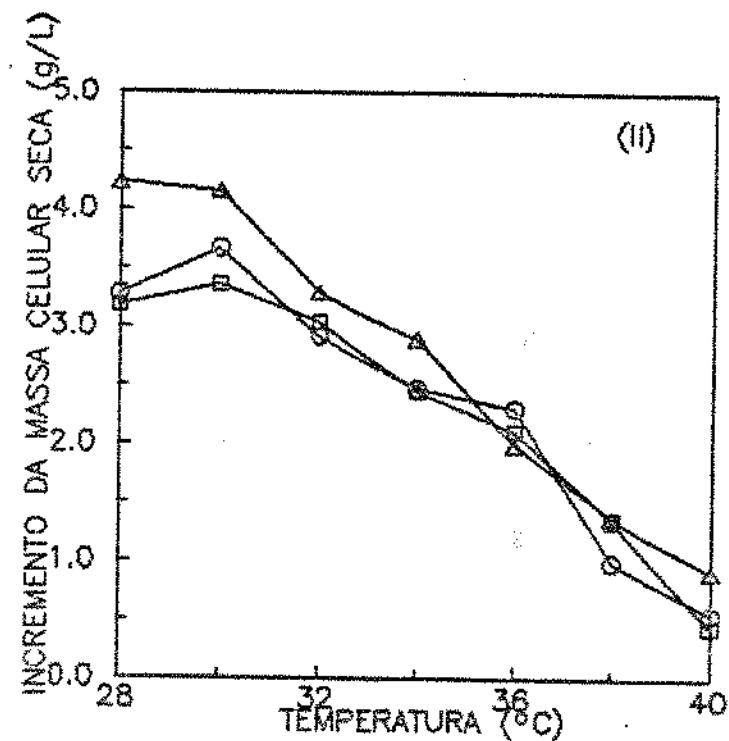
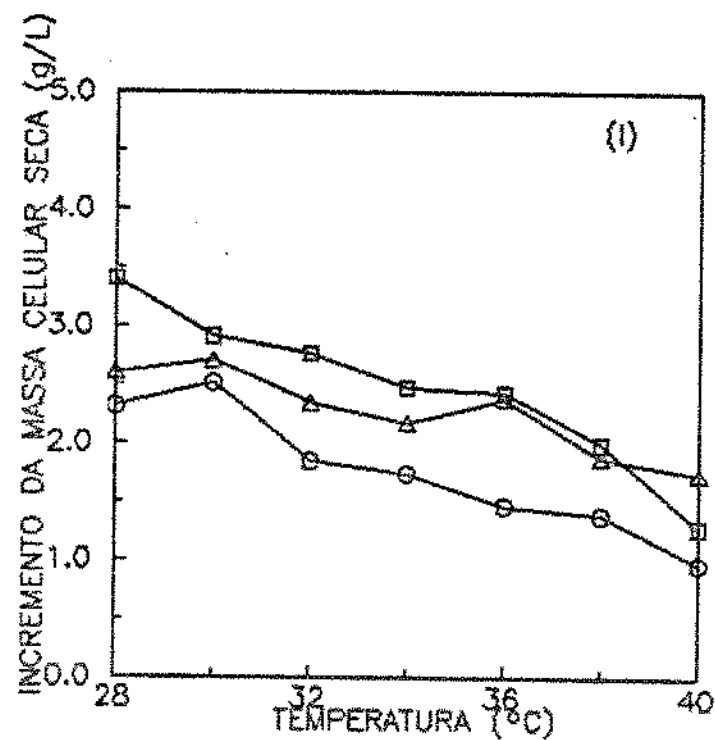


Figura 14. Incremento da massa celular seca após o término das fermentações alcoólicas. (I) *S. cerevisiae* NRRL Y-2342, (II) *S. cerevisiae* FTPT 0472, (O) cultura pura, (Δ) presença de *Lactobacillus* e (□) presença de *Leuconostoc*.

2.5. Valores de pH

Em geral, os valores de pH das amostras fermentadas se mantiveram praticamente constantes dentro de um mesmo ensaio, na faixa de temperaturas 28 a 38 °C (Figura 15). A 40 °C, houve menor redução de pH, provavelmente devido à estagnação na reprodução ou à autólise das leveduras com a concomitante liberação de compostos aminados. Como foi visto anteriormente, os valores de viabilidade de leveduras (Figura 11) e de massa celular seca (Figura 14) ficaram menores a 40 °C. Portanto, é de se supor a existência da relação direta entre o desenvolvimento da levedura e a produção de ácido, nas condições do ensaio. Segundo DOMBEK & INGRAM (1987), a acidez produzida pelas leveduras não é o fator principal de sua morte nas fermentações alcoólicas, pois o pH intracelular se mantém constante independentemente da quantidade de ácidos orgânicos extracelulares produzidas pela mesma.

Os valores de pH após o término das fermentações alcoólicas por *S. cerevisiae* FTPT 0472 foram menores que os obtidos pela fermentação por *S. cerevisiae* NRRL Y-2342, em todas as temperaturas. Além disso, não houve diferenças significativas entre os ensaios com cultura pura e cultura contaminada (Figura 15-II). Porém, nos ensaios com a linhagem NRRL Y-2342, os patamares de pH foram diferentes para as três situações: o patamar da curva do ensaio contaminado com o *Lactobacillus* ficou a um pH mais elevado seguido da cultura pura e da contaminada com o *Leuconostoc* a patamares mais baixos (Figura 15-I).

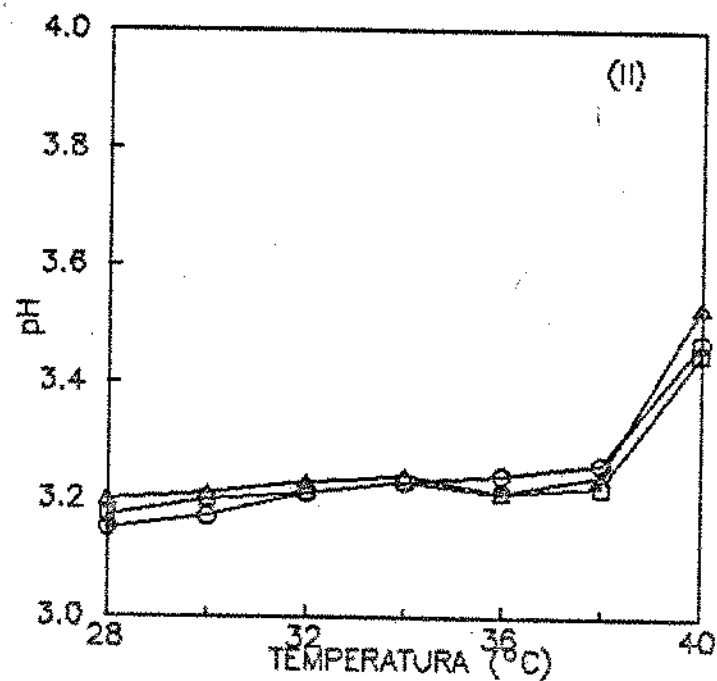
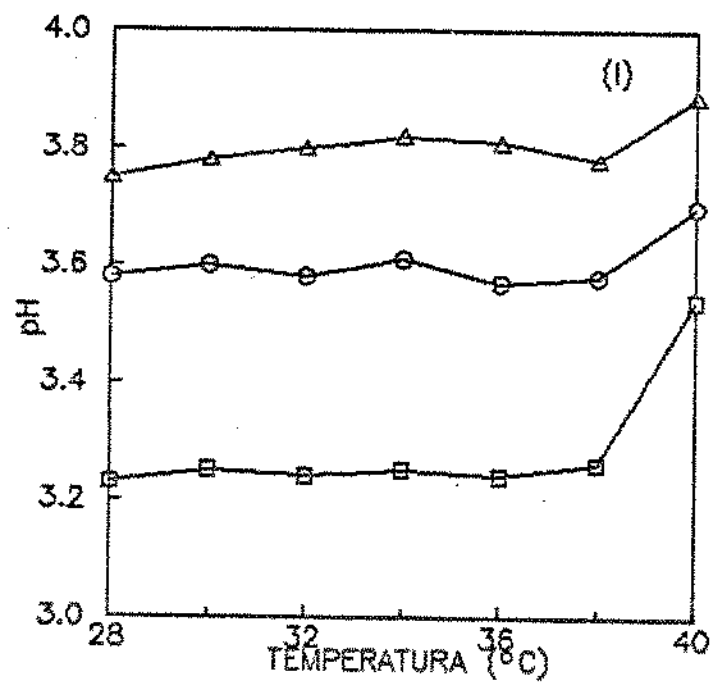


Figura 15. Valores de pH após o término das fermentações alcoólicas.
 (I) *S. cerevisiae* NRRL Y-2342, (II) *S. cerevisiae* FTPT 0472, (○) cultura pura, (△) presença de *Lactobacillus* e (□) presença de *Leuconostoc*.

Isto indica que nem sempre o baixo valor de pH do meio fermentativo pode ser associado com a presença de bactérias lácticas, apesar destas produzirem geralmente ácidos orgânicos.

Diversos fatores podem estar associados aos patamares de pH obtidos, tais como, produção de metabólitos e o transporte de íons H^+ através da membrana celular. No caso do *Leuconostoc*, ele pode ter afetado a levedura indiretamente, produzindo grandes quantidades de ácidos no início da fermentação, e assim, ter promovido certa toxicidade à levedura. Os dados da Figura 12, mostrados anteriormente, reforçam a idéia de que estes contaminantes afetam o desenvolvimento da linhagem NRRL Y-2342 e pouco influem na linhagem FTPT 0472.

2.6. Análise Qualitativa dos Ácidos

Embora o sistema de solvente EtOH:H₂O:NH₃ 25 x (100:12:16) não tenha possibilitado uma nítida separação quantitativa do ácido fórmico (R_f 0,76) e do ácido acético (R_f 0,75), pode-se concluir pela Figura 16, que os valores obtidos nas amostras fermentadas foram praticamente o dobro daqueles obtidos nos substratos, ou seja, a produção de ácidos foi por volta de 4 g/L, em todos os ensaios. Estes valores foram aproximadamente 10 vezes maiores que os obtidos por FINGUERUT *et alii* (1985).

O ácido láctico é citado como um dos subprodutos da fermentação alcoólica (PHAFF *et alii*, 1966 e FINGUERUT *et alii*, 1985). A cada 100 Kg de etanol produzido pelas usinas cooperadas a COPERSUCAR, são produzidos 1,53 Kg de ácido láctico, reduzindo deste modo a quantidade equivalente de álcool (FINGUERUT *et alii*, 1985).

Sob este aspecto, era de se esperar que houvesse quantidades mínimas de aproximadamente 0,6 g/L de ácido láctico no caldo fermentado, ou seja, 0.003 mg na alíquota aplicada à placa. Com a revelação não foi possível detectar o ácido láctico produzido pela levedura e nem pelos contaminantes, o que indica que o método utilizado não foi sensível o suficiente para a detecção deste produto metabólico. Embora, esta técnica não tenha fornecido dados quantitativos, é de supor que se os contaminantes produziram os diferentes tipos de ácidos, estes teriam valores ínfimos, pois não houve nenhuma diferença nos ácidos detectados na fermentação por cultura pura e a contaminada.

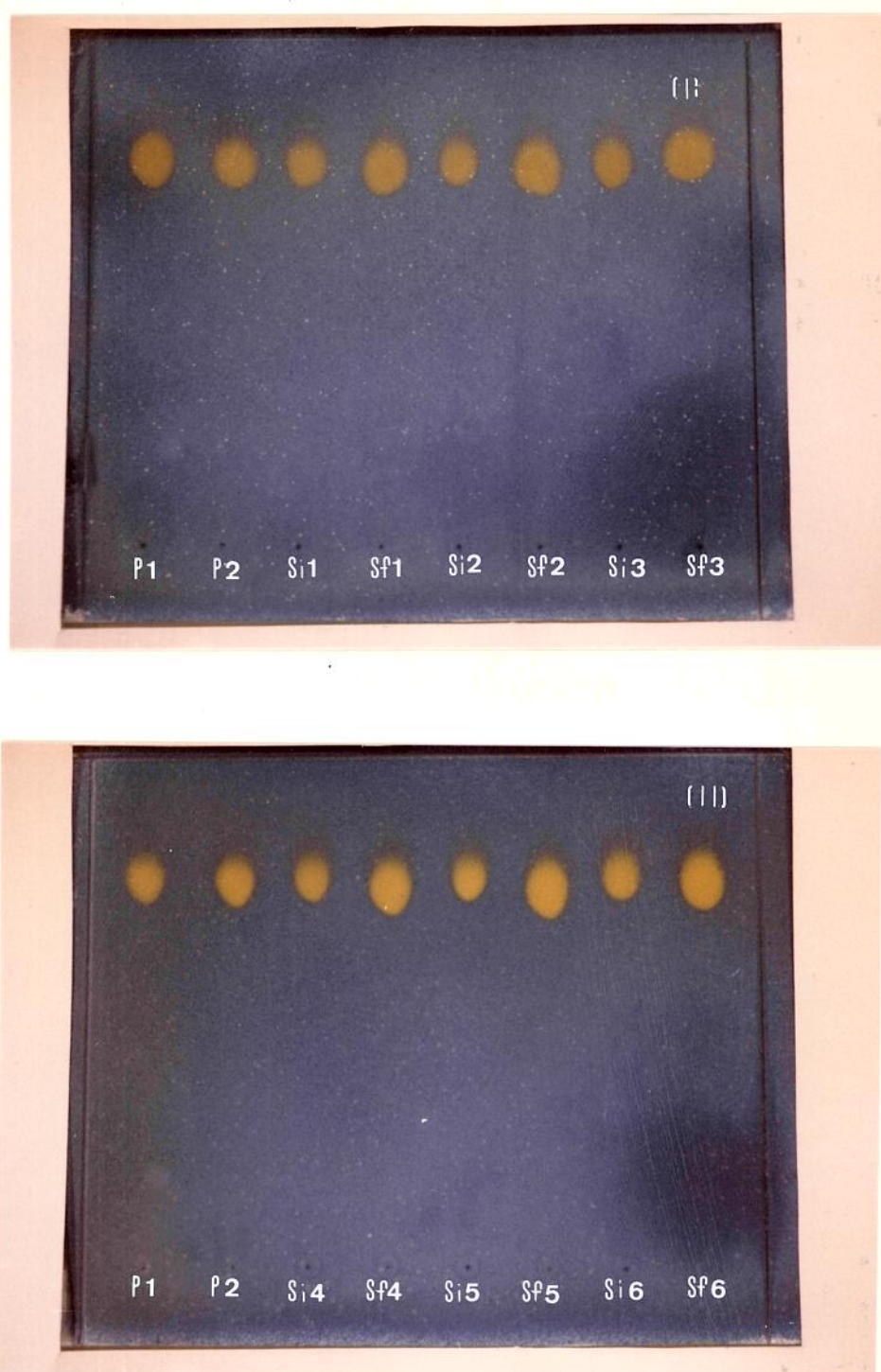


Figura 16. Cromatografia de camada delgada dos ácidos orgânicos.

(I) *S. cerevisiae* NRRL Y-2342, (II) *S. cerevisiae* FTPT 0472, (P1) solução padrão de ácido fórmico, (P2) solução padrão de ácido acético, (Si) substrato inicial, (Sf) substrato fermentado por *S. cerevisiae* NRRL Y-2342 à 38 °C e por *S. cerevisiae* FTPT 0472 à 34 °C, (1) e (4) cultura pura, (2) e (5) cultura contaminada com *Lactobacillus* e (3) e (6) cultura contaminada com *Leuconostoc*.

2.7. Degradação e Utilização dos Açúcares

Para analisar a degradação e utilização dos açúcares pelas duas leveduras estudadas, na ausência e presença de contaminantes foram realizadas análises qualitativas e quantitativas dos açúcares presentes no início e no término das fermentações:

2.7.1. Análise Qualitativa dos Açúcares

Através da cromatografia em camada delgada puderam ser detectados os seguintes açúcares no substrato inicial (Si): melezitose, celobiose, sacarose, glicose e frutose (Figura 17 e Tabela 5).

Os açúcares residuais detectados no mosto fermentado por *S. cerevisiae* NRRL Y-2342 com cultura pura e na presença de *Lactobacillus* foram: glicose, frutose e ribose.

Nas amostras fermentadas por *S. cerevisiae* NRRL Y-2342 na presença de *Leuconostoc* (Figura 17-I) e nas fermentações por *S. cerevisiae* FTPT 0472 (Figura 17-II), além dos açúcares residuais citados anteriormente foram detectados também, os açúcares do substrato inicial, como: melezitose, celobiose e sacarose, bem como, um açúcar desconhecido de baixo peso molecular e R_f igual a 0,62.

Em meio de fermentação contendo di-, tri- ou polisacarídeos é necessário a presença de enzimas hidrolíticas para a conversão destes compostos em hexoses. De acordo com PHAFF *et alii* (1966), se uma hexose não for fermentada por uma levedura, os oligossacarídeos correspondentes a essa hexose também não serão hidrolizados.

Sob este ponto de vista, quantidades apreciáveis de glicose presentes no término das fermentações por *S. cerevisiae* NRRL Y-2342 contaminada com *Leuconostoc* e por *S. cerevisiae* FTPT 0472 provavelmente inibiram a síntese e/ou atividade de enzimas hidrolíticas das ligações glicosídicas $\beta(1-4)$, $\alpha(1-2)$ e $\beta(1-3)$ dos dissacarídeos (sacarose e celobiose) e do trissacarídeo (melezitose).

A ligação glicosídica $\alpha(1-2)$ da sacarose e da melezitose pode ser quebrada pela invertase, localizada na superfície celular. Após a hidrólise, as hexoses permeiam para o interior da célula e são fosforiladas pela hexoquinase formando frutose-6P (PHAFF *et alii*, 1966). PAZUR (1970) menciona que a melezitose é utilizada pelas leveduras de panificação.

PHAFF *et alii* (1966) e PAZUR (1970) citam que normalmente a β celobiose não é fermentada pelas leveduras, embora seja um ótimo substrato para o crescimento da célula através da via respiratória. No experimento realizado, a β -celobiose foi utilizada pela linhagem NRRL Y-2342.

Embora as leveduras utilizem pentose através da via respiratória, não se conhece leveduras que possuem capacidade de fermentar as pentoses (PHAFF *et alii*, 1966). Os dados da Figura 17 indicam que as leveduras em estudo também não utilizaram a pentose do tipo ribose.

Assim, as bactérias podem ser favorecidas em relação as leveduras, na competição pela utilização dos açúcares do tipo pentose (BRYAN-JONES, 1975). Nas condições do experimento, os contaminantes em estudo, também não utilizaram pentose (ribose), provavelmente devido a presença de glicose residual (Figura 17).

Quanto ao composto desconhecido detectado no cromatograma da Figura 17, na revelação com solução de anilina e difenilamina em acetona e ácido fosfórico, este composto apresentou a mesma coloração da mancha da frutose (cor-de-rosa), o que reforça a idéia de que este seja uma eritrulose ou diidroxiacetona por pertencerem ao grupo dos monossacarídeos cetose de baixo peso molecular.

Os valores de R_f dos açúcares padrões obtidos experimentalmente apresentaram boa concordância com os dados da literatura (STEFANIS & PONTE, 1968) (Tabela 6) realizados com o mesmo sistema de solvente $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}:\text{H}_2\text{O}$ (30:35:5).

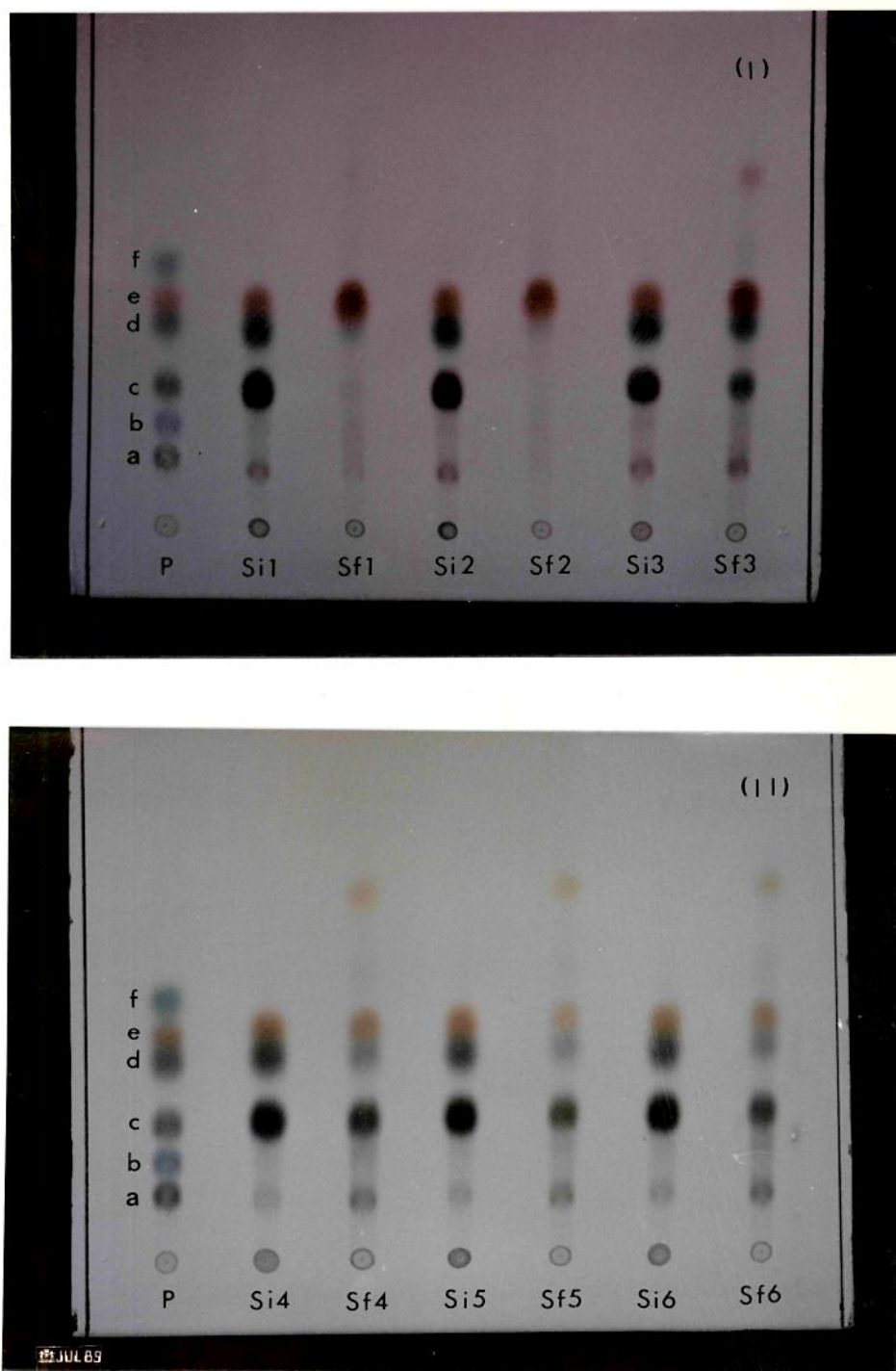


Figura 17. Cromatografia em camada delgada dos açúcares.

(I) *S. cerevisiae* NRRL Y-2342, (II) *S. cerevisiae* FTPT 0472, (P) soluções padrões de açúcares (a-melezitose, b-celobiose, c-sacarose, d-glicose, e-frutose e f-ribose), (Si) substrato inicial, (Sf) substrato fermentado por *S. cerevisiae* NRRL Y-2342 à 38 °C e por *S. cerevisiae* FTPT 0472 à 34 °C, (1) e (4) cultura pura, (2) e (5) cultura contaminada com *Lactobacillus* e (3) e (6) cultura contaminada com *Leuconostoc*.

Tabela 5. Valores de R_f e coloração dos açúcares correspondente aos cromatogramas ilustrados na Figura 17.

valores de R_f															
padrões	(I) <i>S. cerevisiae</i> NRRL Y-2342							(II) <i>S. cerevisiae</i> FTPT 0472							cores
	P	Si1	Sf1	Si2	Sf2	Si3	Sf3	P	Si4	Sf4	Si5	Sf5	Si6	Sf6	
melizitose	0,10	0,10	--	0,10	--	0,11	0,11	0,10	0,11	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	preto
celobiose	0,18	0,18	--	0,18	--	0,19	0,20	0,17	0,18	0,17	0,18	0,18	0,18	0,18	azul
sacarose	0,25	0,24	--	0,25	--	0,26	0,26	0,24	0,24	0,24	0,24	0,25	0,24	0,24	preto
glicose	0,36	0,35	0,35	0,35	0,36	0,36	0,36	0,34	0,35	0,35	0,35	0,35	0,34	0,35	preto
frutose	0,40	0,40	0,40	0,41	0,41	0,41	0,41	0,39	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,38	rosa
ribose	0,47	--	0,48	--	0,48	--	0,50	0,45	--	0,48	--	0,47	0,46	0,48	azul
n.i.	--	--	--	--	--	--	0,63	--	--	0,63	--	--	--	--	rosa

P padrões de açúcares
 Si substrato inicial
 Sf substrato fermentado
 n.i. não identificado
 1 e 4 cultura pura
 2 e 5 cultura contaminada com *Lactobacillus*
 3 e 6 cultura contaminada com *Leuconostoc*

Tabela 6. Comparação dos valores de R_g experimental (Tabela 5) e de literatura (STEFANIS & PONTE, 1968) obtidos na cromatografia de camada delgada dos açúcares padrões com sistema de solvente $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}:\text{H}_2\text{O}$ na proporção de 30:35:5 (v/v/v).

R _g x 100 dos açúcares padrões			
açúcares	I	II	literatura
melezitose	28	29	---
celobiose	50	50	---
sacarose	69	71	74
glicose	100	100	100
frutose	111	115	113
ribose	131	132	---

(I) e (II) se referem aos valores experimental dos padrões obtidos na cromatografia da Figura 17.

2.7.2. Análise Quantitativa dos Açúcares Residuais

Os teores de açúcares totais detectados após o término das fermentações variaram entre 8 e 28 g/L (Figura 18-b).

Os ensaios de fermentação por *S. cerevisiae* NRRL Y-2342 apresentaram teores de açúcares redutores muito semelhantes aos de açúcares totais (Figura 18-Ib). Isto foi também constatado nas análises dos açúcares por cromatografia em camada delgada, onde a sacarose, que é um açúcar não redutor, foi quase completamente hidrolizada a açúcares redutores (glicose e frutose) (Figura 17-I), restando praticamente apenas a frutose no final das fermentações. Esta evidência indica que a linhagem NRRL Y-2342 deve possuir uma alta atividade enzimática da invertase. No entanto, isto não foi observado nas fermentações desta linhagem contaminada com *Leuconostoc* na faixa de temperatura de 34 a 38 °C, e também em todas as fermentações por *S. cerevisiae* FTPT 0472. As concentrações de açúcares totais atingiram valores de até cinco vezes maiores que os de açúcares redutores nos ensaios realizados com o *S. cerevisiae* FTPT 0472 (Figura 18-IIb). Entretanto, a altas temperaturas (38 e 40 °C) os valores de açúcares totais e redutores se aproximaram. Isto pode ser devido em parte porque essas temperaturas de fermentação estão mais próximas à temperatura ótima da atividade enzimática da invertase. Segundo KEELP (1975) a temperatura ótima para a atividade da invertase em soluções diluídas de sacarose é 55 °C.

Outro aspecto que diferencia estas duas linhagens de leveduras é o perfil de utilização de açúcares a diferentes temperaturas. A linhagem FTPT 0472 consumiu melhor os açúcares a temperaturas mais baixas (28 a 36 °C), deixando maior teor de açúcar a temperaturas elevadas (38 e 40 °C). O comportamento da linhagem NRRL Y-2342 não foi tão drástico quanto a primeira, mas, o açúcar residual foi maior a baixas temperaturas, mostrando um comportamento oposto à linhagem FTPT 0472.

2.8. Produção de Etanol e de Dióxido de Carbono

As concentrações de etanol e CO₂ obtidas a diferentes temperaturas após o término das fermentações estão indicadas na Figura 18-c. Os valores de etanol e CO₂ obtidos no final das fermentações variaram respectivamente 40-55 g/L e 46-56 g/L (*S. cerevisiae* NRRL Y-2342) e 35-53 g/L e 43-51 g/L (*S. cerevisiae* FTPT 0472).

Embora a técnica de determinação de CO₂ adotada não seja muito sensível, ela foi utilizada porque permite a liberação do CO₂ produzido e assim, evitar qualquer tipo de inibição sobre as células que possam advir deste metabólito. Apesar disto, pode-se averiguar que os valores de CO₂ e etanol produzidos pela *S. cerevisiae* NRRL Y-2342 foram bastante próximos, como era previsto pela equação global da conversão da glicose a etanol e CO₂ (item 1.3 da Revisão Bibliográfica, p. 9). No entanto, os valores de CO₂ e de etanol produzidos pela *S. cerevisiae* FTPT 0472 a baixas temperaturas (28-32 °C) apresentaram diferenças bastante signi-

ficativas. Com esta linhagem, os valores de CO_2 liberados foram maiores que os de etanol produzidos, indicando que parte do CO_2 pode ser proveniente do anabolismo (utilização da glicose para a produção de massa celular). Isto pode ser constatado na Figura 14, pelo incremento da massa celular desta linhagem no intervalo de temperatura citado (28 a 32 °C).

Segundo ROLZ (1982) o crescimento de leveduras é inibido completamente a concentrações de etanol superiores a 70 g/L. Quando o teor de etanol atinge níveis de 87 a 115 g/L há uma total inibição da produção de etanol. Como a concentração de etanol nos experimentos foi mantido abaixo de 56 g/L, espera-se que nenhuma inibição drástica pelo produto tenha ocorrido nas condições dos ensaios. A produção de etanol pelas linhagens testadas não foi favorecida a baixas temperaturas. Altas temperaturas como 40 °C mostraram ser prejudiciais para a linhagem FTPT 0472. Entretanto o *S. cerevisiae* NRRL Y-2342 teve a produção de etanol favorecida a altas temperaturas, ou seja, na faixa de 34 a 40 °C sendo que a produção máxima ocorreu na presença de *Lactobacillus*.

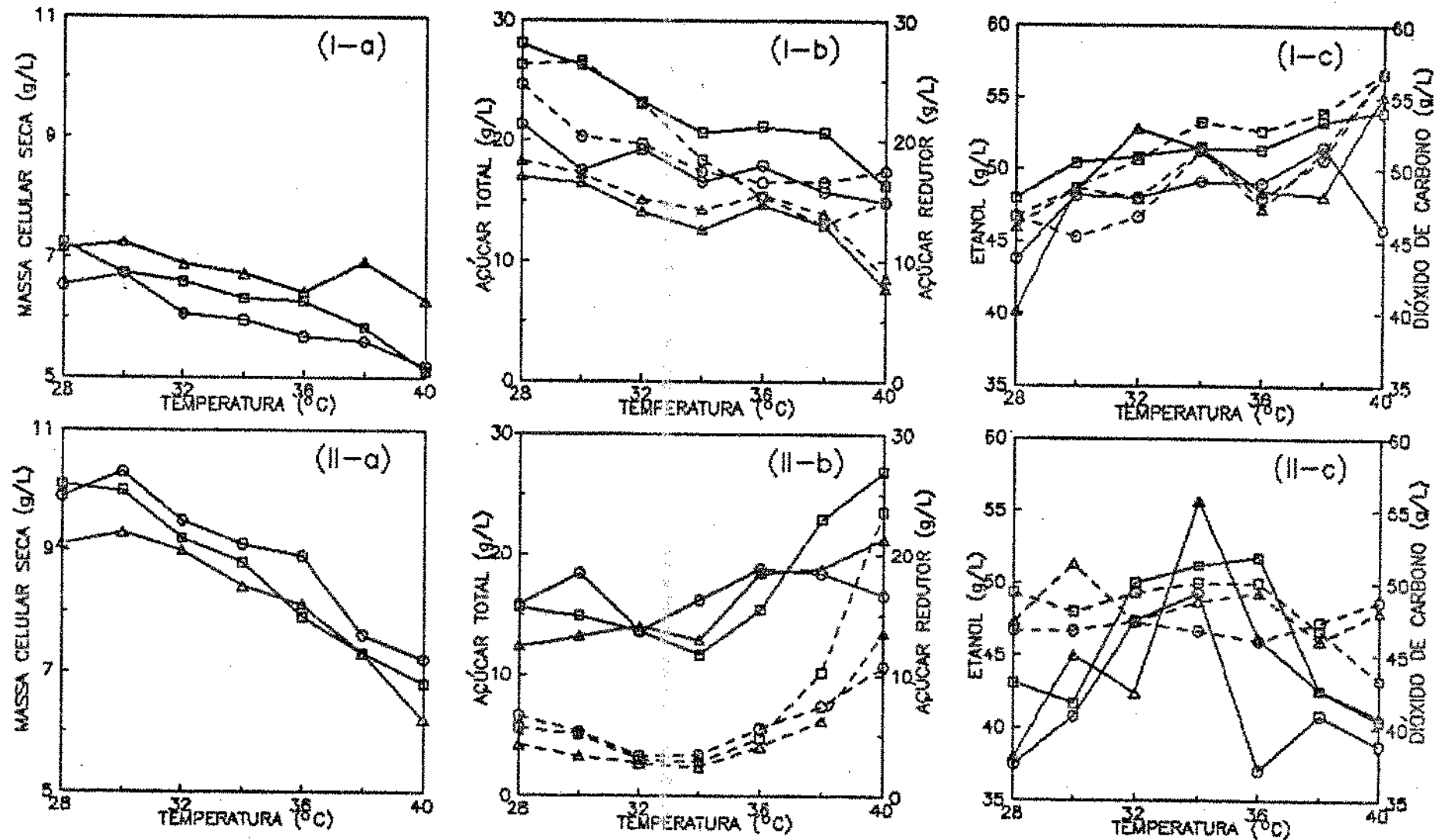


Figura 18. Efeito da temperatura sobre os produtos finais de fermentação. (I) *S. cerevisiae* NRRL Y-2342, (II) *S. cerevisiae* FTPT 0472, (a) massa celular seca, (b) açúcar total (—) e redutor (---), (c) etanol (—) e dióxido de carbono (---), (O) cultura pura, (Δ) presença de *Lactobacillus* e (□) presença de *Leuconostoc*.

2.9. Relação entre os Coeficientes de Rendimento Celular ($Y_{X/S}$), Rendimento Alcoólico ($Y_{P/S}$) e Produtividade Global (Pr)

Os coeficientes de rendimento celular ($Y_{X/S}$), coeficientes de rendimento alcoólico ($Y_{P/S}$) e produtividade global (Pr) foram calculados com os dados apresentados na Figura 18, segundo as equações indicadas no Apêndice (item 2). Os resultados obtidos estão representados na Figura 19. O aumento de temperatura acarretou um declínio nos coeficientes de rendimento celular ($Y_{X/S}$) (Figura 19-a). Isto pode ser explicado pela queda da viabilidade celular a altas temperaturas, principalmente nos ensaios com o *S. cerevisiae* FTPT 0472. Por outro lado, a redução de massa celular seca do *S. cerevisiae* NRRL Y-2342 a altas temperaturas não foi tão acentuado, porém o consumo de açúcar permaneceu elevado (Figura 18-Ib).

Embora os valores do coeficiente de rendimento alcoólico da fermentação por *S. cerevisiae* NRRL Y-2342 (cultura pura) não tenham apresentado diferenças drásticas nas diferentes temperaturas, nota-se que o melhor rendimento alcoólico foi obtida a 38 °C ($Y_{P/S} = 0,47$). Coincidentemente a produtividade global apresentou valor máximo a 38 °C ($Pr = 3,69$ g/L.h) (Figura 19-Ib). Os valores máximos do coeficiente de rendimento alcoólico e produtividade global para a linhagem *S. cerevisiae* FTPT 0472 (cultura pura) foram obtidas a 34 °C $Y_{P/S} = 0,47$ e $Pr = 3,29$ g/L.h (Figura 19-IIb). A produtividade obtida na faixa de 1 a 4 g/L.h, está de acordo com os valores indicados por ESSER & SCHMIDT (1982), em fermentação alcoólica tipo *batch*.

O fato dos valores de $Y_{p/s}$ e Pr terem sido menores a baixas temperaturas em contraste aos valores de $Y_{x/s}$, principalmente para a linhagem FTPT 0472, indica que uma maior quantidade de massa celular de leveduras não implica em um aumento na produção de etanol.

O perfil do efeito da temperatura sobre o coeficiente de rendimento alcoólico ($Y_{p/s}$) e produtividade global (Pr) máximos dependeram se a fermentação foi realizada com cultura pura ou na presença de contaminantes, em algumas das condições testadas. Vide as fermentações do *S. cerevisiae* NRRL Y-2342 na presença de *Lactobacillus* a 32 °C e do *S. cerevisiae* FTPT 0472 na presença de *Leuconostoc* a 36 °C (Figura 19-b e 19-c). Nestas duas condições, $Y_{p/s}$ e Pr máximos foram obtidos a uma temperatura diferente à da cultura pura.

Os valores de $Y_{p/s}$ máximos obtidos na fermentação de ambas as leveduras contaminadas com *Lactobacillus* (ensaios 2 e 5) foram cerca de 6 % superiores quando comparadas às correspondentes fermentações com cultura pura. Já a diferença de valor da produtividade global máxima nessas condições, foi menor com o *S. cerevisiae* NRRL Y-2342 (6,2 %) e maior com o *S. cerevisiae* FTPT 0472 (11,3 %).

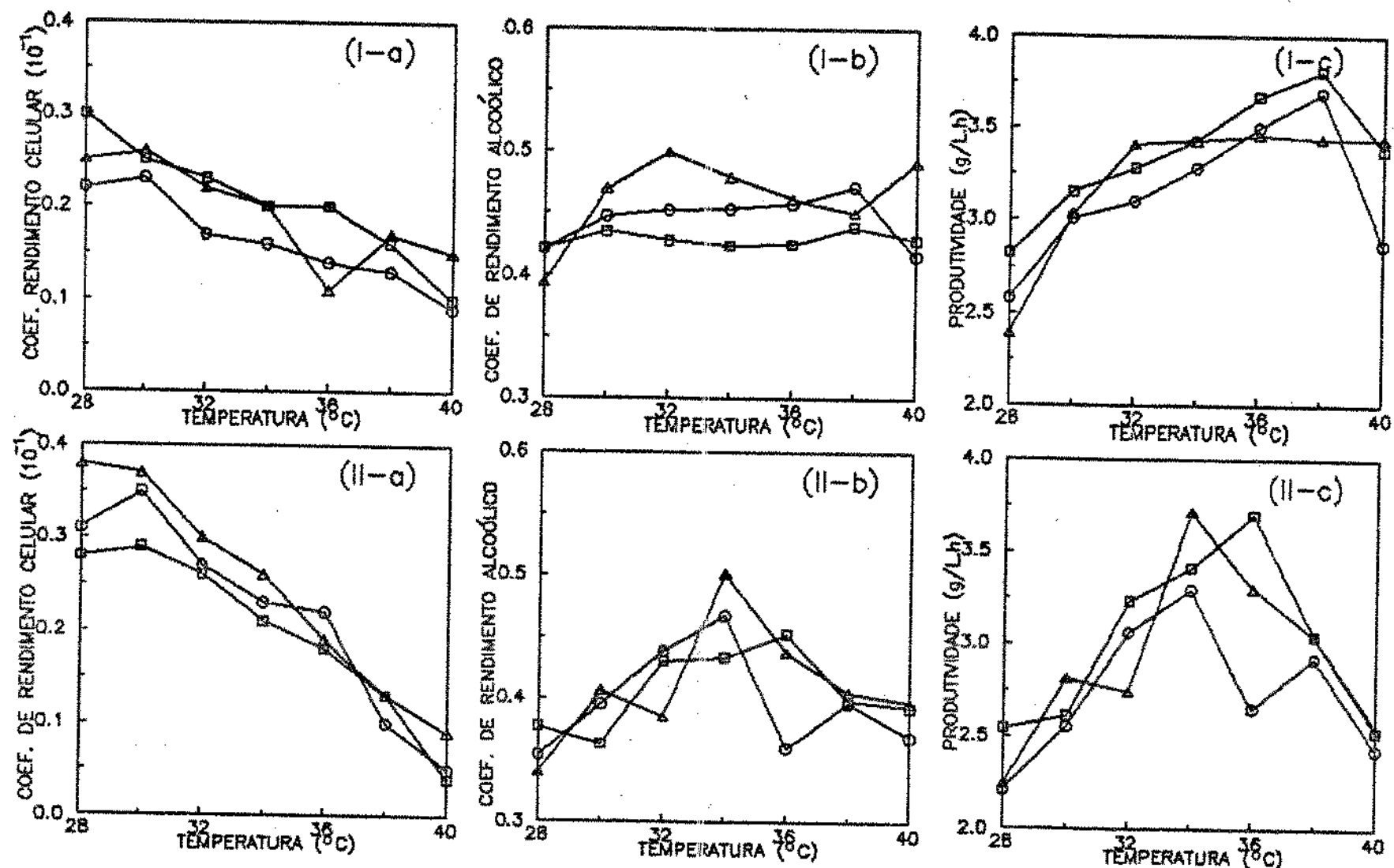


Figura 19. Efeito da temperatura sobre o rendimento e a produtividade da fermentação. (I) *S. cerevisiae* NRRL Y-2342, (II) *S. cerevisiae* FTPT 0472, (a) rendimento celular, (b) rendimento alcoólico, (c) produtividade global, (o) cultura pura, (Δ) presença de *Lactobacillus* e ($\square$) presença de *Leuconostoc*.

Por outro lado, na presença de *Leuconostoc*, a produtividade global máxima apresentou valores superiores (3,1 e 11,1 % para as linhagens NRRL Y-2342 e FTPT 0472, respectivamente) e valores de $Y_{p/s}$ máximos foram menores (6,8 e 3,2 %, para as linhagens NRRL Y-2342 e FTPT 0472, respectivamente), quando comparadas com as fermentações com cultura pura correspondentes. Estes resultados indicam que apesar do *Leuconostoc* não sobreviver até o final da fermentação, ele é responsável pelo consumo de uma parte dos açúcares presentes, para a formação de biomassa e ácidos, segundo foi constatado pelo abaixamento de pH na fermentação (Vide Figura 15), e assim afetando o rendimento alcoólico global.

Resultados semelhantes foram obtidos por KAJI & CANHOS (1986) em ensaios de fermentação alcoólica por *Saccharomyces* sp L-5 na presença e ausência de contaminantes, simulando o processo *Helle-Boinot*. O meio de cultivo utilizado foi 20 % de sacarose, sais minerais e vitaminas. Apesar do *Leuconostoc* não ter apresentado viabilidade após o tratamento com H_2SO_4 , os valores de pH e rendimento alcoólico apresentaram valores ligeiramente menores quando comparados à cultura pura. As fermentações na presença de *Lactobacillus* não apresentaram distúrbios, embora o número desse microrganismo tenha aumentado ligeiramente.

ALTERTHUM *et alii* (1984, 1985) realizaram ensaios de fermentação com sistema de reciclagem de células contaminadas por bacilos e cocos Gram positivos e notaram quedas no rendimento alcoólico de quase 100 e 60 %, respectivamente. Porém, o desenvolvimento da levedura foi fraca, apresentando 56 % de células mortas, nos ensaios de prova e a contaminação foi aumentada de 10^7 a 10^9 UFC/mL. BORZANI (1986) notou através dos dados experimentais obtidos por ALTERTHUM *et alii* (1984, 1985) que a concentração máxima de contaminantes de cocos Gram positivos permitida na fermentação sem que este cause danos ao rendimento alcoólico é de $2,6 \cdot 10^7$ UFC/mL.

Neste trabalho, foi constatado que uma contaminação bacteriana não necessariamente influi adversamente sobre a fermentação alcoólica por leveduras.

Devido ao fato que as diferentes condições experimentais conduziram a diferentes tempos de fermentação (Tabela 4), os resultados obtidos poderão ser melhor comparados se apresentados na forma de produtividade global (Tabela 7).

Pode-se observar que na presença de *Leuconostoc* ou *Lactobacillus* foram obtidos melhores produtividades na maioria das condições testadas. Essa diferença foi mais acentuada na faixa de temperatura de 32 a 40 °C, onde ao invés da inibição observada por AMORIM & OLIVEIRA (1982) e ALTERTHUM *et alii* (1984, 1985) foi constatado um ligeiro efeito benéfico sobre as leveduras, mesmo nos casos onde os rendimentos alcoólicos não expressam a mesma tendência.

3. EFEITO DA TEMPERATURA E DO ETANOL SOBRE *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*

A população inicial de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* dos ensaios com caldo de cana foi de 10^7 UFC/mL e com meio de triptona, extrato de levedura e glicose foi de 10^8 UFC/mL.

As curvas de crescimento do *Leuconostoc* obtidas a diferentes temperaturas estão representadas na Figura 20, onde estão plotados os dados de $\ln A$ em função do tempo (Figura 20-a), e os parâmetros de $\ln A$, temperatura e tempo em forma de superfície de resposta (Figura 20-b). Estes dados indicam que a temperatura ótima de crescimento é de 30 °C e que o crescimento é seriamente afetado a temperaturas superiores a 34 °C. Observa-se também, que em meio de caldo de cana a fase lag foi relativamente longa (cerca de 4 horas) e que houve pelo menos duas fases de crescimento da bactéria.

A partir desses dados foram calculadas as velocidades específicas máximas de crescimento (μ_{MAX}) e os resultados estão plotados na Figura 21 ($\ln K_d$ versus $1/T$), segundo a equação de Arrhenius descrita no Apêndice (item 2). Estes dados indicam o valor do coeficiente da reta igual a 12,4 e a energia de ativação equivalente a 24,6 Kcal/mol. Pode-se verificar que a temperatura ótima de crescimento (30 °C) obtida pelo ponto máximo da curva de Arrhenius coincide com a temperatura onde o valor de μ_{MAX} foi maior ($\mu_{MAX} = 0,21 \text{ h}^{-1}$).

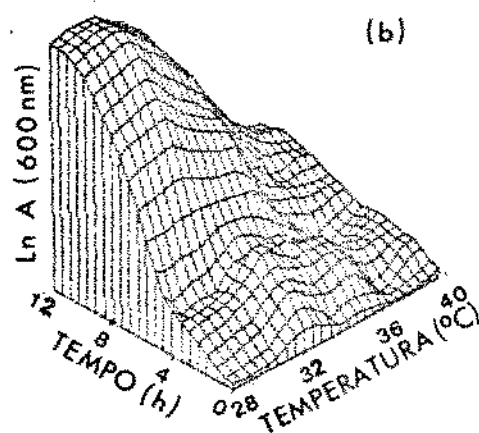
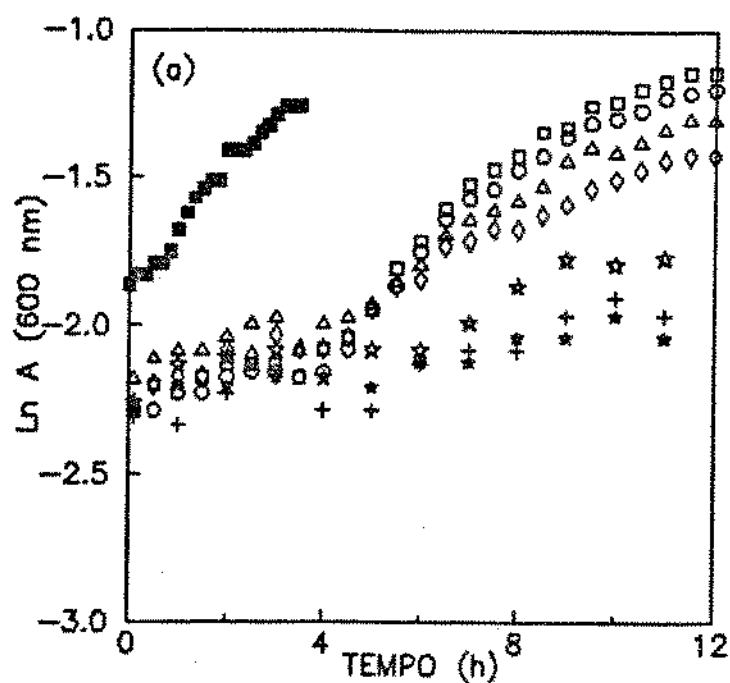


Figura 20. Curvas de crescimento de *Leuconostoc* a diversas temperaturas, representadas na forma (a) bidimensional e (b) superfície de resposta. Caldo de cana à (○) 28, (□) 30, (△) 32, (◇) 34, (☆) 36, (+) 38 e (x) 40 °C e (■) caldo de triptona, extrato de levedura e glicose a 30°C.

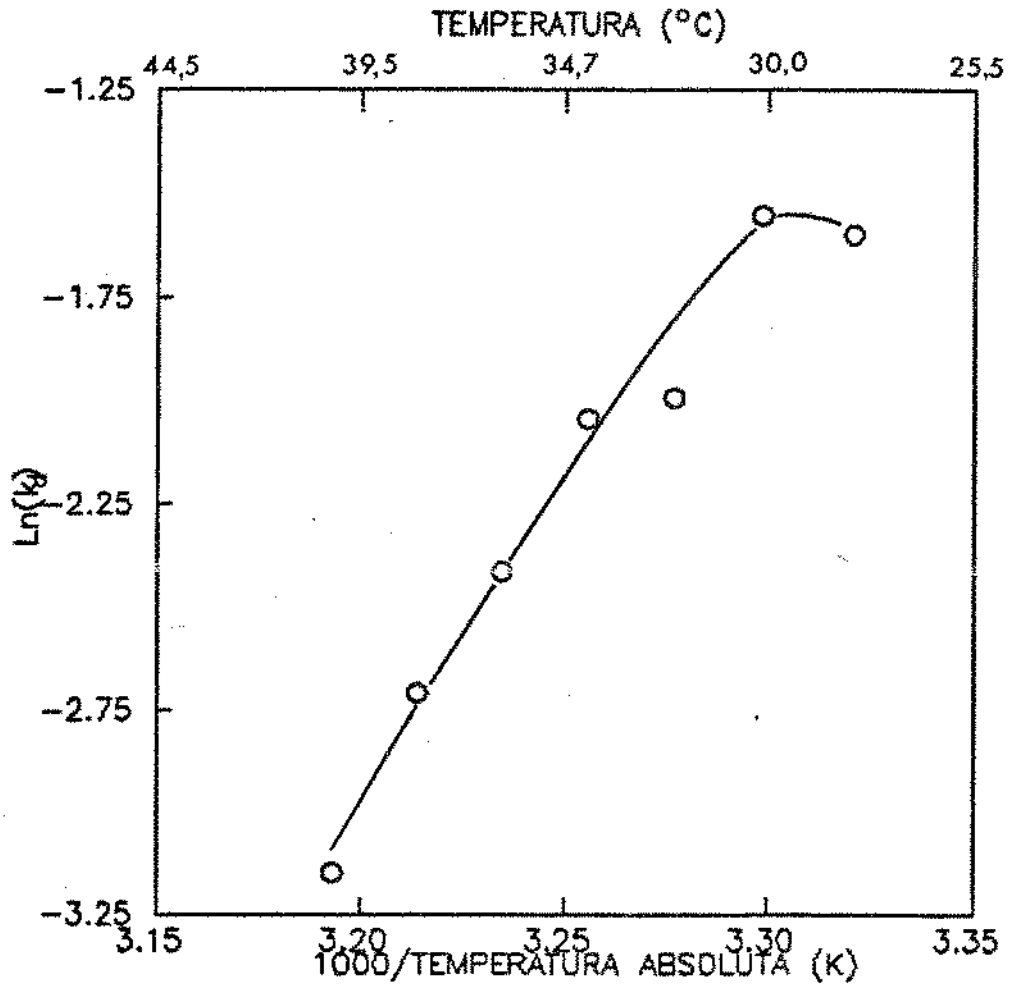


Figura 21. Velocidades específicas máximas de crescimento (k_d) do *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* a diversas temperaturas (28 – 40 °C) representadas pela equação de Arrhenius.

O μ_{MAX} do *Leuconostoc* cultivado em meio rico (triptona, extrato de levedura e glicose) foi de $0,53 \text{ h}^{-1}$, indicando que o meio de caldo de cana suplementado com N e P, a pH 4,5, não é adequado para o desenvolvimento satisfatório do *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*.

O efeito das diferentes concentrações de etanol no crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* à temperatura ótima (30°C) está indicado na Figura 22-a. Os valores de $\ln A$ obtidos nas várias concentrações de etanol (0-9 % (v/v)) em função do tempo estão também ilustrados na Figura 22-b em forma de superfície de resposta.

Os valores das velocidades específicas máximas de crescimento obtidos nas diferentes concentrações de etanol estão indicados na Figura 23. Esses dados, indicam que qualquer suplementação de etanol provocou uma diminuição na taxa de crescimento e que uma adição de 3,0 % de etanol reduz o valor de μ_{MAX} à metade do valor sem o etanol. Concentrações de etanol superiores a 6,0 % implicou na completa inibição do crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*.

Como a concentração de etanol encontrada no final das fermentações foi em torno de 5,0 % (p/v), este deve ter sido a principal razão da não detecção do *Leuconostoc* ao término das fermentações.

MUNDT & HAMMER (1966) constataram que a adição de 7,0 % de etanol no meio *ROGOSA SL* (Difco) induz uma redução de 35 % da população de *L. mesenteroides* após 24 horas de incubação.

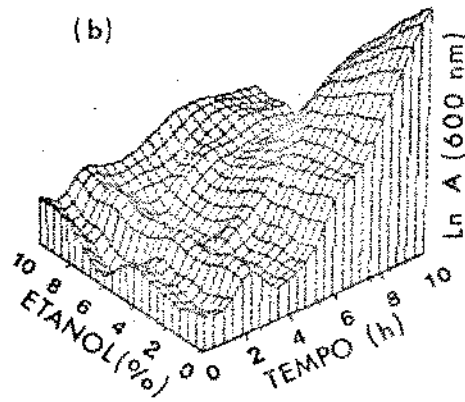
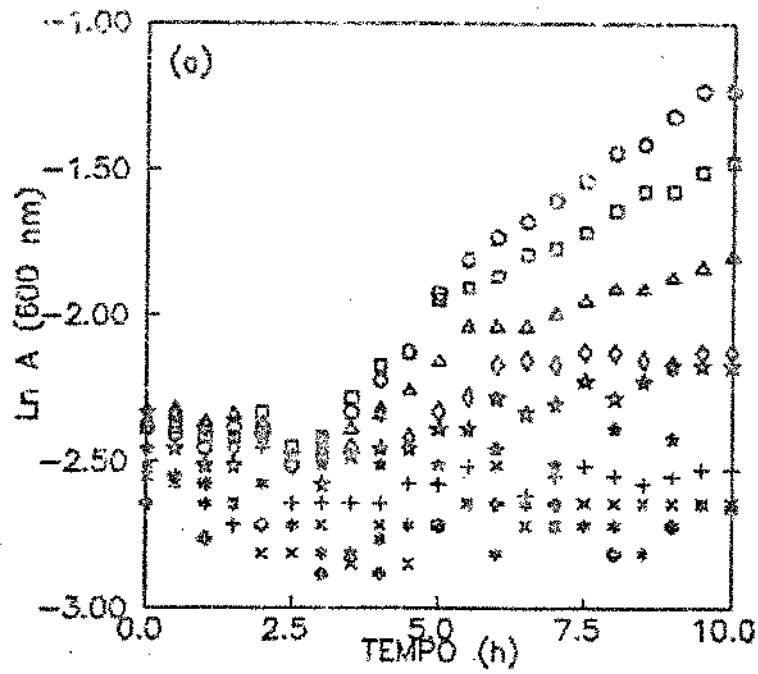


Figura 22. Curvas de crescimento do *Leuconostoc* em caldo de cana suplementado com diferentes concentrações de etanol, representadas na forma (a) bidimensional e (b) superfície de resposta. (O) 0, (□) 1, (Δ) 2, (◇) 3, (☆) 4, (+) 5, (x) 6, (*) 7, (★) 8 e (⊗) 9 %, a 30 °C.

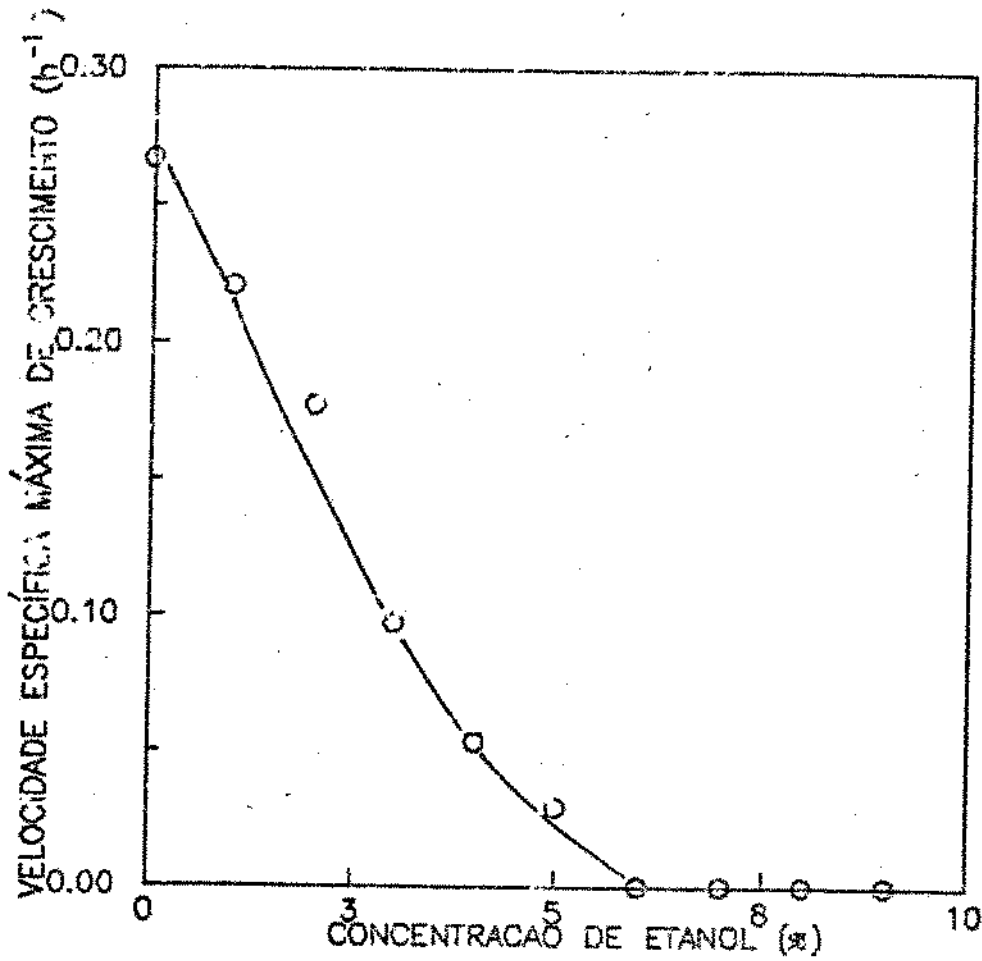


Figura 23. Velocidades específicas máximas de crescimento da Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides obtidas em caldo de cana suplementado com diferentes concentrações (0-9 %), a 30 °C.

4. RELAÇÃO DA CONTAGEM DE *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-2342 E DE *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* DURANTE A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

A contagem relativa do *S. cerevisiae* NRRL Y-2342 e do *L. mesenteroides* foi acompanhada em uma fermentação alcoólica realizada nas condições descritas no item 5 de Material & Métodos, p. 53.

Os resultados das análises microbiológicas das amostras coletadas em vários intervalos de tempo da fermentação estão indicados na Figura 24, Figura 25 e Apêndice Tabela 8.

Uma elevada porcentagem de leveduras com brotamento foi detectada no início da fermentação, sendo que o valor máximo foi obtido após 4 horas de incubação. A porcentagem de células viáveis sem brotos foi praticamente igual a de células com brotos (Figura 24). O desenvolvimento da levedura acarreta mudanças na composição do meio, causando um aumento na concentração de etanol, o que desfavorece o desenvolvimento de *Leuconostoc mesenteroides* (Figura 22), segundo foi constatado anteriormente (Figura 23).

A viabilidade das células de levedura permaneceu praticamente constante sendo que após 10 horas de incubação as células praticamente não apresentaram brotamento, provavelmente devido a alterações no meio resultantes do esgotamento de nutrientes e do acúmulo de metabólitos produzidos.

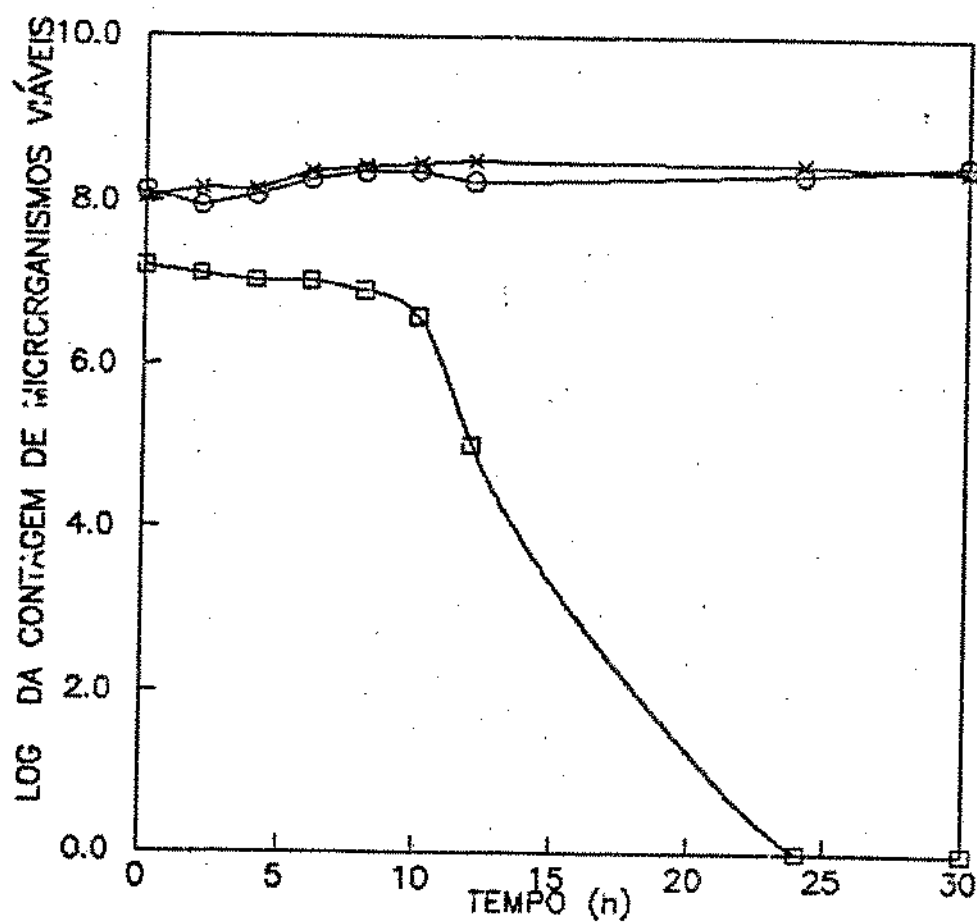


Figura 24. Acompanhamento da contagem de microrganismos viáveis com o tempo, a 30 °C. (x) contagem de *S. cerevisiae* NRRL Y-2342 em placas e (o) por microscopia e (□) contagem de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* em placas.

Os dados da Figura 25 indicam que os resultados de contagens de leveduras por plaqueamento e microscopia são similares e que a contagem de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* decresceu com o tempo de incubação, desaparecendo completamente nas amostras coletadas a 24 horas. Isto pode ser resultante de dois fatores:

- 1- Nas primeiras 4 horas, a levedura cresceu mais intensamente (Figura 24), enquanto o *Leuconostoc* permaneceu em fase lag nesse período (Figura 20), causando a consequente diluição da bactéria nas leveduras.
- 2- Após 4 horas de cultivo, houve um acúmulo de etanol produzido pelas leveduras em crescimento intenso, resultando na inibição do crescimento subsequente do *Leuconostoc*.

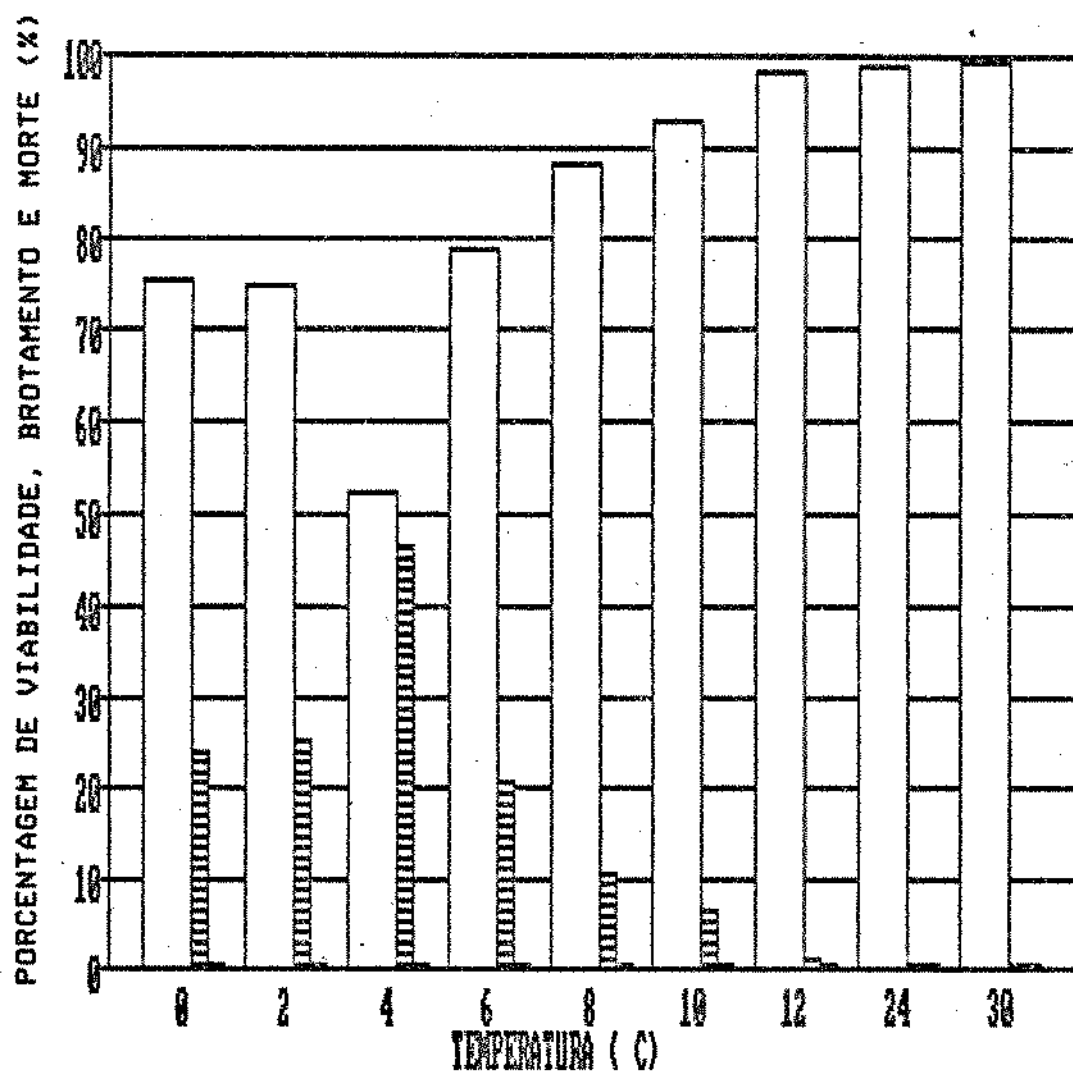


Figura 24. Características de viabilidade, brotamento e morte de *S. cerevisiae* NRRL Y-2342 (na presença de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*) em diferentes tempos de incubação à 30 °C. (□) levedura viável, (▨) com brotamento e (■) levedura morta.

CONCLUSÕES

1. Os isolados FTPT 0367 e FTPT 0694, utilizados como contaminantes das fermentações alcoólicas, foram identificados como sendo *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* e *Lactobacillus fermentum*, respectivamente.
2. O crescimento celular das leveduras tanto na ausência quanto na presença de contaminantes foi adversamente afetado à 40 °C e favorecido a temperaturas na faixa de 28-32 °C.
3. O efeito da temperatura sobre a produção de massa celular seca, pH e etanol foi muito maior sobre a linhagem FTPT 0472.
4. Nas fermentações realizadas na ausência de contaminantes, a linhagem FTPT 0472 produziu mais biomassa e apresentou maior porcentagem de brotamento, acarretando maior redução do pH no caldo fermentado. A linhagem NRRL Y-2342 produziu mais álcool e apresentou maior teor de hidrólise e consumo de açúcares. Ambas as linhagens apresentaram o mesmo valor de coeficiente de rendimento alcoólico máximo ($Y_{p/S} = 0,47$), porém a produtividade global máxima foi maior (11 %) para a linhagem NRRL Y-2342.

5. Ambos os contaminantes prejudicaram a porcentagem de viabilidade de células com brotamento do *S. cerevisiae* NRRL Y-2342. O mesmo não ocorreu com a linhagem FTPT 0472.
6. Após o término das fermentações, entre as bactérias testadas, apenas o *Lactobacillus* pode ser recuperado através de contagens em placas, e não foram detectados células viáveis de *Leuconostoc*.
8. Entre fatores que contribuem para a morte das células de *Leuconostoc* em fermentações alcoólicas, destacam-se a baixa velocidade específica máxima de crescimento (μ_{MAX}) destas bactérias em caldo de cana suplementado com nutrientes N e P, a pH 4,5 (fase lag de 4 horas e $\mu_{MAX} = 0,21 \text{ h}^{-1}$) e o efeito adverso do álcool. Concentrações de 3 % de etanol são capazes de reduzir a velocidade específica máxima de crescimento em mais de 50 %. Concentrações superiores a 6 % implicam na interrupção do crescimento de *Leuconostoc* em caldo de cana suplementado com nutrientes. Outro fator adverso, é o incremento de temperatura, sendo que a 36 °C a velocidade específica máxima de crescimento de *Leuconostoc* é reduzida em mais de 50 %, nas condições do ensaio.

9. Como o *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* foi sensivelmente afetado na presença de etanol em concentrações bem mais baixas que o normalmente atingida em usinas de álcool, é de se supor que esta bactéria não causa distúrbios significativos nas dornas de fermentação. Porém, este causou um aumento na porcentagem de morte das leveduras a 40 °C, bloqueou parcialmente a degradação de açúcares e reduziu o rendimento alcoólico (6,8 e 3,2 % para as fermentações com as linhagens NRRL Y-2342 e FTPT 0472, respectivamente) quando comparadas com as correspondentes fermentações por culturas puras. Entretanto, valores da produtividade global máxima foram superiores (3,1 e 11,1 % para as linhagens NRRL Y-2342 e FTPT 0472, respectivamente).
10. Apesar do *Lactobacillus* ter permanecido com células viáveis no final das fermentações, este propiciou um aumento na produção de massa celular seca da levedura e de rendimento alcoólico máximo (6,0 %) em relação a ambas as culturas puras. Porém, a produtividade global máxima foi menor na fermentação por *S. cerevisiae* NRRL Y-2342 (6,2 %) e maior na fermentação por *S. cerevisiae* FTPT 0472 (11,3 %).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J. R. Álcool e destilaria. Piracicaba, Nathanael dos Santos. Mineogr., 1940. v. 5, p.55-85.
- ALTERTHUM, F.; CRUZ, M. R. M.; VAIRO, M. L. R. & GAMBASSI, D. M. Efeito dos microrganismos 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.
- ALTERTHUM, F. & ROSE, A. H. Osmotic lysis of sphaeroplasts from *Saccharomyces cerevisiae* grown anaerobically in media containing different insaturated fatty acids. *Journal of General Microbiol.*, 77: 371-382, 1973.
- AMORIM, H. V. e OLIVEIRA, A. J. Infecção na fermentação: como evitá-la. Açúcar e Álcool, nº 5: 12-18, 1982.
- AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J. & ZAGO, E. A. Fermentação descontínua: otimização do processo de *Helle-Boinot*. *Anais IV Semana de Fermentação Alcoólica "Jayme Rocha de Almeida"*, 1985. p.114-121.
- ANÔNIMO. Problems in processing deteriorated cane. *The Sugar J.* 34(4): 22-24, 1971.
- ANÔNIMO, COORDENADORIA DE PROCESSOS - DIVISÃO INDUSTRIAL. Controle microbiológico na fabricação de açúcar e álcool. *Boletim Técnico Copersucar*, 22: 2-17, 1983a.

- ANÔNIMO, CENTRO DE TECNOLOGIA COPERSUCAR. Manual de controle microbiológico da usina de açúcar e álcool. Série Industrial nº 5, 1983b.
- AYALA, H. G.; LIMPIAS, D. B.; DELFINI, A. & GARGIULO, C. A. Action of some bactericides on raw sugarcane juice. *ISSCT*, 16 th Congress, 3: 2909-2922, 1977.
- BAYMA, C. O caldo de cana industrial na fase de defeccão (I). *Brasil Açucareiro*, LXXXII(4): 373-376, 1973.
- BEAUCHAT, L. R. Influence of water activity on growth, metabolic activities and survival of yeasts and molds. *Journal of Food Protection*, 46(2): 135-141, 1983.
- BEAVAN, M. J.; CHARPENTIER, C. & ROSE, A. H. Production and tolerance of ethanol in relation to phospholipid fatty-acyl composition in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 431. *J. Gen. Microbiol.*, 128, 1447-1455, 1982.
- BEVAN, D. & BOND, J. Micro-organisms in field and mill - a preliminary survey. *Proc. 0d. Soc. Sugar Cane Technol.*, 38 th. Conference, 137-143, 1971.
- BLOCK, R. J., DURRUM, E. L. & ZWEIG, G. *A manual of paper chromatography and paper electrophoresis*. New York, Academic Press, 1955. p.157-158.
- BORZANI, W. Control of contamination level in repeated batch ethanol fermentations of unsterilized molasses media. *Biotechnol. Letters*, 8(3): 187-190, 1986.
- BRAUN, D. & GEENEN, H. Dünnschichtchromatographie von carbonsäuren. *J. Chromatography*, 7, 56-59, 1962.

- BROWN, S. W.; OLIVER, S. G.; HARRISON, D. E. F. & RIGHELATO, R. C. Ethanol inhibition of yeast growth and fermentation: differences in the magnitude and complexity of the effect. *European J. Appl. Microbiol. and Biotechnol.*, 11: 151-155, 1981.
- BRYAN-JONES, G. Lactic acid bacteria in distillery fermentation. In: CARR, J. G.; CUTTING, C. V. & WHITING, G. C. eds. *Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food*. London, Academic Press, 1975, p.165-175.
- CAMHI, J. D. A fermentação alcoólica e sua otimização. *Brasil Açucareiro*, XCIV(2): 126-132, 1979.
- CASEY, G. P.; INGLEDEW, W. M. & STEINKRAUS, K. H. Ethanol tolerance in yeasts. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 13(3): 219-280, 1986.
- CHEN, S. L. & GUTMANIS, F. Carbon dioxide inhibition of yeast growth in biomass production. *Biotechnology and Bioengineering*, XVIII(10): 1455-1462, 1976.
- CIFTCI, T.; CONSTANTINIDES, A. & WANG, S. S. Optimization of conditions and cell feeding procedures for alcohol fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, XXV(8): 2007-2023, 1983.
- CORREY, J. E. L. A review - possible sources of ethanol ante- and post-mortem: its relationship to the biochemistry and microbiology of decomposition. *The Journal of Applied Bacteriology*, 44(1): 1-56, 1978.

- DAHIYA, D. S.; BARDIYA, M. C.; DHAMIJA, S. S.; SHARMA, S. & TAURO, P. Alcohol production from cane molasses - effect of fermentation conditions on yeast recycling. *International Sugar J.*, 82(979): 203-206, 1980.
- D'AMORE, T. & STEWART, G. G. Ethanol tolerance of yeast. *Enzyme and Microbiol. Technol.*, 9(6): 322-330, 1987.
- DASARI, G., KESHAVERZ, E.; CONNOR, M. A. & PAMMENT, N. B. A reliable method for detecting the intracellular accumulation of fermentation products: application to intracellular ethanol analysis. *Biotechnol. Letters*, 7(8): 541-546, 1985.
- DAWES, E. A. A symposium on some comparative aspects of intermediary metabolism in microorganisms. *J. of General Microbiol.*, 32: 151-155, 1963.
- DOMBEK, K. M. & INGRAM, L. O. Determination of the intracellular concentration of ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Applied and Environmental Microbiol.*, 51(1): 197-200, 1986a.
- DOMBEK, K. M. & INGRAM, L. O. Magnesium limitation and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52(5): 975-981, 1986b.
- DOMBEK, K. M. & INGRAM, L. O. Ethanol production during batch fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*: changes in glycolytic enzymes and internal pH. *Applied and Environmental Microbiol.* 53(6): 1285-1291, 1987.
- DUNCAN, C. L. & COLMER, A. R. Coliforms associated with sugarcane plants and juices. *Appl. Microbiol.*, 12(2): 173-177, 1964.

- EGAN, B. T. The infection process in sour storage rot. *Proc. Qd. Soc. Sugar Cane Technol.*, 32 nd. Conf., 21-24, 1965.
- EGAN, B. T. Post-harvest deterioration losses in sugar cane in Queensland. *Proc. Congress ISSCT*, 13 th, 1729-1734, 1968.
- ESSER, K. & KARSCH, T. Bacterial ethanol production: advantages and disadvantages. *Process Biochem.*, 19(3): 116-121, 1984.
- ESSER, K. & SCHMIDT, U. Alcohol production by biotechnology. *Process Biochemistry*, 17(3): 46-49, 1982.
- FAVILLE, L. W. *A study of gum - forming bacteria isolated from cane juice*. Louisiana, 1947. Thesis (M.S.) Louisiana State University, 1947. In: Mc CLESKEY & FAVILLE (1947).
- FERRARI, S. E. e RODELLA, A. A. Ocorrência de dextrana em cana de açúcar. *Brasil Açucareiro*, XC(5): 303-306, 1977.
- FIECHTER, A., FUHRMANN, G. F. & KÄPPELI, O. Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. In: ROSE, A. H. & MORRIS, J. G. eds. *Advances in Microbial Physiology*. London, Academic Press, 1981. v. 22, p.123-183.
- FINGUERUT, J., LUCREDI, H. A. e ROSSELL, C. E. V. Fermentação alcoólica em usinas cooperadas: evolução e perspectivas. *Boletim Técnico Copersucar*, 23: 8-11, 1983.
- FINGUERUT, J., LUCREDI, H. A., LEIMER, K. H. e ROSSELL, C. E. V. Estequiometria da fermentação alcoólica a partir do caldo de cana. *Boletim Técnico COPERSUCAR*, 33: 45-48, 1985.
- FURLETTI, M. E. M., OLIVEIRA, M. C. F. L. e ANGELIS, D. F. Perspectivas de uso de biocidas não convencionais na desinfecção da fermentação alcoólica. *Brasil Açucareiro*, XCVII(3): 219-223, 1981.

- GALLI, Z. F. II Semana de 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. Y.; YOKOYA, F.; CANHOS, V. P. & GALLO, C. R. eds. *Pontos Críticos Microbiológicos em Usinas de Açúcar e Alcool*. Campinas, Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello, 1989.
- GARVIE, E. I. Some properties of gas-forming lactic acid bacteria and their significance in classification. In: CARR, J. G; CUTTING, C. V. & WHITING, G. C. *Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food*. London, Academic Press, 1975. Section II, 339-349.
- GARVIE, E. I. Separation of species of the genus *Leuconostoc* and differentiation of the leuconostocs from other lactic acid bacteria. *Methods in Microbiology*. London, Academic Press, 1984. v. II, section 16, p. 147-178.
- GARVIE, E. I. Genus *Leuconostoc*. In: SNEATH, P. H. A. et alii eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, editora Williams & Wilkins, 1986. 92 ed., v. 2, Section 12, p. 1071-1975.
- GUIJARRO, J. M.; LAGUNAS, R. *Saccharomyces cerevisiae* does not accumulate ethanol against a concentration gradient. *J. Bacteriol.*, 160: 874-878, 1984.

- GUSMÃO, R. Pronunciamento de sua excelência o ministro da indústria e do comércio, Roberto Gusmão, In: *Simpósio Internacional COPERSUCAR Açúcar e Alcool*. EDISERV - Serviços Editoriais S/C Ltda., 1985. p. 11-12.
- HARRIGAN, W. F. & Mc CANCE, M. E. *Laboratory Methods in Microbiology*. Academic Press, London, 49 ed., 1973.
- HAYASHIDA, S.; DER FENG, D. & HONGO, M. Fuction of the concentration alcohol - producing factor. *Agric. Biol. Chem.*, 38(10): 2001-2006, 1974.
- HAYASHIDA, S.; DER FENG, D. & HONGO, M. Physiological properties of yeast cells grown in the proteolipid - supplemented media. *Agric. Biol. Chem.*, 39(5): 1025-1031, 1975.
- INGRAM, M. The lactic acid bacteria - a broad view. In: CARR, J. G., CUTTING, C. V. & WHITING, G. C. eds. *Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food*. London, Academic Press. 1975. 4 th Long Ashton Symposium 1973, 1-13.
- INGRAM, L. O. & BUTTKE, J. M. Effects of alcohols on micro-organisms. *Advances in Microbial Physiology*, 25: 253-300, 1984.
- INGRAM, L. O. Microbial tolerance to alcohols: role of the cell membrane. *TIBTECH.*, 40-44, 1986.
- JONES, R. P.; PAMMENT, N. & GREENFIELD, P. F. Alcohol fermentatation by yeasts - the effect of environmental and other variables. *Process Biochemistry*, 16(1): 42-49, 1981.

- JONES, R. P. & GREENFIELD, P. F. A review of yeast ionic nutrition. Part I: growth and fermentation requirements. *Process Biochemistry*, 19(2):48-60, 1984.
- KAJI, D. A. & CANHOS, V. P. Comportamento da fermentação alcoólica na presença e ausência de contaminantes. *Suplemento SBPC Ciência e Cultura*, 38(7): 63, 1986.
- KANDLER, O. & WEISS, N. Regular, Nonsporing Gram-Positive Rods. In: SNEATH, P. H. A. eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, editora The Williams & Wilkens, 1986. v. II, section 14, 9^o ed., p. 1208-1234.
- KEELP, K. Carbohydrases. In: REED, G. ed. *Enzyme in Food Processing*, USA, Academic Press, 2^o ed., 1975. 90p.
- KEIM, C. R. Technology and economics of fermentation alcohol - an update. *Enzyme Microb. Techn.*, 5(2): 103-114, 1983.
- KOSARIC, N.; WIECZOREK, A.; COSENTINO, G. P. MAGEE, R. J. & PRENOSIL, J. E. Ethanol fermentation. In: REHN, H. J. & REED, G. eds. *Biotechnology - A Comprehensive Treatise in 8 volumes*. Weinheim, Verlag Chemie, 1983. v. 3, p. 257-385.
- LAURE, F.; LAFON-LAFOURCADE, S. & RIBEREAU-GAYON, P. Relationship between the inhibition of alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and the activities of hexokinase and alcohol dehydrogenase. *Biotechnol. Letters*, 6(10): 687-692, 1984.
- LEE, S. S.; ROBINSON, F. M. & WANG, H. Y. Rapid determination of yeast viability. *Biotech. Bioeng. Symp.* 11: 641-649, 1981.

- LIMA, U. A.; GOLDONI, J. S.; CEREDA, M. P. e SOUZA, L. G.
Ocorrência de microrganismos em caldo bruto, caldo misto e
água de embebição em uma usina de açúcar de cana. *Brasil
Açucareiro*, 4: 337-343, 1974.
- LIMA, U. A.; AQUORONE, E. & BORZANI, W. Produção do Etanol. In:
LIMA, U. A. et alii eds. *Biotechnologia. Tecnologia das
Fermentações*. São Paulo, Edgard Blucher, 1982. v. 1, p.
48-68.
- LIEVENSE, J. C. & LIM, H. C. The growth and dynamics of
Saccharomyces cerevisiae. In: TSAO, G. ed. *Annual Reports
on Fermentation Processes*. 1982. v. 6, capítulo 6, p.
211-261.
- LINDEMAN, L. R. & ROCCHICCIOLI. Ethanol in Brazil: Brief
Summary of the State of Industry in 1977. *Biotechnol.
Bioeng.*, XXI(7): 1107-1119, 1979.
- LOPES, C. H. Aspectos paramétricos e dimensionais da
fermentação alcoólica. *Alcool & Açúcar*. Ano nº 5, nº 21,
34-40, 1985.
- LYNEN, F. Biosynthesis of saturated fatty acids. *Fed. Proc.*,
20(4): 941-951, 1961.
- MAYEUX, P. A. *Some studies on the microbial flora of sugar
cane*. Louisiana, 1960. Thesis M.S. Louisiana State Univ.
Citação em SILLIKER et alii (1980).
- Mc CLESKEY, C. S. & FAVILLE, L. W. Characteristics of
Leuconostoc mesenteroides from cane juice. *J. Bacteriology*,
54: 697-708, 1947.

- Mc FADDIN, J. F. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. Baltimore, Waverly Press, 1980. 527p.
- Mc MASTER, L. & RAVNÖ, A. B. The occurrence of lactic acid and associated micro-organisms in cane sugar processing. *ISSCT*, 16 th Congress, 3: 2679-2693, 1977.
- MILLAR, D. G.; GRIFFITHS-SMITH, K., ALGAR, E. & SCOPES, R. K. Activity and stability of glycolytic enzymes in the presence of ethanol. *Biotechnol. Lett.* 4(9): 601-606, 1982.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*: 426-428, 1959.
- MUNDT, J. O. & HAMMER, J. L. Suppression of *Leuconostoc mesenteroides* during isolation of lactobacilli. *Appl. Microbiol.* 14(6): 1044, 1966.
- NAGODAWITHANA, T. W. & STEINKRAUS, K. H. Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in "rapid fermentation". *Applied and Environmental Microbiology*, 31(2): 158-162, 1976.
- NAVARRO, J. M. & DURAND, G. Fermentation alcoolique: influence de la température sur l'accumulation d'alcool dans les cellules de levure. *Ann. Microbiol.*, 129B: 215-224, 1978.
- NEVES, L. B. Tecnologia da fabricação do álcool. *Rev. Bras. Química*, 3: 89-134, 1938.
- NOVAK, M.; STREHAJANO, P.; MORENO, M. & GOMA, G. Alcoholic fermentation: on the inhibitory effect of ethanol. *Biotechnol. Bioeng.*, XXIII, 201-211, 1981.

- DURA, E. Effect of aeration intensity on the biochemical composition of baker's yeast. I Factors affecting the type of metabolism. *Biotechnology & Bioengineering*, XVI(9): 1197-1212, 1974a.
- DURA, E. Effect of aeration intensity on the biochemical composition of baker's yeast. II Activities of the oxidative enzymes. *Biotechnology and Bioengineering*, XVI(9): 1213-1225, 1974b.
- DURA, E. Reaction products of yeast fermentation. *Process Biochemistry*, 12(3): 19-21, 35, 1977.
- PAYNE, J. H. e ZARPELON, F. Controle de perdas de sacarose nas usinas. IN: *Anais do IV Seminário COPERSUCAR da Agroindústria Açucareira*, 1976. Águas de Lindóia, Cerifa Gráfica e Editora, 1976. p. 425- 430.
- PAZUR, J. H. Oligosaccharides. In: PIGMAN, W.; HORTON, D. & HERP, A. eds. *The Carbohydrates - Chemistry and Biochemistry*. USA, Academic Press, 1970. v. IIA, p. 109 e 123.
- PEDERSON, C. S. & HUCKER, G. J. The significance of bacteria in sugar mills, *Proc. Assoc. Technol. Azucar. Cuba*, 20 th. Mtg, 225-230, 1946.
- PHAFF, H. J.; MILLER, M. W. & MRAK, E. M. *The life of yeasts*. USA, Harvard University Press, 1966, p. 70-76.
- RIGHI, J. C. I. Técnicas utilizadas no corte da cana de açúcar. IN: *Anais do III Seminário COPERSUCAR da Agroindústria Açucareira*. Águas de Lindóia, 1975, 367-375.

- RODINI, M. A. T. *Isolamento, Caracterização e Identificação de Bactérias Contaminantes de Dornas de Fermentação nas Destilarias de Etanol*. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1985. 92p. Tese (mestr) - Universidade de São Paulo.
- ROLZ, C. Ethanol from sugar crops. *Enzyme Microbiology Technol.*, 3: 19, 1981.
- ROLZ, C. Conceptos sobre la biotransformacion de azucares a etanol combustible. *Interiência*, 7(3): 153-162, 1982.
- ROSE, A. H. Recent research on industrially important strains of *Saccharomyces cerevisiae*. In: SKINNER, F. A.; PASSMORE, S. M. & DAVENPORT, R. R. eds. *Biology and Activities of Yeasts*. USA, Academic Press, 1980. nº 9, 103-121.
- SATO, S; BRAZZACH, M. L. & AQUARONE, E. Estudo comparativo de diversos desinfetantes usados na fermentação alcoólica de mostos de melão de cana. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo*, 16(1/2): 133-144, 1980a.
- SATO, S.; BRAZZACH, M. L. e AQUARONE, E. Estudo comparativo entre vários desinfetantes para controle de contaminações nas fermentações alcoólicas de mostos de melão de cana. *Rev. Farm. Bioquím. Universidade S. Paulo*, 16(1/2): 122-132, 1980b.
- SERRA, G. E.; CEREDA, M. P.; FERES, R. J. F.; BERTOZO, M. T. e VICENTE, A. L. Contaminação da fermentação alcoólica "floculação do fermento". *Brasil Açucareiro*, XCIII(6): 336-341, 1979.

- SERRA, G. E.; CEREDA, M. P.; MENEGUIN, M. A.; PINTO, S. Z.; MARINO, E. A.; FERREIRA, L. J. e BETHIOL, A. E. Controle biológico da fermentação alcoólica em condições industriais. *IV Simpósio Internacional sobre Tecnologia dos Alcoois como Combustível*. Guarujá, 1980.
- SHARPE, M. E.; GARVIE, E. I. & TILBURY, R. H. Some slime forming heterofermentative species of the genus *Lactobacillus*. *Appl. Microbiol.* 23, 389-397, 1972.
- SILLIKER, J. H.; ELLIOTT, R. P.; BAIRD-PARKER, A. C.; BRYAN, F. L.; CHRISTIAN, J. H. B.; CLARK, D. S., Jr. OLSON, J. C. & ROBERTS, T. A. *Microbial Ecology of Foods*. Food Commodities by The International Commission on Microbiological Specifications for Foods. USA, Academic Press, 1980. p.778-789.
- SILVA, M. H. Inversion control in mill juice. *Sugar y Azucar*, 69(8): 25-27, 1974.
- SILVA, N. *Influência do resfriamento em torre sobre a microbiota do caldo de cana no processo de produção de álcool*. Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1988. 118p. Tese (mestr) - Universidade Estadual de Campinas.
- SKERMAN, V. B. *Abstracts of Microbiological Methods*. New York, John Wiley & Sons, 1969. p.38.
- SKOLE, R. D.; HOGRE, J. N. & RIZZUTO, A. B. Microbiology of sugar: a taxinomic study. *Tech. Sess. Cane Sugar Refin. Res.*, New Orleans, 1977.

- SOUZA, L. G.; GOLDONI, J. S. & EIRA, A. F. Microrganismos em melão armazenado. *Brasil Açucareiro*, nº 04: 204-206, 1977.
- SPENCER, J. F. T. & SPENCER, D. M. Genetic improvement of industrial yeasts. *Ann. Rev. Microbiol.*, 37: 121-142, 1983.
- STEFANIS, V. A. & Jr. PONTE, J. G. Separation of sugars by thin-layer chromatography. *J. Chromatography*, 34: 116-120, 1968.
- STREHAIANO, P. & GOMA, G. Effect of initial substrate concentration on two wine yeasts: relations between glucose sensitivity and ethanol inhibition. *Am. J. Enol. Vitic.*, 34(1), 1983.
- STUPIELLO, J. P. Qualidade de cana de açúcar para fabricação de açúcar e álcool. *Açúcar e Alcool*, nº 2: 28-32, 1982.
- STURION, A. C.; FERREIRA, L. J. e ROSSETO, A. J. Deterioração de toletes de cana-de-açúcar. In: *Anais do III Seminário COPERSUCAR da Agroindústria Açucareira*. Águas de Londóia, 381-386, 1975.
- THOMAS, D. S. & ROSE, A. H. Inhibitory effect of ethanol on growth and solute accumulation by *Saccharomyces cerevisiae* as affected by plasma-membrane lipid composition. *Archives Microbiol.* 122, 49-55, 1979.
- THOMPSON, C. C. *et alii*. Recommended methods of analyses. *The Institute of Brewing*, 43, 1977.
- TILBURY, R. H. Occurrence and effects of lactic acid bacteria in the sugar industry. In: *Lactic acid bacteria in beverages and food*. New York, Academic Press, 1975, p.177-191.

- TILBURY, R. H.; HOLLINGSWORTH, B. S.; GRAHAM, S. D. e POTTAGE, P. Mill sanitation - a fresh approach to biocide evaluation. *Proc. Congress ISSCT*, 16 th, 3: 2749-2767, 1977.
- TOUCHSTONE, J. C. & DOBBINS, M. F. *Practice of Thin Layer Chromatography*. 2^o ed., New York, John Wiley & Sons, 1983. 163-224.
- TYAGI, R. D. Participation of oxygen in ethanol fermentation. *Process Biochemistry*, 136-141, 1984.
- VAN DIJKEN, J. P. & SCHEFFERS, W. A. Studies on alcoholic fermentation in yeasts. In: HOUWINK, E. H. & VAN DER MEER, R. R. eds. *Innovations in Biotechnology*. Amsterdam, Elsevier Science Publishers B. V., 1984, 497-506.
- VAN UDEN, N. Temperature profiles of yeasts. *Advances in Microbial Physiology*, 25: 195-251, 1984.
- VIEGAS, C. A.; SÁ-CORREIA, I. & NOVAIS, J. M. Synergistic inhibition of the growth of *S. bayanus* by ethanol and octanoic or decanoic acids. *Biotechnol. Letters*, 7(8): 611-614, 1985.
- YOKOYA, F.; LUCREDI, H. A.; FINGUERUT, J.; LEIMER, K. H. & ROSSELL, C. E. V. Verificação da esterilidade do sistema de tratamento térmico do caldo de cana de açúcar para a fermentação. *Boletim Técnico COPERSUCAR*, 25-28, 1984.
- YOKOYA, F.; KAJI, D. A. & CANHOS, V. P. Cultivo de leveduras associadas com bactérias. *Resumos de Comunicação VII SINAFERM*, 2, 1986.

YOKOYA, F. Microbiologia de Processo: Fermentação. In: EGUCHI, S. Y.; YOKOYA, F.; CANHOS, V. P. & GALLO, C. R. eds. *Fontos Críticos Microbiológicos em Usinas de Açúcar e Alcool*. Campinas. Ed. Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, 1989.

APÊNDICE

1. NOMENCLATURA

- A = fator de frequência ou fator pré-exponencial
- Ea = energia de ativação
- kd = μ_{MAX} = velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1})
- P = etanol produzido (g/L)
- R = constante universal dos gases (1,98717 cal/mol.K)
- S = concentração de açúcares totais (g/L)
- Si = substrato inicial
- Sf = substrato fermentado
- T = temperatura
- X = concentração de massa celular seca (g/L)
- $Y_{X/S}$ = coeficiente de rendimento celular
- $Y_{P/S}$ = coeficiente de rendimento alcoólico
- Pr = produtividade global ($gL^{-1}h^{-1}$)
- UFC = Unidade Formadora de Colônia

2. EXPRESSÕES MATEMÁTICA

- (1) Coeficiente de rendimento celular (
- $Y_{X/S}$
-)

$$Y_{X/S} = \frac{\text{incremento da massa celular seca (g/L)}}{\text{açúcar consumido (g/L)}}$$

- (2) Coeficiente de rendimento alcoólico (
- $Y_{P/S}$
-)

$$Y_{P/S} = \frac{\text{etanol produzido (g/L)}}{\text{açúcar consumido (g/L)}}$$

- (3) Produtividade (
- Pr
-)

$$Pr = \frac{\text{etanol produzido (g/L)}}{\text{tempo de fermentação (h)}}$$

- (4) Equação de Arrhenius

$$\ln k_d = \ln A - E_a \frac{1}{R T}$$

Tabela 1. Porcentagem das características de viabilidade, brotamento e morte de leveduras dos inóculos de fermentação

ensaio						
1	82,5	16,8	0,0	0,0	0,0	0,7
2	85,6	13,7	0,0	0,0	0,0	0,7
3	79,3	18,4	0,2	0,0	0,3	1,8
4	88,3	11,7	0,0	0,0	0,0	0,0
5	86,3	12,9	0,0	0,0	0,3	0,5
6	83,8	16,0	0,0	0,0	0,2	0,0

- célula mãe ou tamanho maior que a metade da célula mãe viável.
- ◌ célula com brotamento, célula mãe e célula filha viáveis.
- ◐ célula com brotamento, célula mãe morta e célula filha viável.
- ◑ célula com brotamento, célula mãe viável e célula filha morta.
- ◒ célula com brotamento, célula mãe e célula filha mortas.
- célula mãe ou tamanho maior que a metade da célula mãe morta.

Tabela 2. Porcentagem das características de viabilidade, brotamento da *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-2342 após o término das fermentações alcoólicas (cultura pura)

T (°C)						
28	95,8	3,4	0,0	0,2	0,0	0,6
30	95,0	3,5	0,4	0,4	0,0	0,7
32	91,8	7,3	0,1	0,0	0,1	0,7
34	84,9	14,0	0,0	0,1	0,0	1,0
36	82,4	15,9	0,2	0,0	0,6	0,9
38	84,1	13,1	0,2	0,0	0,2	2,4
40	80,0	8,1	0,7	0,2	0,4	10,6

- célula mãe ou tamanho maior que a metade da célula mãe viável.
- ◌ célula com brotamento, célula mãe e célula filha viáveis.
- ◌ célula com brotamento, célula mãe morta e célula filha viável.
- ◌ célula com brotamento, célula mãe viável e célula filha morta.
- ◌ célula com brotamento, célula mãe e célula filha mortas.
- célula mãe ou tamanho maior que a metade da célula mãe morta.

Tabela 3. Porcentagem das características de viabilidade, brotamento e morte da *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-2342 após o término das fermentações alcoólicas (cultura contaminada por *Lactobacillus*).

T (°C)						
28	95,7	3,4	0,0	0,2	0,2	0,6
30	96,1	3,4	0,0	0,0	0,0	0,5
32	92,4	6,6	0,0	0,0	0,2	0,8
34	90,7	8,7	0,1	0,0	0,0	0,5
36	90,3	8,7	0,1	0,1	0,0	0,8
38	93,1	5,0	0,2	0,1	0,4	1,2
40	83,7	4,4	1,0	0,1	0,6	10,2

○ célula mãe ou tamanho maior que a metade da célula mãe viável.

◌ célula com brotamento, célula mãe e célula filha viáveis.

◌ célula com brotamento, célula mãe morta e célula filha viável.

◌ célula com brotamento, célula mãe viável e célula filha morta.

◌ célula com brotamento, célula mãe e célula filha mortas.

● célula mãe ou tamanho maior que a metade da célula mãe morta.

Tabela 4. Porcentagem das características de viabilidade, brotamento e morte da *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-2342 após o término das fermentações alcoólicas (cultura contaminada por *Leuconostoc*).

T(°C)						
28	96,6	2,7	0,0	0,0	0,1	0,6
30	96,3	3,4	0,0	0,0	0,0	0,3
32	94,1	5,0	0,0	0,1	0,0	0,8
34	92,2	6,8	0,1	0,0	0,0	0,9
36	90,1	8,5	0,2	0,0	0,1	1,1
38	91,4	6,4	0,0	0,0	0,3	1,9
40	73,6	4,3	1,5	0,3	3,9	16,4

-  célula mãe ou tamanho maior que a metade da célula mãe viável.
 célula com brotamento, célula mãe e célula filha viáveis.
 célula com brotamento, célula mãe morta e célula filha viável.
 célula com brotamento, célula mãe viável e célula filha morta.
 célula com brotamento, célula mãe e célula filha mortas.
 célula mãe ou tamanho maior que a metade da célula mãe morta.

Tabela 5. Porcentagem das características de viabilidade, brotamento e morte da *Saccharomyces cerevisiae* FTPT 0472 após o término das fermentações alcoólicas (cultura pura).

T (°C)						
28	81,8	18,0	0,0	0,0	0,0	0,2
30	82,1	17,7	0,0	0,0	0,0	0,2
32	79,9	19,6	0,1	0,0	0,3	0,1
34	80,7	18,7	0,0	0,0	0,1	0,5
36	83,9	15,6	0,0	0,1	0,1	0,3
38	86,2	13,3	0,0	0,1	0,1	0,3
40	89,1	4,3	0,1	0,5	0,5	5,5

- célula mãe ou tamanho maior que a metade da célula mãe viável.
- ◌ célula com brotamento, célula mãe e célula filha viáveis.
- ◌ célula com brotamento, célula mãe morta e célula filha viável.
- ◌ célula com brotamento, célula mãe viável e célula filha morta.
- ◌ célula com brotamento, célula mãe e célula filha mortas.
- célula mãe ou tamanho maior que a metade da célula mãe morta.

Tabela 6. Porcentagem das características de viabilidade, brotamento e morte *Saccharomyces cerevisiae* FTPT 0472 após o término das fermentações alcoólicas (cultura contaminada por *Lactobacillus*).

T (°C)						
28	85,6	13,8	0,1	0,0	0,0	0,5
30	76,8	22,6	0,0	0,0	0,2	0,4
32	79,7	19,8	0,0	0,0	0,2	0,3
34	80,8	18,1	0,0	0,0	0,1	1,0
36	81,5	16,9	0,1	0,1	0,3	1,1
38	90,1	8,7	0,2	0,2	0,2	0,6
40	80,0	7,7	0,6	0,3	1,5	9,9

- 0 célula mãe ou tamanho maior que a metade da célula mãe viável.
 célula com brotamento, célula mãe e célula filha viáveis.
 célula com brotamento, célula mãe morta e célula filha viável.
 célula com brotamento, célula mãe viável e célula filha morta.
 célula com brotamento, célula mãe e célula filha mortas.
 célula mãe ou tamanho maior que a metade da célula mãe morta.

Tabela 7. Porcentagem das características de viabilidade, brotamento e morte do *Saccharomyces cerevisiae* FTPT 0472 após o término das fermentações alcoólicas (cultura contaminada por *Leuconostoc*).

T (°C)						
28	78,3	21,5	0,0	0,0	0,1	0,1
30	79,9	19,1	0,1	0,3	0,0	0,6
32	81,7	17,3	0,2	0,2	0,0	0,6
34	83,2	15,8	0,0	0,0	0,2	0,8
36	85,5	13,4	0,0	0,2	0,0	0,9
38	85,9	11,3	0,0	0,0	0,7	2,1
40	77,9	9,4	0,2	0,0	1,3	11,2

○ célula mãe ou tamanho maior que a metade da célula mãe viável.

◌ célula com brotamento, célula mãe e célula filha viáveis.

◌ célula com brotamento, célula mãe morta e célula filha viável.

◌ célula com brotamento, célula mãe viável e célula filha morta.

◌ célula com brotamento, célula mãe e célula filha mortas.

● célula mãe ou tamanho maior que a metade da célula mãe morta.

Figura 8. Porcentagem das características de viabilidade, brotamento, morte do *S. cerevisiae* NRRL Y-2342 à temperatura de 30 °C em diferentes tempos (cultura contaminada por *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*).

tempo						
0	75,4	23,9	0,0	0,0	0,2	0,5
2	74,5	25,2	0,0	0,0	0,0	0,3
4	52,5	46,6	0,0	0,0	0,2	0,7
6	78,6	20,8	0,0	0,1	0,1	0,4
8	88,4	10,8	0,0	0,0	0,1	0,7
10	93,1	6,4	0,0	0,0	0,2	0,3
12	98,3	1,3	0,0	0,0	0,1	0,3
24	99,0	0,5	0,1	0,0	0,1	0,3
30	99,5	0,2	0,0	0,0	0,0	0,3

- 0 célula mãe ou tamanho maior que a metade da célula mãe viável.
-  célula com brotamento, célula mãe e célula filha viáveis.
-  célula com brotamento, célula mãe morta e célula filha viável.
-  célula com brotamento, célula mãe viável e célula filha morta.
-  célula com brotamento, célula mãe e célula filha mortas.
-  célula mãe ou tamanho maior que a metade da célula mãe morta.