

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

Estudo do efeito do uso de Brometo de Cetiltrimetilamônio no processo de fermentação alcoólica.

Ana Maria Volpato Jensen

Profa. Dra. Adilma Regina Pippa Scamparini

Orientadora

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Ana Maria Volpato Jensen, aprovada pela Comissão Julgadora em 12 de julho de 2000.

Campinas, 12 de julho de 2000.



Profa. Dra. Adilma R. P. Scamparini
Presidente da Banca

Tese apresentada à
Faculdade de Engenharia de Alimentos
da Universidade Estadual de Campinas
para a obtenção do Título de Mestre em
Ciência de Alimentos

Campinas - 2000

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



200012992

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/Unicamp
	5453.e
V.	Ex.
TOMBO BC/	42129
PROC.	16-278100
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREC	R\$ 99,00
DATA	19/09/00
N.º CPD	

453

CM-00144248-1

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

453
J435e

Jensen, Ana Maria Volpato

Estudo do efeito do uso de brometo de cetiltrimetilamônio no processo de fermentação alcoólica / Ana Maria Volpato Jensen. – Campinas, SP: [s.n.], 2000.

Orientador: Adilma Regina Pippa Scamparini
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Fermentação. 2.Saccharomyces cerevisae. 3.Álcool.
I.Scamparini, Adilma Regina Pippa. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

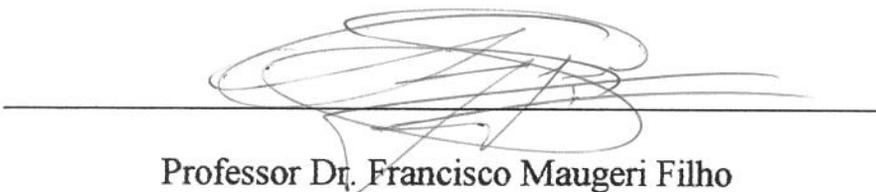
Estudo do efeito do uso de Brometo de Cetiltrimetilamônio no processo de fermentação alcoólica.

Banca Examinadora

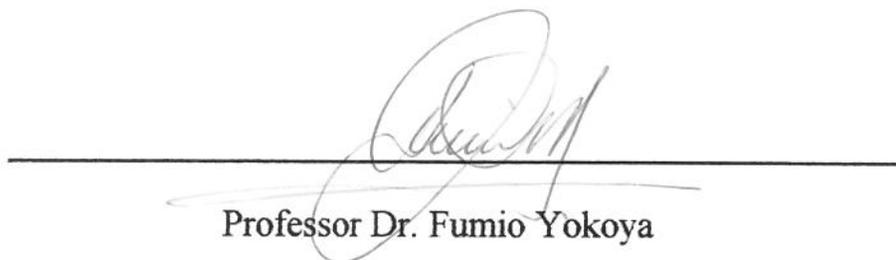


Professora Dra. Adilma Regina Pippa Scamparini

Professora Dra. Glaucia Maria Pastore



Professor Dr. Francisco Maugeri Filho



Professor Dr. Fumio Yokoya

Dedico:

Ao meu amor Francisco

ao meu novo amor Ana Carolina

aos meus pais, Nilsa e José Carlos

e à Liliana pelo carinho e apoio fundamentais

AGRADECIMENTOS

A Deus, que como Pai, acolheu-me em seu amor dando-me forças e entendimentos para essa caminhada.

Ao meu marido, Francisco, pelo amor, dedicação e compreensão.

À Ana Carolina pela transformação que estimulou em mim.

Às minhas duas famílias, que tiveram importante papel durante essa trajetória.

À minha Orientadora, Dra Adilma R. P. Scamparini, que não só forneceu-me o suporte técnico necessário, como também auxiliou-me nas adversidades do percurso com amizade e apoio.

À Profa Dra Hélia H. Sato, pela paciência e pelas informações.

Ao professor Gil Serra e ao Adilson Sartoratto pelos auxílios prestados nas análises de quantificação de etanol em cromatógrafo gasoso.

À CAPES pelo incentivo financeiro sem o qual não seria possível o desenvolvimento desse trabalho.

À Controlpav pela cessão do melaço.

À Helena Machado pela rapidez e agilidade em resolver problemas operacionais necessários ao bom andamento da parte experimental dessa tese.

Um agradecimento especial aos meus colaboradores diretos, citados aqui em ordem alfabética: Gisele, Glauce e Marcelo.

Ao pessoal da secretaria pelas informações e esclarecimentos.

A todos os colegas do laboratório de Ciência de Alimentos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a finalização de mais uma etapa em minha vida que me trouxe aperfeiçoamento profissional e grande crescimento pessoal.

Bendita a primavera da vida, breve,
cujo sopro tudo atravessa!
A forma desaparece
Enquanto o ser para a vida desperta
Gerações se sucedem
no esforço de evoluir;
Espécie produz espécie
Em tempos que não têm fim.
Mundos inteiros se erguem e declinam.
Mergulha nos encantos da vida, ó flor,
na ourela da primavera;
Louvando a bondade do eterno,
aproveita tua curta existência.
Acrescenta a ela, criativa,
também o teu óbulo;
Breve e hesitante,
Sopra o quanto agüentares,
A tua parcela de vida ao dia eterno!

BJØRNSTJERNE BJØRNSON, in Psalm II

ÍNDICE

Índice.....	i
Índice de tabelas.....	v
Índices de figuras.....	ix
Resumo.....	xiii
Summary.....	xv
1- INTRODUÇÃO.....	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1-Metabolismo de carboidratos na levedura.....	6
2.2- Alguns fatores que afetam a fermentação alcoólica.....	8
2.2.1- Oxigênio.....	9
2.2.2- Densidade celular.....	9

2.2.3- Temperatura.....	11
2.2.4- pH.....	14
2.2.5- Concentração de açúcares.....	15
2.2.6- Etanol.....	19
2.3- Uso de Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB) na fermentação alco ólica.....	21
2.3.1- Ação química do Brometo de Cetiltrimetilamônio.....	21
2.3.2- Efeito do Brometo de Cetiltrimetilamônio em leveduras duran te fermentações alcoólicas.....	24
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1- Material.....	28
3.1.1- Material permanente.....	28
3.1.2- Material de consumo.....	29
3.1.3- Microorganismo utilizado.....	30
3.1.4- Meios de cultura.....	30
3.2- Métodos.....	30
3.2.1- Determinação de umidade.....	30
3.2.2- Determinação de açúcares redutores totais no melaço.....	31
3.2.3- Preparação do pré-inóculo para a produção de células.....	31

3.2.4- Preparação do Inóculo para a fermentação alcoólica.....	31
3.2.5- Efeito de diferentes concentrações de CTAB na fermentação alcoólica de leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> AJ061 após 24 horas.....	32
3.2.6- Estudo da produção de células de leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> AJ061 utilizadas na fermentação alcoólica após 24 horas.....	33
3.2.7- Estudo da fermentação alcoólica de leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> AJ061 após 24 horas com adição de CTAB.....	33
3.2.8- Efeito da redução do tempo de fermentação alcoólica realizada com leveduras comerciais <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
3.2.9- Produção de células de leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae AJ061</i> para a fermentação alcoólica rápida.....	34
3.2.10- Estudo da fermentação alcoólica de leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> AJ061 realizada após 3 horas com adição de CTAB.....	36
3.2.11- Análise quantitativa da produção de etanol.....	36
 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	 38

4.1- Influência de diferentes concentrações de CTAB na fermentação alcoólica de leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> AJ061 após 24 horas.....	38
4.2- Estudo para a produção de células de leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> AJ061 para fermentação alcoólica durante 24 horas.....	43
4.3- Estudo da fermentação alcoólica de leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> AJ061 após 24 horas com adição de CTAB.....	51
4.4- Redução do tempo de fermentação alcoólica realizada com leveduras comerciais <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	59
4.5- Produção de células de leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> AJ061 para a fermentação alcoólica rápida.....	64
4.6- Estudo da fermentação alcoólica de leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> AJ061 após 3 horas com adição de CTAB.....	69
5- CONCLUSÕES.....	78
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1- Dados relativos ao efeito da concentração de 0.2% de CTAB na fermentação alcoólica de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 250 ml de melaço com 24% de açúcares redutores totais e 700 ppm de KH₂PO₄ a 30° C após 24 horas.....39
- Tabela 2- Dados relativos ao efeito de diferentes concentrações de CTAB na fermentação alcoólica de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 250 ml de melaço com 24% de açúcares redutores totais e 700 ppm de KH₂PO₄ a 30° C após 24 horas.....41
- Tabela 3- Dados relativos ao efeito de diferentes temperaturas de crescimento de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 50 ml de melaço com 10% de açúcares redutores totais e 700 ppm de KH₂PO₄ a pH 5.0 após 24 horas, fermentadas posteriormente em 250 ml de melaço com 24% de açúcares redutores totais e 700 ppm de KH₂PO₄ a 30° C após 24 horas.....45
- Tabela 4- Dados relativos ao efeito de diferentes valores de pH sobre o crescimento de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 50 ml de melaço com 10% de açúcares redutores totais e 700 ppm de KH₂PO₄ a 30° C após 24 horas e fermentadas posteriormente em 250 ml de melaço com 24% de

açúcares redutores totais e 700 ppm de KH₂PO₄ a 30° C após 24 horas.....47

Tabela 5- Dados relativos ao efeito de diferentes concentrações de açúcares redutores totais do melaço sobre o crescimento de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 50 ml de melaço e 700 ppm de KH₂PO₄ a pH 5.0 a 30° C após 24 horas, fermentadas posteriormente em 250 ml de melaço com 24% de açúcares redutores totais e 700 ppm de KH₂PO₄ a 30° C após 24 horas.....49

Tabela 6- Dados relativos ao efeito de diferentes temperaturas na fermentação alcoólica de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 250 ml de melaço com 24% de açúcares redutores totais, 700 ppm de KH₂PO₄ e 0.0025 % de CTAB após 24 horas.....53

Tabela 7- Dados relativos ao efeito de diferentes valores de pH na fermentação alcoólica de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 250 ml de melaço com 24% de açúcares redutores totais, 700 ppm de KH₂PO₄ e 0.0025 % de CTAB a 30° C após 24 horas.....55

Tabela 8- Dados relativos ao efeito de diferentes concentrações de açúcares redutores totais do melaço na fermentação alcoólica de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 250 ml de melaço, 700 ppm de KH₂PO₄, 0.0025 % de CTAB e pH 5.5 a 30° C após 24 horas.....57

Tabela 9- Dados relativos à influência de diferentes densidades celulares de leveduras comerciais *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação alcoólica em 100 ml de melão com 24% de açúcares redutores totais, 700 ppm de KH₂PO₄ a 30° C após 3 horas.....60

Tabela 10- Dados relativos à influência de diferentes densidades celulares de leveduras comerciais *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação alcoólica em 250 ml de melão com 24% de açúcares redutores totais, 700 ppm de KH₂PO₄ a 30° C após 3 horas.....61

Tabela 11- Dados relativos à produção de células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em diferentes volumes de melão com 10% de açúcares redutores totais, 700 ppm de KH₂PO₄ e pH5.0 a 30° C após 24 horas65

Tabela 12- Dados relativos à produção de células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 sob diferentes condições de agitação (rpm) do meio contendo 1000 ml melão com 10% de açúcares redutores totais, 700 ppm de KH₂PO₄ e pH 5.0 a 30° C após 24 horas.....66

Tabela 13- Dados relativos ao efeito de diferentes temperaturas na fermentação alcoólica de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 100 ml de melão

com 24% de açúcares redutores totais, 700 ppm de KH_2PO_4 , 0.0025 % de CTAB a pH 5.5 após 3 horas.....72

Tabela 14- Dados relativos ao efeito de diferentes valores de pH na fermentação alcoólica de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 100 ml de melaço com 24% de açúcares redutores totais, 700 ppm de KH_2PO_4 , 0.0025 % de CTAB a 35° C após 3 horas.....74

Tabela 15- Dados relativos ao efeito de diferentes concentrações de açúcares redutores totais na fermentação alcoólica de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 100 ml de melaço 700 ppm de KH_2PO_4 , 0.0025 % de CTAB e pH 5.5 a 35° C após 3 horas.....76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Influência de diferentes concentrações de CTAB na fermentação alcoólica de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 250 ml de melaço com 24% de açúcares redutores totais e 700 ppm de KH_2PO_4 a 30° C após 24 horas e analisadas através de cromatografia gasosa.....42

Figura 2- Influência de diferentes temperaturas de crescimento de células da linhagem *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 50 ml de melaço com 10% de açúcares redutores totais, 700 ppm de KH_2PO_4 a pH 5.0 durante 24 horas, no rendimento em etanol quando fermentadas em 250 ml de melaço com 24% de açúcares redutores totais, 700 pm de KH_2PO_4 a 30° C após 24 horas e analisadas através de cromatografia gasosa.....46

Figura 3- Influência de diferentes valores de pH no crescimento de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 50 ml de melaço com 10% de açúcares redutores totais, 700 ppm de KH_2PO_4 a 30° C durante 24 horas e fermentadas em 250 ml de melaço com 24% de açúcares redutores totais, 700 ppm de KH_2PO_4 a 30°C após 24 horas e analisadas através de cromatografia gasosa.....48

Figura 4- Influência de diferentes concentrações de açúcares redutores totais no crescimento de leveduras *Saccharomyces cervisiae* AJ061 em 50 ml de

melaço, 700 ppm de KH_2PO_4 e pH 5.0 a 30° C após 24 horas e fermentadas em 250 ml de melaço com 24% de açúcares redutores totais, 700 ppm de KH_2PO_4 a 30° C após 24 horas e analisadas através de cromatografia gasosa.....50

Figura 5- Influência de diferentes temperaturas na fermentação alcoólica de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 250 ml de melaço com 24% de açúcares redutores totais, 700 ppm de KH_2PO_4 , 0.0025 % de CTAB após 24 horas e analisadas através de cromatografia gasosa.....54

Figura 6- Influência de diferentes valores de pH na fermentação alcoólica de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 250 ml de melaço com 24% de açúcares redutores totais, 700 ppm de KH_2PO_4 e com 0.0025 % de CTAB a 30°C após 24 horas e analisadas através de cromatografia gasosa.....56

Figura 7- Influência de diferentes concentrações de açúcares redutores totais na fermentação de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 250 ml de melaço com 700 ppm de KH_2PO_4 e com 0.0025 % de CTAB e pH5.5 a 30° C após 24 horas e analisadas através de cromatografia gasosa.....58

Figura 8- Influência de diferentes densidades celulares de leveduras comerciais *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação alcoólica em 100 ml e em 250 ml de melaço com 24% de açúcares redutores totais com 700 ppm de KH_2PO_4 a 30° C após 3 horas e analisadas através de cromatografia gasosa.....62

Figura 9- Influência de diferentes volumes do meio na produção de células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 contendo melaço com 10% de açúcares redutores totais, 700 ppm de KH_2PO_4 e pH 5.0 a 30° C após 24 horas no crescimento celular.....67

Figura 10- Influência de diferentes condições de agitação (rpm) do meio de produção de células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 contendo 1000 ml de melaço com 10% de açúcares redutores totais, 700 ppm de KH_2PO_4 e pH 5.0 a 30° C após 24 horas no crescimento celular.....68

Figura 11- Influência de diferentes temperaturas na fermentação alcoólica de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 100 ml de melaço com 24 % de açúcares redutores totais com 700 ppm de KH_2PO_4 , 0.0025 % de CTAB a pH 5.5 após 3 horas e analisadas através de cromatografia gasosa.....73

Figura 12- Influência de diferentes valores de pH na fermentação alcoólica de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 100 ml de melaço com 24 %

de açúcares redutores totais com 700 ppm de KH_2PO_4 e com 0.0025 % de CTAB a 35° C após 3 horas e analisadas através de cromatografia gasosa.....75

Figura 13- Influência de diferentes concentrações de açúcares redutores totais na fermentação alcoólica de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 100 ml de melaço, 700 ppm de KH_2PO_4 , 0.0025 % de CTAB e pH 5.5 a 35° C após 3 horas e analisadas através de cromatografia gasosa.....77

RESUMO

Foi conduzido um estudo sobre o efeito do Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB) em Fermentação Alcoólica com células da linhagem AJ061 da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que foi isolada na região do Estado de São Paulo, além de linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* comerciais, com o intuito de se estabelecer uma concentração abaixo da letal para leveduras e que promovesse um aumento na produção do álcool. Foram também avaliados os efeitos de diferentes parâmetros, tais como: temperatura, pH e concentração de açúcares redutores totais do melaço, tanto na produção de células quanto no processo de fermentação alcoólica, com a utilização de CTAB, sendo realizadas fermentações alcoólicas por um período de 24 horas e fermentação rápida. Foi estabelecido que a concentração ótima de CTAB para estimular a produção de álcool, tanto para fermentação tradicional quanto para a rápida, foi a de 0.0025 %, ou seja 2,5 ppm de CTAB.

Neste estudo, foram feitos ensaios em frascos de erlenmeyer de 250 ml e 2000 ml (com agitação de 100 rpm) contendo 50 ml e 1000 ml de melaço, respectivamente, para promover o crescimento celular das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061, posteriormente utilizadas na fermentação alcoólica acrescida de 0.0025 % de CTAB. Determinou-se que o melaço a 10% de açúcares redutores totais promovia melhor crescimento celular, sendo que as condições ótimas de temperatura e pH ficaram estabelecidas em 30° C e pH 5.0, no período de 24 horas.

Na fermentação alcoólica, foram realizados ensaios em frascos erlenmeyer de 500 ml contendo 250 ml de melação e avaliados através da variação de massa segundo a metodologia citada por PARK & RIVERA (1982). Determinou-se que o melação a 24% de açúcares redutores totais promovia uma melhor fermentação alcoólica das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061, tanto para o período de 24 horas quanto para o de 3 horas de fermentação, sendo que as condições ótimas de temperatura e pH, para esta linhagem, ficaram estabelecidas em 30° C e pH 5.5, no período de 24 horas, na presença de 0.0025 % de CTAB e 35° C em pH 5.5 no período de 3 horas, na presença de 0.0025 % de CTAB.

Quanto aos resultados das análises cromatográficas, realizadas em Cromatógrafo Gasoso, os dados fornecidos da quantificação de etanol produzido, demonstraram que o uso de CTAB em fermentação alcoólica acarreta no aumento da quantidade de etanol produzida em comparação com fermentação alcoólica onde não há o uso do referido composto.

SUMMARY

A study has been made about the effects of Cetyltrimethylammonium Bromide (CTAB) in alcoholic fermentation with of *Saccharomyces cerevisiae*, yeast strain, called AJ061, wich was isolated in the state of São Paulo, apart from commercial strain of *Saccharomyces cerevisiae*, in order to establish a concentration below lethal wich would in turn cause an increase in alcohol production. The effects of different parameters were also evaluated, such as: temperature, pH and concentration of reducing sugar in sugar cane molasses, not only in the production of cells but also in their alcoholic fermentation, using CTAB. This experiment was acomplished in 24 hours and a 3-hour-period, wich is called rapid fermentation. It was then established that the best CTAB concentration to estimulate alcohol production, either tradicional or fast, was 0.0025% or 2.5 ppm of CTAB.

In this study, tests have been carried out in erlenmeyers flasks of 250 ml and 2000 ml (shaking at 100 rpm) containing 50 ml and 1000 ml of sugar cane molasses, respectively, to promote the cell growth of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain AJ061, subsequently used in a alcoholic fermentation with na addition of 0.0025% of CTAB. It was determined that molasses with 10 % reducing sugar would optimize cell growth and the optimal temperature and pH were established at 30° C and pH 5.0 respectively, for 24 hours.

In the alcoholic fermentation, tests were done in erlenmeyer flasks of 500 ml, with 250 ml of molasses, and evaluation was made by means of mass change, according to the methodology mentioned by PARK & RIVERA (1982). It was determined that molasses containing 24% of reducing sugar would promote the optimum alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain AJ061, either for a 24 hour and 3 hour period of fermentation and the best temperature and pH conditions for lineage were set up at 30° C and pH 5.5, for a 24 hour period, with the addition of 0.0025 % , and 35° C and pH 5.5 for 3 hou period, with addition of 0.0025 % of CTAB.

As for the cromatographic analyses, done in Gas Cromatograph, the results obtained of the amount of ethanol produced, confirm wich the use of CTAB in the alcoholic fermentation cause an increase in the amount of alcohol production when compared with the alcoholic fermentation without the CTAB.

1- INTRODUÇÃO

O álcool é um composto amplamente utilizado nas indústrias de alimentos, farmacêutica, no setor médico-hospitalar, em processos de sanitizações, na perfumaria, na cosmética, na precipitação de biopolímeros e como combustível.

Na área alimentícia, seu emprego pode ser direcionado para a higienização de restaurantes e indústrias, além do uso direto em produtos de confeitaria e panificação, sobremesas, e bebidas alcoólicas, as quais, também podem ser adicionadas no preparo de pratos da culinária de diversos países, principalmente da cozinha francesa, o que é altamente significativo em termos econômicos, tendo-se em vista a expansão do setor de turismo e lazer, que vem demonstrando sua solidez e importância no mundo todo como um dos empreendimentos mais promissores para o próximo milênio.

Na área de combustíveis, sabe-se que a crise mundial do petróleo, a crescente conscientização ambiental e a necessidade de se encontrar recursos energéticos renováveis e menos poluidores estão reascendendo os estudos desse derivado da cana-de-açúcar.

A produção de etanol vem se tornando um dos grandes atrativos mundiais devido ao fato desse álcool ser adicionado à gasolina, formando uma

mistura dos chamados “oxigenados” que melhoram a qualidade do ar nas cidades.

Os compostos oxigenados como o etanol, metanol, entre outros, têm sido apresentados por entidades de pesquisa que comprovam os benefícios de seu uso em misturas com a gasolina. Tanto o metanol quanto o etanol, começaram a ser usados na década de 20, quando as gasolinas disponíveis no mercado eram de baixo índice de octano (I.O.) e a característica de alto I. O. desses álcoois era extremamente importante para ajustar a qualidade do combustível. Portanto, a principal função da mistura de “oxigenados” à gasolina está ligada ao aumento do I.O. , sendo considerados os melhores substitutos ao chumbo tetraetila, cujo uso está sendo banido no mundo por motivos ambientais, toxicológicos e técnicos. No caso do Brasil, o etanol é produzido a partir da biomassa de cana-de-açúcar, cujo resultado em relação à pureza de composição molecular é bastante elevada, se comparado com outros processos. (POLATI, 1996).

Vários países estão adotando leis ambientais que obrigam a utilização dessas misturas. A Suécia já possui ônibus movidos 100% a álcool e está colocando 15% de álcool no diesel, utilizando uma tecnologia australiana. A indústria automobilística americana está colocando no mercado veículos capazes de rodar com 85% de álcool adicionado à gasolina. (FURTADO, 1996).

Tudo isso corrobora com a importância da via fermentativa na produção do etanol e justifica a pesquisa de base para o aperfeiçoamento dessa técnica no sentido de aumentar a produção de álcool.

Nosso interesse, neste estudo, foi o de adaptar uma metodologia que permitisse a adição de um sal de amônio quaternário - Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB) - no processo fermentativo propriamente dito, para que este possibilitasse a modificação da permeabilidade da membrana celular das leveduras, com conseqüente aumento no transporte de substratos e cofatores para o interior da célula, resultando no aumento da quantidade de álcool produzida e, também, facilitando a saída do etanol para o meio extracelular, colaborando dessa forma com mais um fator positivo na melhora da produtividade alcoólica. Estes eventos, aliados ao fato de que o CTAB altera o metabolismo da levedura, através do desvio do substrato para a via de produção de etanol (UENO, 1992), provavelmente possibilitam maior eficiência na conversão da sacarose em etanol, uma vez que, a levedura não mais faz uso concomitante do substrato para produção de biomassa e álcool

Foram avaliados os parâmetros tanto do crescimento celular quanto da fermentação alcoólica, tais como:

-Determinação da concentração de CTAB que atuasse benéficamente sobre as leveduras aumentando a produção de álcool no processo fermentativo;

-Otimização das condições do processo de crescimento celular, no período de 24 horas, através da determinação dos parâmetros referentes à: densidade celular, volume do meio de produção, aeração (rpm), temperatura, pH e concentração de açúcar do meio, para a linhagem de levedura selecionada, a qual denominamos de AJ061;

-Otimização das condições do processo de fermentação alcoólica acrescida de CTAB, no período de 24 horas e também em fermentação acelerada, no período de 3 horas, através da determinação dos parâmetros referentes à: densidade celular necessária para viabilidade do método, temperatura, pH e concentração de açúcar do meio, utilizando para isto a levedura selecionada (*Saccharomyces cerevisiae* AJ061) e as linhagens de leveduras comerciais (*Saccharomyces cerevisiae* - Fleischmann).

Cabe finalmente acrescentar, uma vez que, a maioria das bebidas alcoólicas fermentadas como: água ardente, uísque, conhaque, gim, tequila, vodca, grapa e rum, são produzidas usando-se linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, o uso de CTAB junto a essas leveduras, com o intuito de aumentar a quantidade de etanol produzida, não implicará em nenhuma toxidez prejudicial à produção dessas bebidas. Uma vez que produzido o álcool, o produto obtido passa por um ou mais processos de destilação, havendo desta forma, a possibilidade da retirada de resquícios de CTAB da bebida.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A produção industrial de álcool é realizada utilizando-se leveduras fermentativas, dentre elas, as que apresentam maior utilidade são do gênero *Saccharomyces sp.* Isso se deve, principalmente ao fato de que, tais leveduras apresentam maior tolerância às modificações nas condições do meio (ROSE,1980).

Os microorganismos envolvidos nas fermentações devem crescer em altas concentrações de açúcar e ter alta tolerância ao álcool entre outras características (SKOTNICKI *et al.*, 1981).

Com relação ao substrato envolvido na fermentação, tanto o melaço quanto o caldo de cana, contém os principais componentes nutritivos: carbono, nitrogênio e Fósforo (CAMHI, 1979), sendo que na composição do melaço, temos: 20% de água, 62% de açúcares, 8% de cinzas, 3% de materiais nitrogenados, 7% de outros (gomas e ácidos) e na fração-açúcares distingue-se: 32% sacarose, 14% dextrose e 16 % levulose. Podemos ressaltar ainda, que o melaço é amplamente utilizado como matéria-prima para a produção de etanol por razões econômicas (TAKESHIGE & OUCHI, 1995).

2.1- Metabolismo de carboidratos na levedura

O metabolismo das leveduras é um evento de duas atividades interligadas mas divergentes: Catabolismo e Anabolismo. Processos anabólicos, não ocorrem espontaneamente, eles são dirigidos por um fluxo de energia proveniente dos processos catabólicos. O mais comum desses processos catabólicos é a degradação de carboidratos a CO₂ e H₂O. As leveduras são reconhecidas como economicamente importantes por causa de duas reações de produção de energia: a respiração oxidativa e a fermentação (HALÁSZ & LASZTITY, 1995). Ou seja, por serem microorganismos anaeróbicos facultativos, as leveduras podem respirar ou fermentar o substrato, e a contribuição de cada um desses eventos depende das condições do meio (GANCEDO & SERRANO, 1989).

No consumo do substrato pelas leveduras, a parede celular possui um importante papel por ser metabolicamente ativa, ter porosidade e reter certas enzimas essenciais no transporte de moléculas complexas para o interior da célula. O envelope da célula de levedura consiste da parede celular e da membrana plasmática, separadas pelo espaço periplásmico. A parede celular é construída quase inteiramente de duas classes de polissacarídeos, manoproteínas (composta de polímeros de manose ligados covalentemente a peptídeos) e glucanos (polímeros de glicose) (SMART, 1995).

O substrato mais utilizado pelas leveduras, a nível industrial, é a sacarose. Em estágios iniciais de fermentação, a sacarose é hidrolizada por ação da enzima invertase a seus monossacarídeos estruturais, glicose e frutose, sendo transportada através da membrana celular (de la FUENTE & SOLS, 1962). Segundo CARTWRIGHT *et al.* (1989), esses açúcares ultrapassam a membrana através de difusão facilitada por permeases específicas e são fosforilados logo em seguida fluindo para a via *Embden-Meyerhof Parnas* (EMP).

BARFORD *et al.* (1992), entretanto, propõem um modelo para a utilização da sacarose no crescimento celular, relatando que, tanto ela quanto seus produtos hidrolizados entram para o interior da célula. Isto foi confirmado por MWESIGYE & BARFORD (1994), num estudo realizado com açúcares marcados. Eles demonstraram que a sacarose pode ser diretamente transportada para o interior da célula da *Saccharomyce cerevisiae* sem ser hidrolizada aos seus monossacarídeos estruturais. O sistema de transporte da sacarose é induzido num tempo suficiente para a adaptação da célula ao meio desse açúcar. Eles observaram, também, que a sacarose pode ser diretamente transportada para o interior das células igualmente em presença de invertase. Após a absorção do substrato, os produtos hidrolizados: glicose e frutose são fosforilados e fluem para a via da Hexose Difosfato, conhecida como via EMP. Esta via converte glicose em piruvato sem perdas de carbono reduzindo 2 moles de coenzima NAD⁺ e gerando moles de ATP. A reação se apresenta como a seguir:



O piruvato é o substrato que promove reações aeróbicas e também um componente chave para o metabolismo anabólico.

Segundo JONES *et al.* (1981), concentrações de glicose acima de 50 - 100 mg/ml ou ausência de oxigênio levam a fermentação da glicose a etanol.

Segundo CHAPMAN & BARTLEY (1968), o que ocorre em concentrações de glicose maiores que 2 g/l é a repressão catabólica das enzimas respiratórias, tornando a fermentação a principal via de degradação do açúcar, mesmo em condição de aerobiose. Sobre essas condições o piruvato ou seus produtos de transformações também agem como agente de reoxidação para o NADH₂. Essa repressão também é denominada efeito Crabtree (RATLEDGE & EVANS, 1989).

O passo final da via envolve a decarboxilação do piruvato a acetaldeído e NADH₂, mediante redução do acetaldeído a etanol. A via resulta na síntese de ATP e a liberação de energia livre, em adição à produção de etanol:



2.2- Alguns fatores que afetam a fermentação alcoólica

2.2.1- Oxigênio

O oxigênio é essencial para a boa fermentação agindo, primeiramente, como aceptor terminal de elétrons da cadeia respiratória e parece estar envolvido na síntese de ácido oleico e ergosterol, que estimulam o crescimento das leveduras sob condições anaeróbicas (ANDREASEN *et.al.*, 1954).

A maioria das cepas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* requerem oxigênio como fator de crescimento. Entretanto quando usadas nas fermentações alcoólicas são anaeróbicas facultativas, portanto, crescem tanto na presença quanto na ausência de oxigênio. Nas condições de anaerobiose, a *S. cerevisiae* produz etanol e CO₂ a partir da glicose e de outros açúcares, através do metabolismo fermentativo. Em presença de oxigênio, o açúcar é convertido em células e CO₂, através do metabolismo oxidativo. Na maioria das vezes, o limiar destes dois metabolismos é indistinto, e os dois sistemas coexistem durante a fermentação. Quando traços de oxigênio estimulam a velocidade de fermentação ocorre o chamado efeito Pasteur negativo. (EGUCHI, 1995).

2.2.2- Densidade celular

Segundo FIECHTER *et al.* (1981), o termo Crescimento Celular é definido como: A proliferação de células expressadas na formação de biomassa com simultânea assimilação da fonte de carbono presente em concentração adequada.

A proliferação celular, ou seja, a formação da biomassa, é um fator de grande importância para os processos de produção de álcool. De acordo com NAGODAWITHANA *et al.* (1974), um grande aumento da massa celular leva a “fermentação rápida”, o que significa um aumento no conteúdo de etanol de zero a 95% (p/v) em 6 horas ou menos.

NAGODAWITHANA & STEINKRAUS (1976), observaram que em fermentações rápidas (3 h a 30° C), contendo alta população de células, ocorria uma taxa de morte exponencial e atribuíram esse fato à toxidez do etanol intracelular.

STREHAIANO *et al.* (1983), concluíram em seus estudos que altas concentrações iniciais de células ocasionam menor crescimento celular durante o processo, o que é de grande relevância, uma vez que possam permitir maiores taxas de produção do etanol.

A alta concentração do inóculo obtém maior eficiência na fermentação, decorrente de um menor consumo de açúcar utilizado para a formação de células (AMORIM *et al.*, 1985). VEGA *et al.* (1987), concluíram que o aumento da concentração do inóculo diminui a severidade da inibição pelo etanol, sugerindo que essa variável fosse incluída nos modelos cinéticos de inibição da fermentação pelo etanol.

PANCHAL & TAVARES (1990), sugerem que nas condições industriais da fabricação do etanol combustível, a fermentação rápida só é permitida devido às elevadas concentrações de inóculo utilizadas e também das elevadas temperaturas empregadas, cerca de 40° C ou mais.

2.2.3- Temperatura

As reações individuais que ocorrem com as células são influenciadas pela temperatura de maneira geral. O efeito desta, tem influência global desde as reações cooperativas do crescimento até a formação de produtos no interior da célula. Sem dúvida, a temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes nas atividades dos microorganismos (WATSON, 1987).

Segundo ARTHUR *et al.* (1976), as leveduras do gênero *Saccharomyces* sp são tipicamente mesófilas e o limite para o seu crescimento tem sido descrito em torno de 35° C. Numa visão mais ampla podemos dizer

que os microorganismos crescem mais rapidamente com o aumento da temperatura, mas somente até alcançarem uma temperatura considerada ótima, sendo que os limites das temperaturas de tolerância poderão ser variáveis. A temperatura usada mais freqüentemente para incubação de leveduras varia de 30 a 35° C e o crescimento das células é grandemente reduzido em torno de 20° C, além de não haver habilidade de crescimento a temperatura de 60 - 70° C (HALÁSZ & LÁSZTITY, 1995).

Segundo JONES *et al.* (1981), as espécies de *Saccharomyces* apresentam altas taxas de crescimento a temperaturas entre 28° e 35° C e não crescem acima de 40° C, sendo a temperatura ótima para a fermentação de 5° a 10° C acima do ótimo para o crescimento.

CIFTCI *et al.* (1983), observaram que a produtividade do álcool aumentou grandemente de 30° a 35° C, atingindo valores máximos entre 40° e 42.5° C. Tal aumento na produção do etanol pode ser devido ao fato da temperatura de 40° C favorecer a atividade da álcool desidrogenase (JONES *et al.*, 1981).

WATSON (1987), considerou que a temperatura ótima para o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* encontra-se na faixa de 25 a 30° C.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

D'AMORE *et al.* (1987), observaram que em temperaturas mais elevadas (40° C) ocorre um aumento na permeabilidade da membrana plasmática em consequência da alteração da composição de ácidos graxos. Ocorre que, em temperaturas elevadas, há um acréscimo de ácidos graxos insaturados que proporcionam ótima fluidização na membrana para atividades celulares.

PANCHAL & TAVARES (1990), concluíram que leveduras termotolerantes são as que crescem a 40° C ou acima, mas que apesar disso, a desvantagem se encontra na redução da sua capacidade de fermentar a essa mesma temperatura. No caso específico da *S. cerevisiae* a utilização de temperaturas mais elevadas reduz o tempo de fermentação, embora aumente a taxa de morte celular (NAGODAWITHANA *et al.*, 1974). Isto ocorre devido a sensibilidade dessa levedura ao etanol em temperaturas mais elevadas (D'AMORE & STEWART, 1987).

van UDEN (1985) já havia descrito, que não havendo acúmulo de etanol na célula, o efeito inibitório do álcool sobre a fermentação torna-se significativo somente à altas temperaturas.

LALUCE *et al.* (1990), observaram que a conversão completa do açúcar total para etanol foi percebida depois de 12 horas de fermentação a 39° - 40° C. Acima de 40° C houve um forte efeito inibitório da temperatura na formação do etanol.

YAMAMURA *et al.* (1991), concluíram que células de leveduras crescendo a temperaturas elevadas são sujeitas facilmente a lise celular por causa de uma possível alteração na estrutura da membrana plasmática e consequentemente da parede celular, devido ao aumento da fluidização da membrana. Os autores observaram que a *S. cerevisiae* ATCC 7753 a temperatura de 36° , 38° e 40° C sofre uma debilitação no seu crescimento. Alterações significantes na membrana e na parede celular, que não são visíveis ao microscópio eletrônico, mas podem ser detectáveis por análises bioquímicas, poderiam ocorrer às altas temperaturas. De fato, estes autores encontraram que a composição de lipídeos foi marcadamente mudada, assim como o controle da fluidização da membrana apresentou estar aumentado.

2.2.4- pH

O pH tem menos efeito nas atividades biológicas do que a temperatura, porque a célula tem boa habilidade para regular a concentração de íons hidrogênio internamente diante das condições externas adversas, entretanto, o requerimento energético deste processo é alterado. O pH do meio externo também pode ter efeitos na estrutura e na permeabilidade da membrana celular (HALÁSZ & LÁSZTITY, 1995).

No plano industrial, os valores de pH dos meios fermentativos geralmente encontram-se na faixa de 4.5 a 5.0 com boa capacidade

tamponante, sendo que a maioria das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* crescem em amplo intervalo de pH que varia de 2.4 a 8.6 e fermentam em intervalo de pH que varia de 3.5 a 6.0 (JONES *et al.*, 1981)

GAO & FLEET (1988), observaram que a diminuição do pH externo de 6.0 para 3.0 aumenta a sensibilidade da levedura ao etanol.

2.2.5- Concentração de açúcares

A alta concentração de substrato permite um alto teor alcoólico, embora, segundo NAGODAWITHANA *et al.* (1974) os efeitos danosos são sentidos pela levedura, ocorrendo redução no crescimento, na fermentação e na viabilidade da mesma.

OURA (1974), relatou que em condições aeróbicas e de baixas concentrações de glicose, a levedura degrada o açúcar em gás carbônico e água via ciclo dos ácidos tricarbóxicos e cadeia respiratória - conhecido como Efeito Pasteur - e que em concentrações de glicose maiores ocorre repressão dessas atividades - Efeito Pasteur negativo - favorecendo a formação de etanol e gás carbônico, também conhecido como Efeito Crabtree.

PANCHAL & STEWART (1980), observaram uma queda na produção de etanol com aumento da pressão osmótica proporcionada pela

sacarose, fato esse atribuído ao aumento na produção de glicerol. O que ocorre é que o glicerol difunde-se mais rapidamente para fora da célula, diminuindo a saída do etanol. Com isso, a presença de maiores quantidades de etanol intracelular diminuem tanto a fermentação quanto a viabilidade da célula.

JONES *et al.* (1981), descreveram que a concentração de glicose na faixa de 0.2 a 1.0 g/l ou superiores, implicam na repressão da síntese de enzimas e das atividades respiratórias

Segundo DIJKEN & SCHEFFERS (1984), a *Saccharomyces cerevisiae* é considerada como microorganismo Crabtree positivo, apresentando boa capacidade fermentativa mesmo em condições aeróbicas e nesse caso existe um excesso de glicose no meio. Tais autores consideram que, a concentração de glicose é o parâmetro decisivo nas culturas de *S. cerevisiae* que governa o desenvolvimento tanto da capacidade de fermentação (síntese de enzimas para a via fermentativa) quanto o grau de fermentação alcoólica. Entretanto, quando a concentração de glicose é baixa, a formação de etanol não ocorre sob condições aeróbicas. Mas a concentração de glicose maior que 100 - 200 mg.l⁻¹, ocorre produção de etanol em razões que aumentam conforme o aumento da concentração do açúcar. O excesso de glicose adicionado ao meio de células de *S. cerevisiae* crescidas sob limitações de glicose resulta na formação não somente de etanol mas também de ácido acético. A formação de etanol e ácido acético pode ser considerada como “inundante” do metabolismo, a capacidade oxidativa do microorganismo começa a ser insuficiente para permitir a oxidação completa do inesperado excesso de glicose e CO₂. Com o

aumento na concentração da glicose, a estrutura e o metabolismo das células suporta as mudanças. Em resposta ao aumento da concentração de glicose, o espaço periplásmico na célula, a quantidade de glicogênio, o comprimento e o diâmetro da mitocôndria são todos aumentados.

LARUE *et al.* (1984), relataram que num meio rico em açúcar (260 g/l), as enzimas hexoquinase (HK) e álcool desidrogenase (ADH) permanecem com atividade mesmo depois de a fermentação cessar, sugerindo que além de a finalização da fermentação pelas leveduras não ocorrer como resultado da inibição da HK e da ADH, essas enzimas também podem estar presentes em células que cresceram em meio com baixa concentração de açúcares suplementado com etanol e aminoácidos.

CASON *et al.* (1987), concluíram que a glicose é utilizada mais rapidamente que a frutose, no meio fermentativo com sacarose que a levedura hidroliza para consumir.

D'AMORE *et al.* (1988), relataram que o aumento na pressão osmótica tem sido apresentado como causa do decréscimo no crescimento e na fermentação das células de leveduras tanto quanto um aumento na produção de glicerol para neutralizar o efeito dessa pressão. Eles constataram que um aumento da concentração da glicose de 10 para 20% é suficiente para provocar esses efeitos.

EKUNSANMI & ODUNFA (1990), observaram que as leveduras mais tolerantes ao etanol também tendem ser mais tolerantes ao estresse osmótico.

BERTOLINI *et al.* (1991), estudaram 100 colônias de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* que fermentavam a uma alta concentração de açúcar variando de 15 a 30% e observaram que algumas linhagens apresentavam alta viabilidade celular e máxima produção de etanol após 20 horas de fermentação. A quantidade máxima de etanol foi acumulada em fermentação de 30% de açúcar (sacarose ou glicose) e altos níveis de etanol não foram produzidos quando a concentração de sacarose foi aumentada para 33%.

MAGER & VARELA (1993), relataram que a exposição de células de leveduras a alta osmolaridade levam a desidratação, colapso do gradiente de íons através da membrana plasmática e decréscimo na viabilidade celular. Embora possam, também, levar a esporulação das leveduras osmotolerantes.

TAKESHIGE & OUCHI (1995), estudaram a produção de etanol por leveduras em melão. O melão usado como um material novo para a produção de etanol torna o processo mais econômico. A sacarose, o maior açúcar no melão em quantidade, é hidrolizada pela invertase da levedura para glicose e frutose, e estes monossacarídeos são substratos diretos utilizados na fermentação. A rápida hidrólise da sacarose foi acompanhada por um aumento passageiro nas concentrações de glicose e frutose, indicando que a razão de

sacarose hidrolizada em 30% do açúcar excedeu a razão do consumo dos monossacarídeos pelas células de leveduras. Um leve aumento na concentração de frutose foi observado quando o meio de melaço com sulfato de amônio (0.2%) foi fermentado, e a glicose foi acumulada em algum grau no próximo estágio da fermentação. Isto indica que a hidrólise da sacarose foi rápida o suficiente para completar a fermentação. Em outros casos, na fermentação do mesmo meio por outra linhagem de *S. cerevisiae* não houve aumento nos níveis de frutose e nenhuma acumulação de glicose ocorreu, o nível de glicose decaiu próximo a zero em 24 horas e a frutose quase foi totalmente consumida em 48 horas. Isto demonstra que a razão de hidrólise da sacarose limita a fermentação. Os resultados sugerem que a atividade da invertase presente no periplasma da levedura é fortemente reprimida em meio de melaço 30% com sulfato de amônia (0.2%). Assim certas linhagens de *S. cerevisiae* não podem fermentar bem em altas concentrações de melaço porque a atividade da invertase é baixa e inibida por certos componentes presentes no próprio melaço. Portanto, uma das características requeridas na levedura para ser utilizada na produção de etanol de melaço, a alta concentração de açúcar, é ter uma atividade de invertase forte o suficiente para não sofrer inibição.

2.2.6- Etanol

O etanol produzido por células de leveduras, através da fermentação de açúcares, é um produto de grande interesse econômico e muitas pesquisas, para melhorar os níveis do álcool produzido, vêm sendo desenvolvidas ao

longo dos anos. Contudo, a tempos se sabe, que altas concentrações de etanol mostram-se tóxicas às próprias células que o produzem.

NAGODAWITHANA & STEINKRAUS (1976), estudando *Saccharomyces cerevisiae* concluíram que o etanol produzido pelas próprias células das leveduras apresentava-se mais tóxico a elas do que frente ao etanol adicionado às culturas.

Segundo BROWN *et al.* (1981), o efeito do etanol atua mais intensamente no crescimento celular do que na atividade fermentativa das leveduras.

NOVAK *et al.* (1981), confirmaram as conclusões de NADODAWITHANA & STEINKRAUS (1976), realizando um estudo cinético da inibição do álcool em fermentação anaeróbica e relataram que o etanol produzido pelas leveduras é 20 a 25 vezes mais tóxico que o introduzido ao meio. Atribuíram esse fato a baixa permeabilidade do etanol para o interior da célula.

DOMBEK & INGRAM (1986), sugeriram que as concentrações intracelulares de etanol em suspensões de células de leveduras fermentando são menores ou iguais aquelas do meio extracelular. Embora autores como NAGODAWITHANA & STEINKRAUS tenham sugerido que a ação do

etanol produzido pelas células e acumulado nestas provoquem desnaturação das enzimas, principalmente da Hexoquinase (HK).

O acúmulo de etanol intracelular em células de *Saccharomyces cerevisiae* e seu efeito potencial no crescimento e na fermentação teve tópicos de muitas controvérsias durante anos anteriores (D'AMORE *et al.*, 1987). D'AMORE *et al.* (1988), relatam que as diferenças nos resultados de vários estudos são atribuídas a imprecisão das técnicas usadas para medir a concentração intracelular de etanol. E utilizando técnicas conhecidas pela literatura, concluíram que estas não indicavam claramente o acúmulo intracelular de etanol. Observaram na fermentação, concentrações similares de etanol extra e intracelulares, como sugerido por DOMBEK & INGRAM (1986). Estes resultados contradizem a maioria dos estudos anteriores. Eles apresentaram que há acúmulo de etanol nas células durante as 3 primeiras horas do estágio fermentativo e que o etanol subsequente se difunde através da membrana celular da levedura por volta de 12 horas de fermentação, tornando similares as concentrações extra e intracelulares. Alegaram que uma condição para o etanol produzido difundir-se para fora da célula, deve ser a existência de um gradiente inicial que favoreça essa saída.

2.3- Uso do Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB) na fermentação alcoólica

2.3.1- Ação química do Brometo de Cetiltrimetilamônio

Os sais de amônio quaternário, como o CTAB, são produtos da reação nucleofílica de haletos de alquila com aminas terciárias. Cada molécula possui quatro átomos de carbono ligados ao átomo de nitrogênio através de ligações covalentes (SHELTON *et al.*, 1946).

JACOBS, HEIDELBERGER e AMOS (1916), relataram esses sais como uma nova classe de compostos sintéticos que possuíam atividade bactericida. Inicialmente os compostos de amônio quaternário foram utilizados nos processos de assepsia cirúrgica de modo geral (BARNES, 1942).

Atualmente, uma das áreas de aplicação de tais agentes catiônicos é a de usinas do setor sucroalcooleiro. Como a fermentação alcoólica acaba sendo acompanhada de contaminantes indesejáveis, sempre vêm sendo estudadas diversas práticas envolvendo o uso de agentes antimicrobianos para controlar as infecções. O CTAB vem sendo empregado em operações de limpeza e sanitização de equipamentos usados nas usinas de açúcar e álcool e embora sua ação antimicrobiana ainda não esteja bem esclarecida, os resultados parecem ser satisfatórios (UENO, 1992).

KUHN & BIELIG (1940) citado por UENO (1992), relataram que os compostos de amônio quaternário têm a habilidade de dissociar proteínas

conjugadas e com isso sugeriram que, sendo a membrana celular um conjugado lipoproteico, esta poderia sofrer os efeitos da dissociação do detergente.

GALE & TAYLOR (1946), confirmaram a ação desse mecanismo estudando a liberação dos aminoácidos glicina e ácido glutâmico das células de bactérias.

WHITE (1953), observou que a maioria das bactérias e das leveduras apresentam inibição do crescimento em presença de CTAB, o que demonstra a sua alta toxicidade.

ARMSTRONG (1957), revelou que os compostos catiônicos agem nas leveduras desorganizando a membrana celular e depois inativando suas enzimas, mas, observou que em baixas concentrações provoca aumento na produção de ácidos.

GILBY & FEW (1960), propuseram a teoria de que a carga positiva do sal de amônio quaternário se associa ao grupo fosfato dos fosfolípídeos e a porção não polar do composto penetra no interior hidrofóbico da membrana celular, sendo que, tal fato, leva ao aumento da permeabilidade da membrana.

HUGO (1967), corrobora com a teoria de GILBY & FEW (1960) relatando que o mecanismo de ação dos compostos de amônio quaternário envolve interação primária e também interação secundária, sugerindo que primeiro o composto adsorve na membrana dos microorganismos e depois

promove modificações na mesma, além da inibição de processos metabólicos e reprodutivos das células.

Apesar do fato de os compostos de amônio quaternário serem considerados germicidas, alguns autores (JOSHI *et al.*, 1987; GOWDA *et al.*, 1991; BHAT *et al.*, 1993; etc.) encontraram muitas vantagens em permeabilizar as células de microorganismos e assim tirarem melhor proveito da ação de suas enzimas. A literatura desses últimos vinte anos, demonstra a esse respeito que, a utilização de baixas concentrações de CTAB podem trazer resultados positivos para a produção fermentativa.

Quanto à toxicidade do CTAB, a preocupação com relação ao uso desses sanitizantes em utensílios, equipamentos e superfícies de contato com alimentos e uma possível contaminação pelos mesmos, levou a especificação para estes produtos, determinando uma lavagem com água potável, após sanitização empregando composto de amônio quaternário. Caso as soluções não excedam 200 ppm do composto, não há obrigação da lavagem das superfícies e equipamentos com água potável, após a sua utilização (FEDERAL REGISTER, 1969). Concentrações de CTAB acima de 200 ppm podem causar paralisia muscular sem envolvimento do sistema nervoso central ou coração, estímulo de músculo liso e bloqueio de gânglios (CUCCI, 1949).

2.3.2- Efeito do Brometo de Cetiltrimetilamônio durante as fermentações alcoólicas

JOSHI *et al.* (1987), estudaram a fermentação de células de *Kluyveromyces fragilis* que produziam β -galactosidase com baixa atividade e observaram que houve um aumento na atividade dessa enzima quando produzida por células tratadas com CTAB. As células tratadas apresentavam livre permeabilidade para a lactose e um potencial catalítico muito aumentado. Concluíram que a permeabilização é dependente da concentração do detergente usado e se apresenta máxima entre 0.1 e 0.2% de CTAB para a *Kluyveromyces fragilis*. Com o aumento das concentrações, observaram queda na atividade da β -galactosidase com o concomitante aumento de sua atividade no sobrenadante da solução detergente, indicando que o CTAB a altas concentrações causa escoamento da enzima da célula ou lise celular.

JOSHI *et al.* (1989), num estudo similar ao anterior consideraram que a utilização de CTAB na modificação da permeabilidade das células conduz a livre difusão de substratos e produtos através da membrana celular, concluindo, que este método é simples, rápido, econômico e de fácil aplicação em escala industrial.

GOWDA *et al.* (1991), utilizaram o CTAB para modificar a permeabilidade da membrana celular de *Saccharomyces cerevisiae* e observaram que o aumento na atividade das enzimas álcool desidrogenase (ADH), hexoquinase (HK) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PHD) era significativo comparado ao controle (células não permeabilizadas). O efeito da variação das concentrações de CTAB na modificação da permeabilidade

celular indicou que a atividade enzimática aumenta rapidamente por volta de 0.02% de CTAB e tem pico em 0.2% de CTAB.

NAINA *et al.* (1991), relataram que a atividade de várias enzimas intracelulares de *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces fragilis* é muito aumentada quando as células intactas são tratadas com o detergente catiônico CTAB. Propuseram que tal intensificação na atividade enzimática se deve a um aumento no transporte de componentes com baixo peso molecular tais como: substratos, produtos e cofatores que atravessam a membrana da célula (permeabilização).

UENO (1992), relatou que a adição de 3 ppm de CTAB em fermentação alcoólica com *Saccharomyces cerevisiae* levava a alteração do metabolismo, inibindo levemente a rota do ácido pirúvico para o ciclo dos tricarboxílicos, havendo portanto, um maior desvio para a produção de etanol. A fermentação alcoólica com células de *S. cerevisiae* tratadas com 3 ppm de CTAB foi mais estimulada em relação a fermentação com células não tratadas. Observou que 6 ppm e 10 ppm de CTAB provocaram uma drástica redução no metabolismo da glicose, devido afetar a respiração e a fermentação como também a glicólise, ou ainda simultaneamente a estes efeitos tenha ocorrido uma inibição no nível de transporte da glicose para o interior da célula.

BHAT *et al.* (1993) utilizaram CTAB para modificar a permeabilidade da membrana celular de *Kluyveromyces fragilis* (NRRL-Y-

1196) e observaram um aumento na atividade das enzimas álcool desidrogenase, hexoquinase, glicose-6-fosfato desidrogenase e β -galactosidase. Convencionalmente, estas enzimas são utilizadas em testes paralelos na estimação de etanol, glucose e lactose e quando inseridas num contexto de fermentação são responsáveis pela conversão do açúcar em álcool (excetuando-se a β -galactosidase).

TAKESHIGE & OUCHI (1995), relataram que depois da permeabilidade da membrana celular de *Saccharomyces cerevisiae* ser modificada, substâncias de baixo peso molecular como glicose, nucleotídeos e sais saem da célula, enquanto que substâncias de alto peso molecular como enzimas podem permanecer no interior da célula. Mas, se ATP e NAD⁺ não permanecerem no interior da célula, a adição de glicose ao meio não é suficiente para iniciar a fermentação alcóolica das células permeabilizadas. Neste caso, há a necessidade de se adicionar a glicose, o ATP e o NAD⁺ para se obter fermentação com sucesso. Observaram, que nas células com a permeabilidade modificada, o substrato pode ter acesso direto às enzimas dentro da célula, o que pode acarretar diferenças na utilização do sacarídeo. Os autores utilizaram a glicose como fonte principal de carbono para levedura, entretanto, concluíram que a sacarose se apresentou como melhor substrato para a fermentação.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Material

3.1.1- Material permanente

Incubador - Agitador com ambiente controlado, marca New Brunswick Scientific, modelo G25 e G27 ;

Estufa de secagem e esterilização, marca Fanem, modelo 315 SE;

Autoclave vertical, marca Phoenix, modelo AV - 75;

Câmara de fluxo laminar, marca Tecnal, modelo 115;

Centrífuga refrigerada, marca Sorvall, modelo RC 5C;

Potenciômetro, marca Digimed, modelo DMPH - 2;

Cromatógrafo Gasoso, marca HP, modelo 5890, com detector de ionização de chamas, equipado com forno e integrador de dados;

Espectrofotômetro Beckman, modelo DU - 70;

Destilador de água Tecnal 5 l/h;

Purificador de água, Millipore;

Microscópio ótico binocular Olympus - CBA;

Balança Semi - Analítica, marca Micronal, modelo B - 600;

Balança Analítica A & D, modelo FR – 200.

3.1.2- Material de consumo

Os reagentes utilizados, todos p.a., foram das marcas Merck, Ecibra, Vetec e Sigma.

O melaço foi fornecido pela Usina Controlpav S/A açúcar e álcool, situada no Estado de São Paulo.

3.1.3- Microorganismo utilizado

Foram utilizadas linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* denominada de AJ061, isoladas na região do Estado de São Paulo, que se encontravam conservadas no Laboratório Geral, do Departamento de Ciência de Alimentos, da Faculdade de Engenharia de Alimentos, e também, linhagens de leveduras comerciais Fleischmann.

3.1.4- Meios de Cultura

Tanto para o crescimento de células quanto para a fermentação alcoólica, foi utilizado meio de cultura composto por melaço de cana (10% de açúcares totais para a produção de células e 24% para a fermentação) e 700 ppm de KH_2PO_4 .

3.2- Métodos

3.2.1- Determinação de umidade

A determinação da umidade das células foi feita de acordo com MEI *et al.* (1966).

3.2.2- Determinação de açúcares redutores totais no melaço

A quantidade de açúcares totais foi determinada pelo método de redução do ácido 3,5 dinitrosalicílico - DNS - (MILLER, 1959). Esse método foi aplicado à amostra após hidrólise da sacarose, de acordo com o procedimento descrito por LEES (1969).

3.2.3- Preparação do pré-inóculo para a produção de células

Foram utilizados frascos erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de melaço de cana contendo 10% de açúcares totais, 700 ppm de KH_2PO_4 e pH 5.0 (ajustado com ácido clorídrico). Estes frascos foram esterilizados a 121°C por 15 minutos em autoclave, posteriormente resfriados e inoculados com alça níquel-cromo da cultura de *Saccharomyces cerevisiae* AJ061. A incubação foi a 30°C por 24 horas.

3.2.4- Preparação do Inóculo para a fermentação alcoólica

Foi adicionado, assepticamente, 50 ml do pré-inóculo produzido em 24 horas, segundo a metodologia do item 3.2.3, em frascos de erlenmeyer de 500 ml contendo 200 ml de melaço de cana com 24% de açúcares totais e 700 ppm de KH_2PO_4 , previamente autoclavados a 121°C por 15 minutos e resfriados. Após a adaptação de rolhas de borracha com dispositivo de vidro na forma de U contendo ácido sulfúrico concentrado para evitar contaminações e facilitar a saída de CO_2 , os frascos foram incubados a 30°C e a perda de CO_2 foi acompanhada por meio da variação de massa após 24 horas como descrito por PARK & RIVERA (1982).

3.2.5- Efeito de diferentes concentrações de CTAB na fermentação alcoólica de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 após 24 horas

O estudo do efeito da concentração de CTAB na fermentação alcoólica da linhagem de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 procedeu-se com a utilização do método de fermentação descrito no item 3.2.4, acrescidos de CTAB nas concentrações de 0.2 %, 0.02 %, 0.015 %, 0.01 %, 0.005 %, 0.0025 % e 0.00125 %, visando estabelecer a concentração que levaria a um aumento na produção de álcool.

Cabe aqui apenas uma nota de observação, para todos os experimentos realizados nesta tese, quanto a denominação de CONTROLE: designa as amostras em que não se adicionou o CTAB e, portanto, têm valor

comparativo perante as demais, sendo que só foi feito para os experimentos que apresentavam os melhores resultados.

3.2.6- Estudo da produção de células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 utilizadas na fermentação alcoólica realizadas após 24 horas

O estudo da influência da temperatura (28° ,30° ,32° ,e 35° C), pH (4.5, 5.0 e 5.5) e concentração de açúcares redutores totais do melaço (5, 15, 20, 24, 30, 35 e 40 %) no crescimento celular das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 procedeu-se com a utilização do método descrito no item 3.2.3 durante 24 horas e foi avaliado, posteriormente, através da capacidade fermentativa dessas células no processo descrito no item 3.2.4.

3.2.7- Estudo da fermentação alcoólica de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 realizada após 24 horas com a adição de CTAB

O estudo da influência da temperatura (30° ,32° ,35° e 37° C), pH (3.0, 4.0, 4.5, 5.0 e 5.5) e concentração de açúcares redutores totais do melaço (20, 24, 30, 35 e 40%) na fermentação alcoólica de *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 procedeu-se com a utilização do método descrito no item 3.2.4, com a adição de 0.0025 % de CTAB.

3.2.8- Efeito da redução do tempo de fermentação alcoólica realizado com leveduras comerciais *Saccharomyces cerevisiae*

Foi realizado um estudo para se determinar a concentração de leveduras comerciais que possibilitavam a redução no tempo de fermentação alcoólica de 24 horas para 3 horas. Inicialmente foi testada a densidade celular, em relação ao peso seco, de 8×10^8 (8) céls/ ml (23 g/ l), de leveduras comerciais, que foram assepticamente pesadas e inoculadas em frascos erlenmeyer de 500 ml contendo 250 ml de melaço com 24% de açúcares totais, 700 ppm de KH_2PO_4 , sendo a solução previamente esterilizada em autoclave a 121°C por 15 minutos e resfriada antes da adição das leveduras comerciais e de 0.0025 % (2,5 ppm) de CTAB, em câmara de fluxo laminar. Os frascos foram incubados a 30°C durante 3 horas. A produção de álcool foi avaliada através da variação de massa como descrito por PARK & RIVERA, 1982. Em seguida foram estudadas as concentrações celulares, em relação ao peso seco, de 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45g / 100 ml e 200 ml, fermentadas da mesma maneira.

3.2.9- Produção de células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 para a fermentação alcoólica rápida

Foi realizado um estudo para se determinar o volume de meio de crescimento que possibilitasse a produção de 30 g de células (peso úmido) de

leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061, bem como as condições de agitação que favorecessem esse processo. Os volumes testados foram de: 50, 100, 500 e 1000 ml em frascos erlenmeyer de 250, 500, 1000 e 2000 ml, respectivamente, agitados a 100, 150, 200 e 250 rpm. O estudo procedeu-se com a utilização do método de crescimento citado no item 3.2.3 e a quantidade de massa celular obtida foi avaliada pelo seu peso seco.

Posteriormente, as células foram produzidas a partir das condições mais favoráveis e da massa celular úmida pesava-se, assepticamente, 30 g para serem utilizadas na fermentação alcoólica realizada durante 3 horas em 100 ml de meio, o processo foi realizado de acordo com o método citado no item 3.2.8.

As células produzidas foram obtidas através de centrifugação.

CENTRIFUGAÇÃO:

O meio de produção de células foi centrifugado a 9000 x g a 5° C, por 30 minutos. Das células obtidas, pesava-se 30 g que eram ressuspensas em um volume de 50 ml do próprio sobrenadante, a fim de se solubilizarem melhor, sendo então adicionadas a 100 ml do meio de fermentação. Todo o processo foi realizado em câmara de fluxo laminar, com frascos e espátulas esterilizados em autoclave a 121° C por 15 minutos e resfriados em seguida.

3.2.10- Estudo da fermentação alcoólica das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 realizada após 3 horas com adição de CTAB

O estudo da influência da temperatura (28°, 30°, 35°, 37° e 40° C), pH (4.0, 4.5, 5.0, 5.5 e 6.0) e concentração de açúcares (20, 24, 30 e 35%) na fermentação alcoólica com adição de 0.0025 % (2,5 ppm) de CTAB, realizada durante 3 horas. O método utilizado neste experimento foi o citado no item 3.2.8, onde inoculou-se 30 g de células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 100 ml de meio fermentativo.

As células produzidas a partir do crescimento em frascos erlenmeyer de 2000 ml contendo 1000 ml de melação com 10% de açúcares totais, 700 ppm de KH₂PO₄, pH 5.0 a 30° C com 100 rpm durante 24 horas. A massa celular foi obtida através de centrifugação pelo método descrito no item 3.2.9.

3.2.11- Análise quantitativa da produção de etanol

A quantificação do etanol produzido em todos os experimentos, foi feita através de análise em cromatógrafo gasoso (CG). Alíquotas de 1 microlitro do produto foram injetadas manualmente. A fase móvel foi gás hélio e o padrão utilizado foi etanol, p.a, nas concentrações de 5, 10 e 15%, e acetona, p.a, como padrão interno, nas mesmas concentrações. A coluna

empregada foi HP-FFAP, com filme interno de polietilenoglicol modificado com ácido tereftálico com 0.3 μm de espessura, e com dimensões de 50m de comprimento x 0.2 mm de diâmetro interno. A temperatura do forno foi ajustada para 80° C e o fluxo da fase móvel para 1 ml / min. O detector foi o de ionização de chamas, ajustado a temperatura de 150° C. A partir da porcentagem de álcool produzido lida no cromatógrafo (% v/v) e da densidade do álcool (valor considerado: 0.79), calculou-se o peso do álcool em gramas / 100 ml. A partir da concentração de açúcar inicial na fermentação alcoólica (24%), utilizada no experimento, calculou-se o rendimento de etanol (%), considerando-se o rendimento estequiométrico da fermentação.

4- Resultados e Discussão

4.1- Influência de diferentes concentrações de CTAB na fermentação alcoólica de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 após 24 horas

Levando-se em consideração as vantagens da modificação da permeabilidade celular das células de microorganismos com o intuito de se utilizar de maneira mais eficaz a ação de suas enzimas e obter assim, resultados positivos para a produção fermentativa, foram testadas diferentes concentrações de CTAB na fermentação alcoólica de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 e avaliou-se o seu efeito na produção de álcool.

Inicialmente a concentração de CTAB utilizada foi a de 0.2% de CTAB (p/v), tendo-se como referência comparativa um padrão de fermentação sem a adição de CTAB. Tal concentração teve respaldo na citação feita por GOWDA *et al.* (1991) como suficiente para a modificação da permeabilidade celular das leveduras sem danos às mesmas. Esses autores, utilizavam uma exposição das células à solução permeabilizante, contendo CTAB, por 15 minutos a 24° C com agitação intermitente. Posteriormente, as células eram removidas por centrifugação e lavadas antes de serem utilizadas.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Neste estudo, o intuito foi o de se definir a concentração ótima de CTAB, que levasse a um aumento na produção de etanol sem contaminação do produto final. O método utilizado foi descrito no item 3.2.4..

Os resultados observados na Tabela 1, demonstram que a concentração de 0.2 % de CTAB influenciou negativamente a fermentação alcoólica (rendimento em etanol de 11.15%) e isto, provavelmente, ocorreu, como observou WHITE (1953), pela inibição das células de leveduras do meio pela alta toxicidade do produto. Já a fermentação tradicional, sem o uso de CTAB (padrão), teve um rendimento em etanol de 80.82%.

Tabela 1- Dados relativos ao efeito da concentração de 0.2 % de CTAB na fermentação alcoólica de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 250 ml de melão com 24% de açúcares redutores totais e 700 ppm de KH₂PO₄ a 30° C após 24 horas.

[CTAB] %	Variação de massa g/250 ml	Rendimento em etanol (%)
Controle (sem CTAB)	8.2	80.82
0.2	1.2	11.15

Na seqüência do experimento, utilizamos diferentes concentrações de CTAB inferiores a esta já testada. Os resultados podem ser observados na Tabela 2.

A concentração que melhor beneficiou o processo fermentativo foi a de 0.0025 % de CTAB que promoveu um aumento na quantidade de etanol produzido. O rendimento de etanol desse experimento foi de 97.34%, ou seja, 16% superior ao padrão (fermentação sem CTAB). Isto vem demonstrar que, apesar de os compostos de amônio quaternário serem considerados germicidas, em baixas concentrações eles podem favorecer o processo fermentativo. Resultados similares também foram observados por JOSHI *et al.* (1987), GOWDA *et al.* (1991) e BHAT *et al.* (1993). O uso de concentrações abaixo de 0.0025% diminui a produção de etanol em relação a esta concentração, talvez, pela menor efetividade do CTAB na permeabilização da membrana celular.

Observando a Figura 1, que reúne os dados da Tabelas 1 e 2, podemos dizer que o CTAB em certas concentrações (0.0025 e 0.00125%) promoveu uma melhora na produção de etanol em relação à fermentação tradicional: aqui representada pelo controle (sem adição de CTAB).

Tabela 2- Dados relativos ao efeito de diferentes concentrações de CTAB na fermentação alcoólica de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 250 ml de melação com 24% de açúcares redutores totais e 700 ppm de KH₂PO₄ a 30° C após 24 horas.

[CTAB] %	variação de massa g/250ml	Rendimento em etanol (%)
Controle (sem CTAB)	8.2	81.22
0.02	5.0	49.70
0.015	5.3	52.83
0.01	5.8	57.51
0.005	6.7	66.47
0.0025	9.8	97.34
0.00125	8.8	86.95

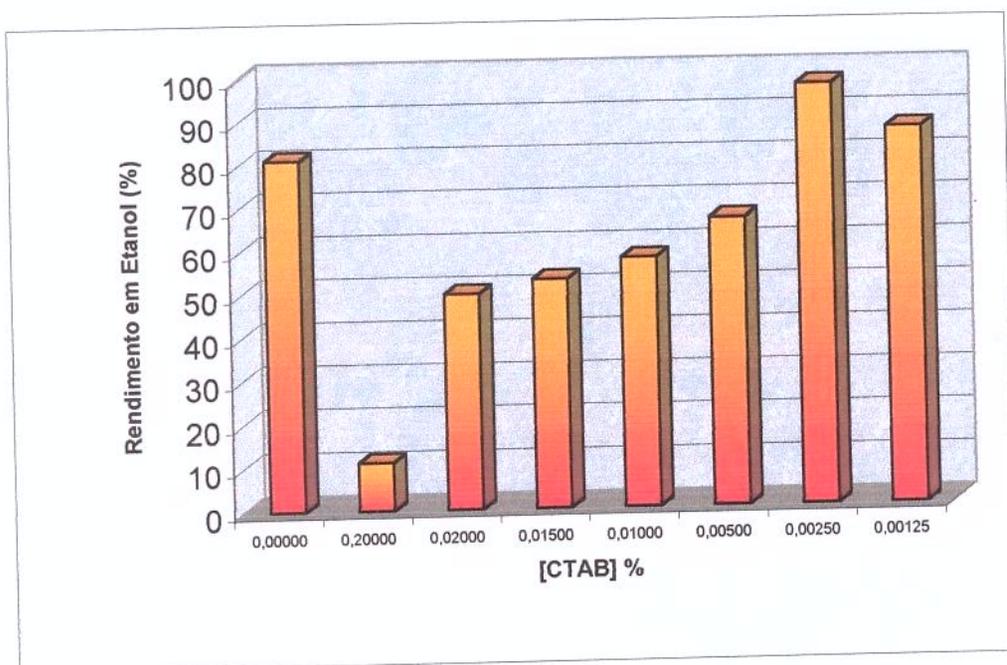


Figura.1- Influência de diferentes concentrações de CTAB na fermentação alcoólica de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 250 ml de melão com 24% de açúcares redutores totais e 700 ppm de KH_2PO_4 a 30°C após 24 horas e analisadas através de cromatografia gasosa.

Uma vez determinada que a concentração de 0.0025 % de CTAB foi a que mais favoreceu a fermentação alcoólica de *Saccharomyces cerevisiae* AJ061, realizamos estudos sobre a influência de diferentes fatores na fermentação alcoólica com a adição dessa concentração de CTAB em todos os experimentos, tendo sempre como padrão de comparação uma fermentação sem o acréscimo de CTAB.

4.2- Estudo para produção de células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 para fermentação alcoólica após 24 horas

Os efeitos de diferentes temperaturas, valores de pH e concentrações de açúcar no crescimento de células de *Saccharomyces cerevisiae* linhagem AJ061 são apresentados nas Tabelas 3, 4 e 5 e nas Figuras 2, 3 e 4 respectivamente. O estudo realizado para se determinar as condições ótimas de crescimento celular foi avaliado de acordo com as características fermentativas das células obtidas sob as condições utilizadas e portanto, através da variação de massa obtida pela perda de CO₂ após fermentação alcoólica. O método utilizado foi descrito no item 3.2.6.

Na análise das Tabelas e das Figuras citadas no parágrafo anterior, podemos observar que as melhores condições para o crescimento foram: 30° C, pH 5.0 e 10% de açúcares redutores totais.

Esses resultados estão de acordo com os citados na literatura. Segundo ARTHUR (1976), as leveduras *Saccharomyces sp* são tipicamente mesófilas e o limite para o seu crescimento varia em torno de 35° C e segundo JONES *et al.*(1981), as espécies de *Saccharomyces* apresentam altas taxas de crescimento a temperaturas entre 28 e 30° C. As leveduras termotolerantes que crescem acima de 40° C apresentam a desvantagem da redução de sua capacidade fermentativa a essa mesma temperatura além de serem sujeitas a lise celular (YAMAMURA, 1991).

A concentração hidrogeniônica é um fator significativo para as fermentações devido a sua importância no controle da contaminação bacteriana e seu efeito sobre o crescimento da levedura. Segundo JONES *et al.* (1981), a maioria das linhagens de *Saccharomyces* crescem na faixa de pH entre 2.4 e 8.6. Sendo que, segundo HALÁSZ & LASZTITY (1995), o pH tem menos efeito nas atividades biológicas do que a temperatura, porque as células têm boa habilidade para regular a concentração de íons hidrogênio internamente, diante de condições adversas do meio.

Quanto a concentração de açúcar, a maioria das espécies de leveduras não é facilmente inibida por moderadas concentrações de açúcar e grande parte das espécies conhecidas cresce bem em meios contendo até 40% de sacarose (PRADA, 1995). Embora as altas concentrações de açúcar levem a desidratação, colapso do gradiente de íons através da membrana plasmática e decréscimo na viabilidade celular (MAGER & VARELA, 1993).

Tabela 3- Dados relativos ao efeito de diferentes temperaturas de crescimento de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 50 ml de melaço com 10% de açúcares redutores totais e 700 ppm de KH_2PO_4 a pH 5.0 após 24 horas de fermentação, fermentadas posteriormente em 250 ml de melaço com 24% de açúcares redutores totais e 700 ppm de KH_2PO_4 a 30° C após 24 horas.

Temperatura (° C)	Variação de massa g/250 ml	Rendimento em etanol (%)
28	5.0	54.39
30 (controle)	6.0	59.29
30	7.6	74.94
32	5.4	53.43
35	6.6	65.35

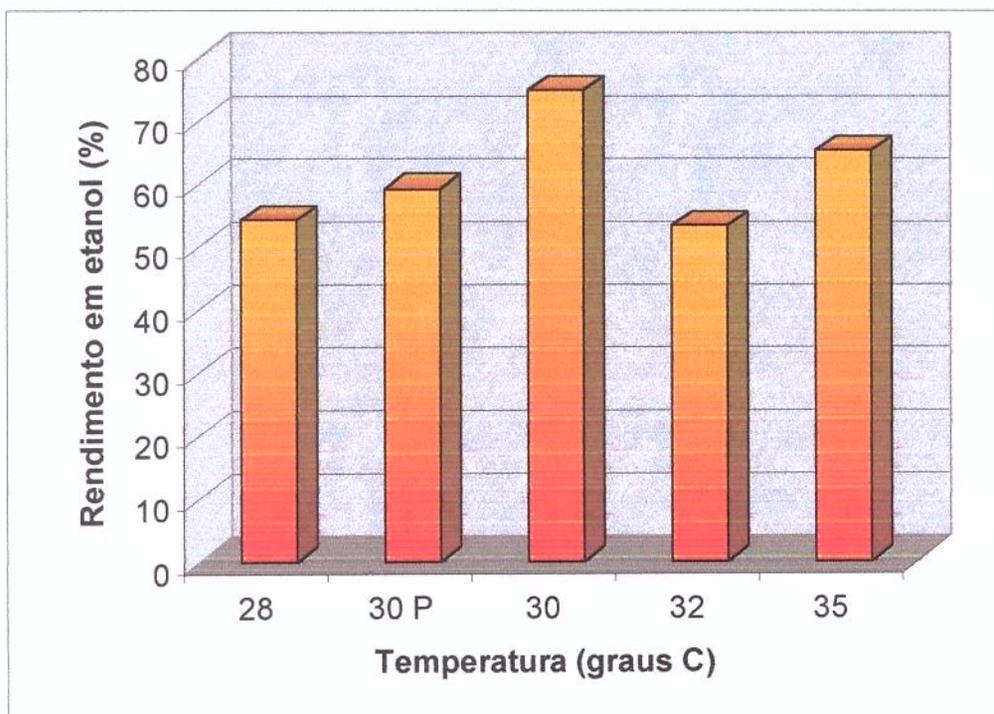


Figura 2- Influência de diferentes temperaturas de crescimento de células da linhagem *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 50 ml de melaço, com 10% de açúcares redutores totais, 700 ppm de KH_2PO_4 a pH 5.0 após 24 horas, no rendimento em etanol quando fermentado em 250 ml de melaço com 24% de açúcares redutores totais, 700 ppm de KH_2PO_4 a 30° C após 24 horas e analisadas através da cromatografia gasosa.

Tabela 4- Dados relativos ao efeito de diferentes valores de pH sobre o crescimento de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 50 ml de melação com 10% de açúcares redutores totais e 700 ppm de KH_2PO_4 a 30° C após 24 horas e fermentadas posteriormente em 250 ml de melação com 24% de açúcares redutores totais e 700 ppm de KH_2PO_4 a 30° C após 24 horas.

pH	variação de massa g/250 ml	Rendimento em etanol (%)
4.5	4.6	45.78
5.0 (controle)	5.9	58.30
5.0	7.6	75.52
5.5	6.1	60.85

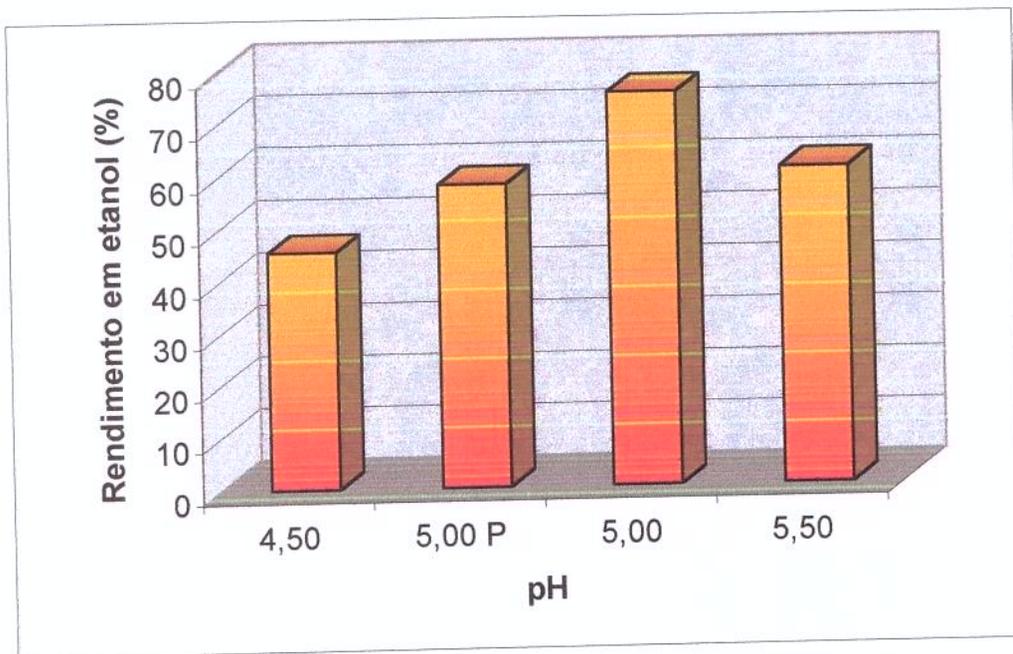


Figura 3- Influência de diferentes valores de pH no crescimento de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 50 ml de melão com 10% de açúcares redutores totais, 700 ppm de KH_2PO_4 a 30°C após 24 horas e fermentadas em 250 ml de melão com 24% de açúcares redutores totais, 700 ppm de KH_2PO_4 a 30°C após 24 horas e analisadas através de cromatografia gasosa.

Tabela 5- Dados relativos ao efeito de diferentes concentrações de açúcares redutores totais do melaço sobre o crescimento de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 50 ml de melaço, 700 ppm de KH_2PO_4 e pH 5.0 a 30° C após 24 horas, fermentadas posteriormente em 250 ml de melaço com 24% de açúcares redutores totais e 700 ppm de KH_2PO_4 a 30° C após 24 horas.

[açúcar] %	variação de massa g/250 ml	Rendimento em etanol (%)
10 (controle)	6.2	61.05
10	7.9	78.37
20	7.8	38.80
24	8.5	34.89
30	6.4	21.26
35	6.1	22.03

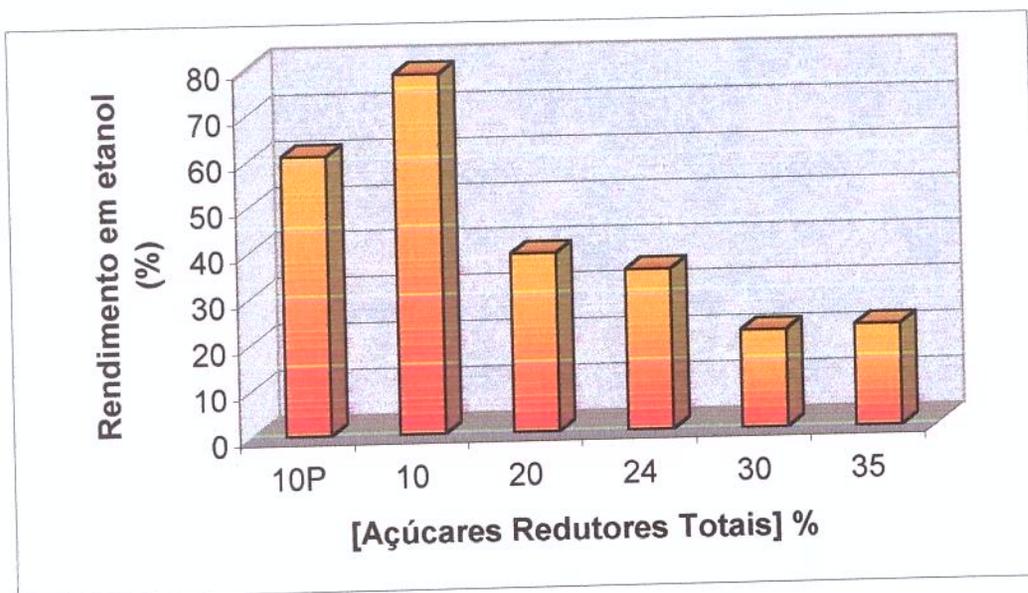


Figura 4- Influência de diferentes concentrações de açúcares redutores totais no crescimento de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 50 ml de melação, 700 ppm de KH_2PO_4 e pH 5.0 a 30° C após 24 horas e fermentadas em 250 ml de melação com 24% de açúcares redutores totais, 700 ppm de KH_2PO_4 a 30° C após 24 horas e analisadas através de cromatografia gasosa.

4.3- Estudo da fermentação alcoólica de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 após 24 horas com adição de CTAB

Os efeitos avaliados de diferentes temperaturas, valores de pH e concentrações de açúcar durante a fermentação alcoólica da levedura AJ061 com adição de 0.0025 % de CTAB, de acordo com a metodologia citada no item 3.2.7, são apresentados nas Tabelas 6, 7 e 8 e nas Figuras 5, 6 e 7 respectivamente.

Observando os dados relatados podemos concluir que as melhores condições de fermentação alcoólica da linhagem AJ061 durante 24 horas com adição de CTAB, foram: 30° C, pH = 5.5 e 24% de açúcares redutores totais.

Em comparação aos dados do crescimento celular citados anteriormente, podemos verificar que a temperatura ótima de fermentação foi mantida no mesmo valor de 30° C, o que vem corroborar com HARRISON & GRAHAM (1970) quando afirmam que a velocidade da fermentação aumenta quando a temperatura ótima se encontra entre 30° e 40° C, variando de acordo com a cepa de microorganismo utilizada. MARQUES (1991), demonstrou que as fermentações realizadas a 30° C têm maior produtividade em etanol do que as fermentações realizadas a 25° C.

Com relação ao pH e à concentração de açúcar, ambos os valores sofreram um aumento em comparação aos valores ótimos utilizados para o crescimento, ficando a concentração em 24% de açúcares redutores totais e o pH em 5.5; o que significa que para a fermentação alcoólica um aumento na concentração de substrato, em relação a concentração de 10 % utilizada para o crescimento, permite um teor alcoólico mais elevado, o que é desejável a nível industrial por reduzir os custos da destilação e propiciar maior assepsia. No entanto, esse aumento de concentração torna-se interessante até certos níveis, sendo que altas concentrações levam a efeitos danosos que reduzem a viabilidade das leveduras e a fermentação, relacionados ao acúmulo de etanol intracelular (D'AMORE *et. al.*, 1988). E para o aumento do pH de 5.0, utilizado no crescimento celular, para 5.5, talvez possa se dizer que tenha ocorrido em função da elevação nos níveis de etanol produzido, uma vez que o álcool, segundo GAO & FLEET (1988), aumenta a sensibilidade da levedura ao etanol quando o pH externo encontra-se diminuído (em torno de 3); provavelmente o pH adequou-se em pH5.5 para diminuir os efeitos danosos às leveduras neste caso.

Tabela 6- Dados relativos ao efeito de diferentes temperaturas na fermentação alcoólica de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 250 ml de melaço com 24% de açúcares redutores totais, 700 ppm de KH₂PO₄ e 0.0025% de CTAB após 24 horas.

Temperatura (° C)	variação de massa g/250 ml	Rendimento em etanol (%)
30 (controle)	6.2	61.44
30	8.1	80.23
32	6.6	65.15
35	6.2	61.15
40	5.5	54.49

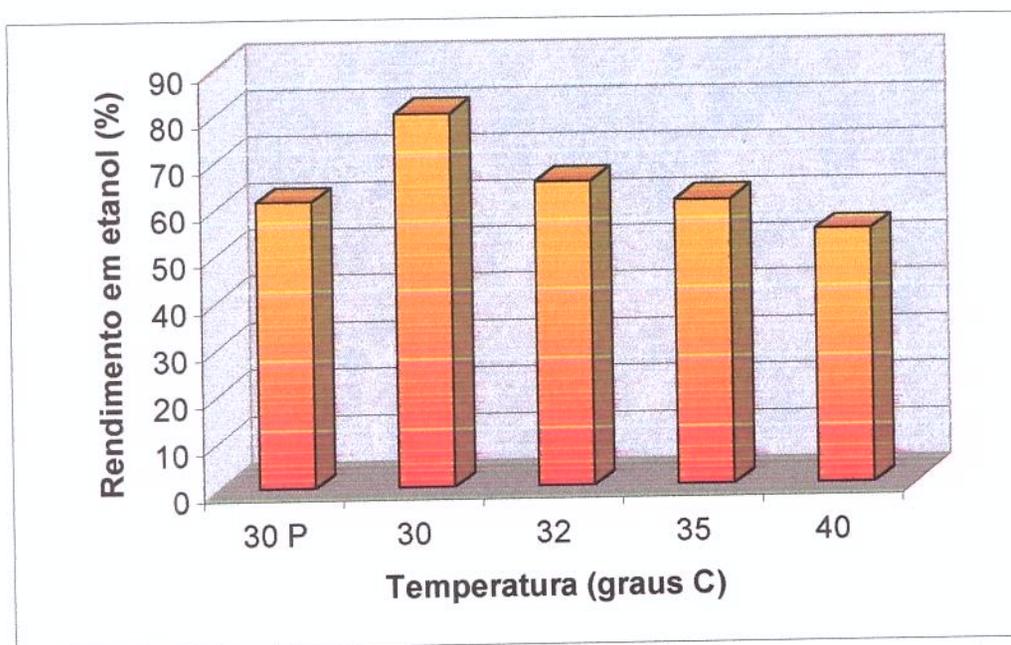


Figura 5- Influência de diferentes temperaturas na fermentação alcoólica de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 250 ml de melaço com 24 % de açúcares redutores totais, 700 ppm de KH_2PO_4 , 0.0025% de CTAB após 24 horas e analisadas através de cromatografia gasosa.

Tabela 7- Dados relativos ao efeito de diferentes valores de pH na fermentação alcoólica de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 250 ml de melão com 24% de açúcares redutores totais, 700 ppm de KH₂PO₄ e 0.0025% de CTAB a 30° C após 24 horas.

PH	variação de massa g/250ml	Rendimento em etanol (%)
3.5	4.8	47.55
4.0	5.0	49.80
4.5	5.3	52.44
5.0	6.8	67.50
5.5 (controle)	6.2	60.85
5.5	7.9	78.37
6.0	6.3	62.81

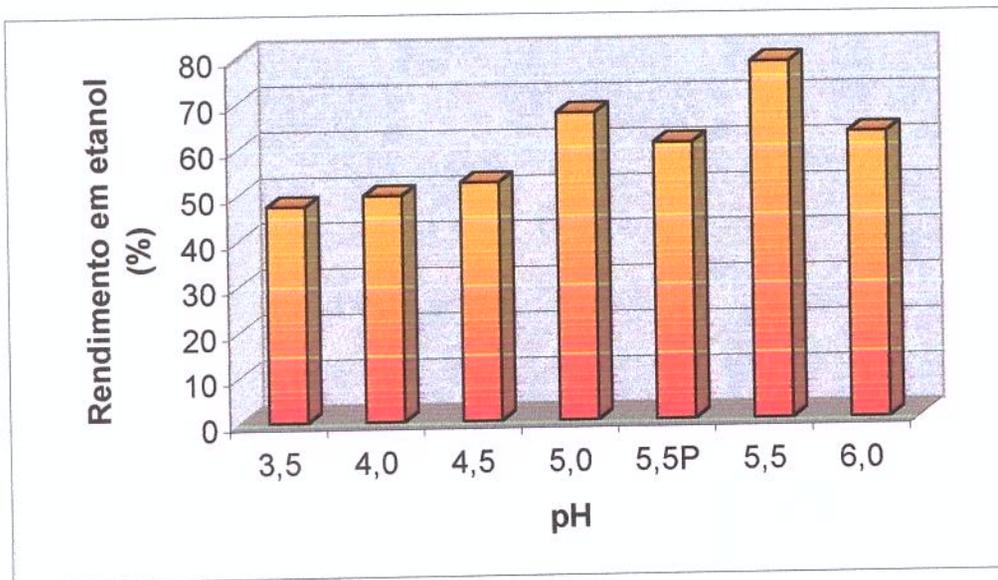


Figura 6- Influência de diferentes valores de pH na fermentação alcoólica de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 250 ml de melaço com 24% de açúcares redutores totais, 700 ppm de KH_2PO_4 e com 0.0025% de CTAB a 30° C após 24 horas e analisadas através de cromatografia gasosa.

Tabela 8- Dados relativos ao efeito de diferentes concentrações de açúcares redutores totais do melaço na fermentação alcoólica de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 250 ml de melaço, 700 ppm de KH₂PO₄, 0.0025% de CTAB e pH 5.5 a 30° C após 24 horas.

[açúcar] %	variação de massa g/250ml	Rendimento em etanol (%)
20	6.7	66.52
24 (controle)	7.2	71.02
24	9.8	97.34
30	5.6	55.95
35	4.8	47.65
40	4.5	44.98

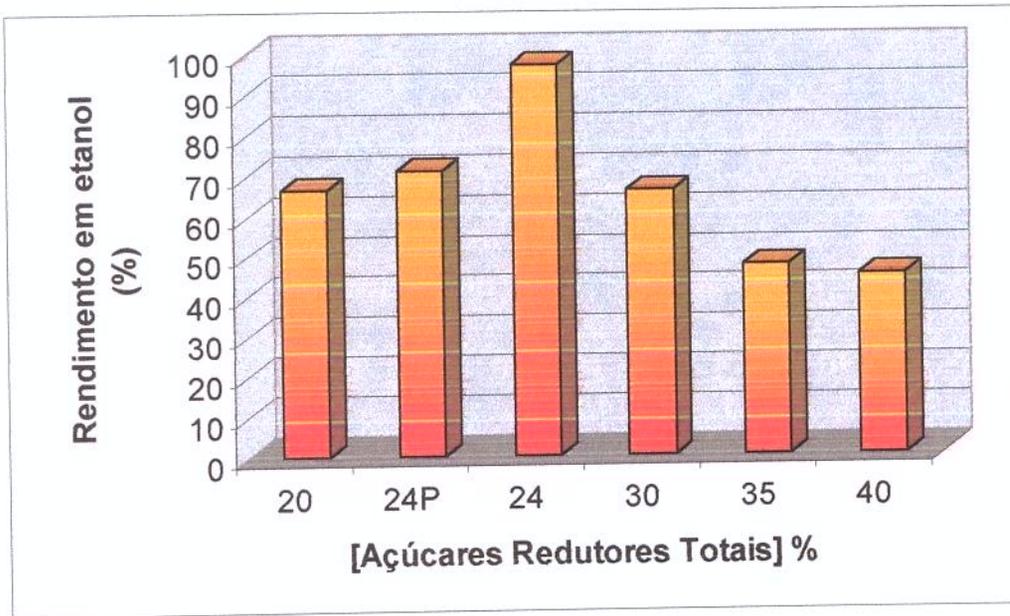


Figura 7- Influência de diferentes concentrações de açúcares redutores totais na fermentação de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 250 ml de melaço com 700 ppm de KH_2PO_4 e com 0.0025% de CTAB e pH 5.5 a 30° C após 24 horas através de cromatografia gasosa.

4.4- Redução do tempo de fermentação alcoólica realizada com leveduras comerciais *Saccharomyces cerevisiae*.

Tal experimento teve início com o acerto da densidade celular (g) de extrato comercial necessária para a obtenção de uma fermentação alcoólica durante 3 horas. Os testes foram feitos sem a adição de CTAB, realizados em dois volumes: 100 ml e 250 ml de meio de fermentação. A metodologia utilizada foi a citada no item 3.2.8.

Baseando-se nos experimentos de NAGODAWITHANA & STEINKRAUS (1976), onde para se obter uma “fermentação rápida” de 3 horas utilizava-se 8×10^8 cels/ml (23 g/l), testamos diferentes densidades celulares, peso seco, de extrato comercial. As densidades testadas e as suas respostas fermentativas podem ser observadas na Tabelas 9 e 10 e na Figura 8.

Tabela 9- Dados relativos à influência de diferentes densidades celulares de leveduras comerciais *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação alcoólica em 100 ml de melão com 24% de açúcares redutores totais, 700 ppm de KH_2PO_4 a 30° C após 3 horas.

Densidade cel. g/100ml	variação de massa g/100ml	Rendimento em etanol (%)
15	2.83	28.17
20	5.1	50.49
25	5.6	55.55
30	6.92	68.48
35	7.0	69.30
40	9.0	89.14

Tabela 10- Dados relativos à influência de diferentes densidades celulares de leveduras comerciais *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação alcoólica em 250 ml de melão com 24% de açúcares redutores totais, 700 ppm de KH₂PO₄ a 30° C após 3 horas.

Densidade cel g/250ml	variação de massa (g) g/250ml	Rendimento em etanol (%)
15	3.4	33.65
20	3.8	37.76
25	5.5	54.56
30	6.7	66.30
35	8.1	80.23
40	9.2	94.28

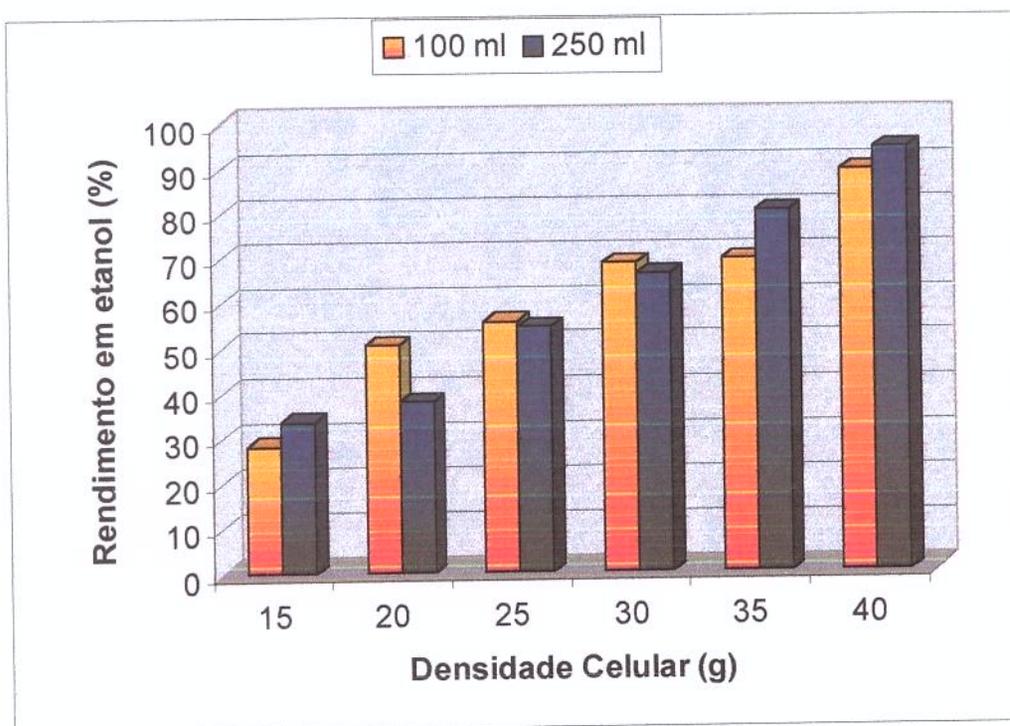


Figura 8- Influência de diferentes densidades celulares de leveduras comerciais *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 na fermentação alcoólica em 100 ml e em 250 ml de melaço com 24% de açúcares totais com 700 ppm de KH_2PO_4 a 30°C após 3 horas e analisadas através de cromatografia gasosa.

Podemos observar nas Tabelas (9 e 10) e Figura (8) anteriormente apresentadas, que tanto para 100 ml quanto para 250 ml a densidade celular que propiciou a melhor fermentação alcoólica foi a de 40 g em 100 ml. Por motivos de praticidade e economia, demos continuidade aos estudos de aceleração do processo de fermentação alcoólica adotando a densidade celular de 30g de células em 100 ml de meio, uma vez que com essa densidade celular e volume obtivemos uma fermentação alcoólica que nos permitiu realizar praticamente os experimentos desejados.

Analisando os dados obtidos nos experimentos apresentados nas Tabelas 9 e 10, podemos concluir que as densidades celulares que acarretaram maior rendimento de etanol foram muito superiores a concentração de 23g / l utilizada no experimento de NAGODAWITHANA & STEINKRAUS (1976). Isto provavelmente ocorreu devido ao fato desses autores realizarem a fermentação em microfermentador com capacidade de 14 litros de mel a 25° Brix acrescido de vitaminas do complexo B, sais de amônio, fosfatos, sódio, magnésio e 13 % de oxigênio dissolvido com agitação de 300 rpm. Isto significa dizer que, numa comparação feita entre as fermentações utilizadas nestes experimentos e as realizadas em bancada sem suplementação do meio e nem controle dos níveis de oxigênio, fica justificada a necessidade de um número de células mais elevado. Cabe salientarmos, aqui, que o intuito do nosso trabalho não foi, num primeiro momento, a otimização das condições de fermentação para possíveis extrapolações industriais e sim a criação de uma metodologia que possibilitasse o uso do CTAB nas fermentações alcoólicas

realizadas durante 24 horas e a aceleração desse processo, realizando-o em apenas 3 horas com boa produtividade de etanol a baixo custo.

4.5- Produção de células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 para a fermentação alcoólica rápida

No experimento anterior, verificamos que a densidade celular de 45 g em 100 ml foi a melhor para a Fermentação Alcoólica realizada durante 3 horas. Por questões de praticidade, levando-se em conta a dificuldade em se produzir grandes volumes de células em laboratório, decidimos trabalhar com a densidade celular de 30 g em 100 ml, a qual também obteve bom desempenho fermentativo.

Para a produção das células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 foram determinados o volume e a agitação de meio para o crescimento celular. Os parâmetros de temperatura, pH e concentração de açúcar utilizados foram de 30° C, pH 5.0 e 10% de açúcares redutores totais, dados apresentados no item 4.2 e a metodologia utilizada foi a descrita no item 3.2.8. Os resultados podem ser observados nas Tabelas 11 e 12 e nas Figuras 9 e 10.

Tabela 11- Dados relativos à produção de células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em diferentes volumes de melão com 10% de açúcares redutores totais, 700 ppm de KH_2PO_4 e pH 5.0 a 30° C após 24 horas.

Volume de meio (ml)	Peso celular úmido (g)	Peso celular seco (g/ml)
5	0.3	0.046
100	0.5	0.0041
500	16	0.024
1000	32	0.025

Tabela 12- Dados relativos à produção de células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 sob diferentes condições de agitação (rpm) do meio contendo 1000 ml de melaço com 10% de açúcares redutores totais, 700 ppm de KH₂PO₄ e pH 5.0 a 30° C após 24 horas.

Agitação do meio (rpm)	Peso celular úmido (g)	Peso celular seco (g)
100	34.2	26.7
150	28.3	22
200	24.4	19
250	25.8	20

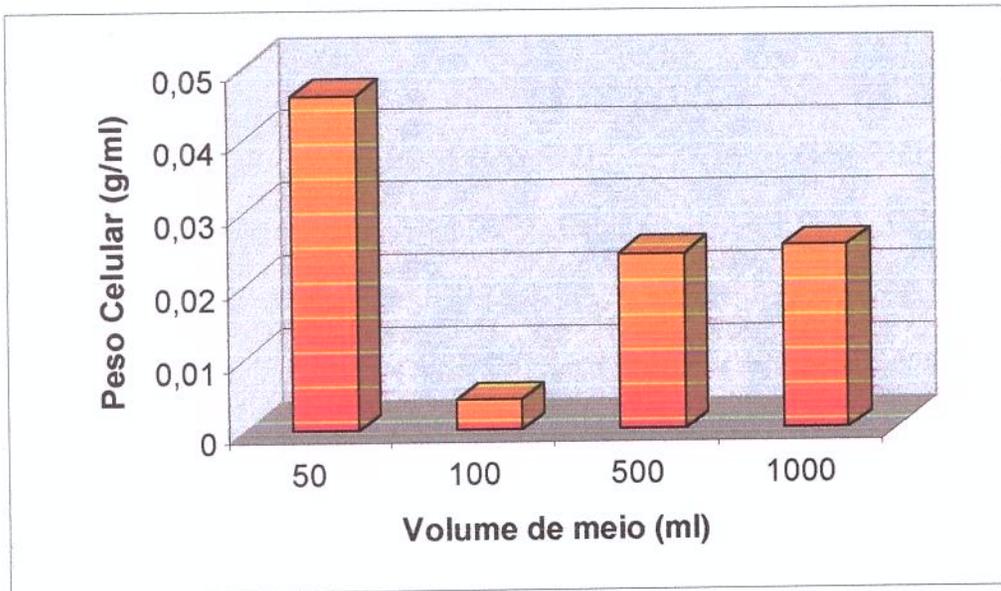


Figura 9- Influência de diferentes volumes do meio de produção de células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 contendo melaço com 10% de açúcares redutores totais, 700 ppm de KH_2PO_4 e pH 5.0 a 30° C após 24 horas no crescimento celular.

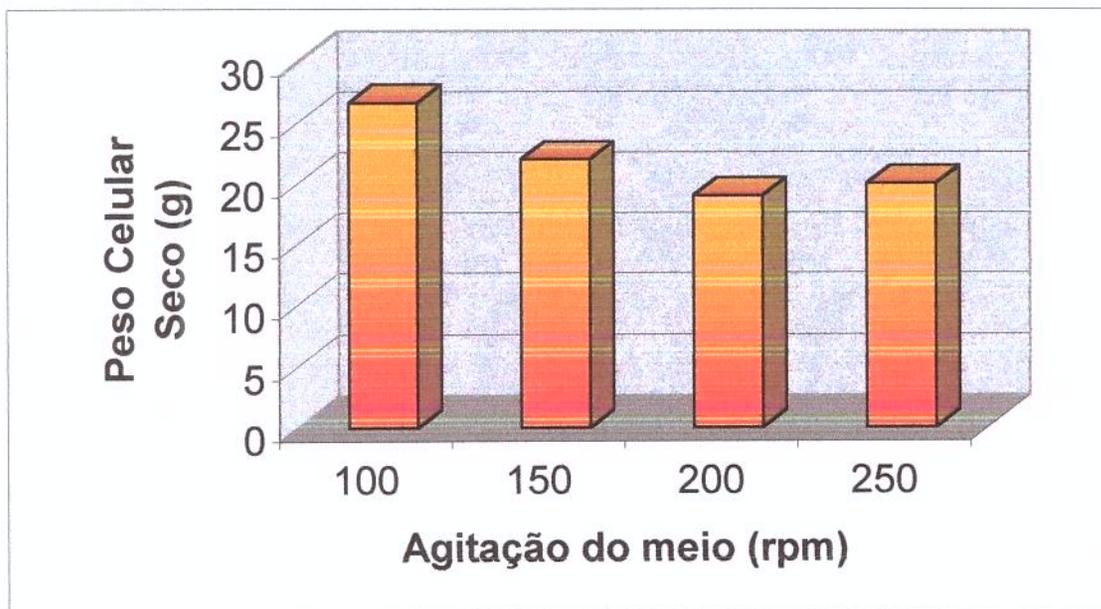


Figura 10- Influência de diferentes condições de agitação (rpm) do meio de produção de células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 contendo 1000 ml de melaço com 10% de açúcares redutores totais, 700 ppm de KH_2PO_4 e pH 5.0 a 30° C após 24 horas no crescimento celular.

Através das Tabelas (11 e 12) apresentadas anteriormente , podemos concluir que a produção de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 apresentou um maior crescimento celular num volume de meio de 1000 ml com agitação de 100 rpm. O que ocorreu foi que ao obtermos a produção de cerca de 32g de células (peso úmido) em 1000 ml permitimo-nos utilizar esse volume, pois condizia com a necessidade dos experimentos posteriores. Para tentar otimizar essa produção nesse determinado volume, agitamos os erlenmeyers sob diferentes rotações e pudemos observar que a 100 rpm houve um ligeiro aumento na produção celular de 32 g de células (peso úmido) em média para 34.2 (peso úmido) g de células. Isto beneficiou-nos de maneira que na centrifugação e na pesagem de 30 g de células (peso úmido), necessárias para a realização dos testes com fermentação rápida (3 horas), pudéssemos ter uma margem de segurança, pequena, mas suficiente. O aumento celular, em presença de 100 rpm de agitação, provavelmente aconteceu, em função do crescimento das células em presença de oxigênio, uma vez que para as leveduras traços desse elemento age como aceptor terminal de elétrons da cadeia respiratória e parece estar envolvido com a síntese do ácido oleico e do ergosterol, estes sim, responsáveis diretos pelo crescimento celular (ANDREASEN *et al.*, 1954). Destacamos o fato de que o aumento da produção de células em agitação menor significa uma redução no consumo de energia no âmbito industrial, o que vem a ser muito importante em termos de custos.

4.6- Estudo da fermentação alcoólica de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 realizada após 3 horas com adição de CTAB.

Os resultados dos efeitos de diferentes temperaturas, valores de pH e concentrações de açúcar são mostrados nas Tabelas 13, 14 e 15 e nas Figuras 11, 12 e 13.

Ao observarmos e compararmos os dados apresentados para a fermentação realizada em 3 horas com os dados apresentados para a fermentação realizada em 24 horas, notamos que ambos os experimentos obtiveram suas condições ótimas a 24% de açúcares redutores totais e pH 5.5, variando apenas a condição da temperatura do meio: de 30° C utilizado na fermentação tradicional (24 horas) para 35°C utilizado na fermentação rápida (3 horas). Concluimos que na diminuição no tempo de fermentação, de 24 horas para 3 horas, mesmo com o grande aumento de massa celular, não houve um requerimento maior de substrato (24 % de açúcares redutores) e nem necessidade de se alterar o pH do meio, o que significa, segundo AMORIM *et al.* (1985), que o aumento na concentração do inóculo leva a uma maior eficiência na fermentação decorrente de um menor consumo de açúcar utilizado para a formação celular; além de que também leva a uma diminuição da severidade da inibição pelo etanol (VEGA *et al.*, 1987)

Quanto ao aumento de temperatura requerido, os benefícios ficam por conta de que à temperaturas um pouco mais elevadas ocorre um aumento

na permeabilidade da membrana plasmática em consequência da alteração da composição de ácidos graxos. Com o aumento da temperatura há um acréscimo de ácidos graxos insaturados que proporcionam ótima fluidização na membrana para atividades celulares (D'AMORE & STEWART, 1987). Este fato pode contribuir para elucidar a causa do rendimento de etanol obtido em 24 horas (97,34 % de etanol) ser superior à quantidade obtida em 3 horas (74,50% de etanol), o que ocorreu, provavelmente, é que com a adição de CTAB – que já atua modificando a permeabilidade celular – aliado ao aumento da temperatura e a redução do próprio tempo de fermentação, tenham causado efeitos prejudiciais as células e com isso uma diferença na quantidade do etanol produzido. Embora, nos experimentos realizados sem o uso de CTAB, o índice de etanol obtido na fermentação em 24 horas (71.02 % de etanol) também foi maior que o obtido na fermentação realizada em 3 horas (56, 62 % de etanol), o que demonstra que a temperatura é um fator de grande importância à viabilidade celular. A redução no tempo de fermentação é possível, embora os rendimentos sejam consideravelmente reduzidos o que pode ser solucionado com a adição de CTAB que traz um aumento de 3,48% de etanol produzido (74.50%) em relação à fermentação realizada durante 24 horas sem adição de CTAB (71.02%). Este aumento requerido alcançou o seu ótimo de produção de etanol em 35° C decaindo em 40° C, o que contradiz os resultados apresentados na literatura, por JONES *et al.* (1981), que justifica o aumento na produtividade de álcool com o fato de que a 40° C ocorra um favorecimento da produção da enzima álcool desidrogenase. Essa diferença relaciona-se provavelmente à adição do CTAB que fluidifica a membrana tornando a células mais vulneráveis à temperatura mais elevada, mas proporcionando por outro lado, um aumento na produção de etanol em

temperatura menos elevada. Este é um fato positivo, uma vez que por volta de 40 ° C as células são sujeitas facilmente a lise celular devido a essa mesma fluidização. O aumento da fluidização da célula leva a um aumento na produção de álcool e uma diminuição no tempo de fermentação embora leve a um aumento na taxa de morte celular, portanto deve-se utilizar altas concentrações de inóculo na produção de etanol combustível em fermentações rápidas (PANCHAL & TAVARES, 1990). Deve-se levar em conta que a redução do tempo de fermentação no âmbito industrial é importante não só para o binômio tempo-custo como também para a diminuição da possibilidade de crescimento de outros microorganismos não desejáveis.

Tabela 13- Dados relativos ao efeito de diferentes temperaturas na fermentação alcoólica de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 100 ml de melão com 24% de açúcares redutores totais, 700 ppm de KH₂PO₄, 0.0025% de CTAB a pH 5.5 após 3 horas.

Temperatura (°C)	Varição de massa g/100ml	Rendimento em etanol (%)
28	4.7	46.22
30	5.0	49.70
35 (controle)	5.3	52.44
35	7.2	71.10
40	4.8	47.85

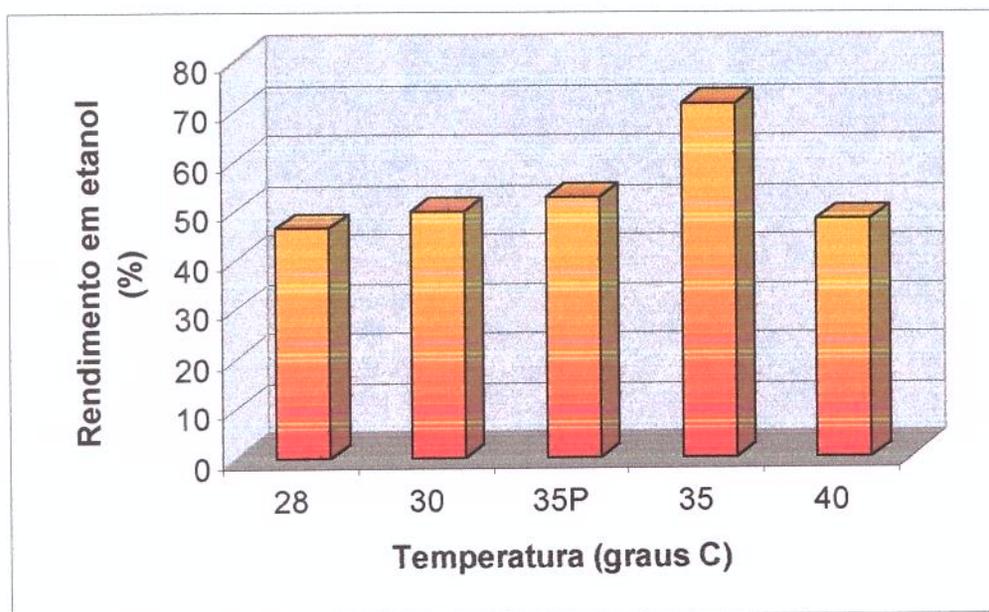


Figura 11- Influência de diferentes temperaturas na fermentação alcoólica de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 100 ml de melaço com 24% de açúcares redutores totais com 700 ppm de KH_2PO_4 , 0.0025% de CTAB a pH 5.5 após 3 horas e analisadas através de cromatografia gasosa.

Tabela 14- Dados relativos ao efeito de diferentes valores de pH na fermentação alcoólica de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 100 ml de melão com 24% de açúcares redutores totais, 700 ppm de KH₂PO₄ e 0.0025% de CTAB a 35° C após 3 horas.

PH	Varição de massa g/100ml	Rendimento em etanol(%)
4.5	5.0	49.90
5.0	5.3	52.24
5.5 (controle)	5.8	57.31
5.5	7.4	73.58
6.0	5.7	56.42

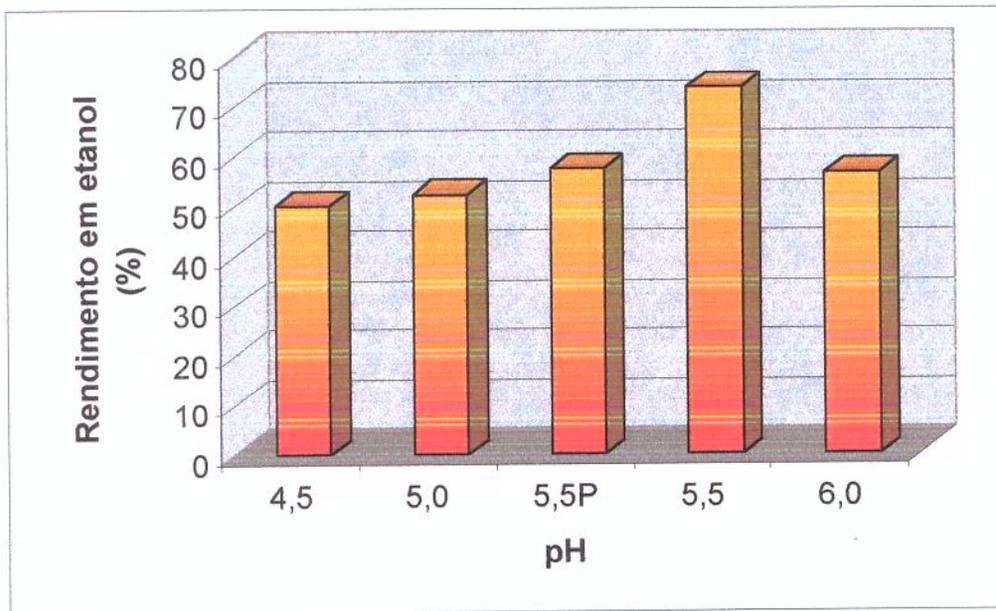


Figura 12- Influência de diferentes valores de pH na fermentação alcoólica de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 100 ml de melão com 24% de açúcares redutores totais com 700 ppm de KH_2PO_4 e com 0.0025% de CTAB a 35° C após 3 horas e analisadas através de cromatografia gasosa.

Tabela 15- Dados relativos ao efeito de diferentes concentrações de açúcares redutores totais na fermentação alcoólica de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 100 ml de melaço com 700 ppm de KH_2PO_4 , 0.0025% de CTAB a pH 5.5 a 35° C após 3 horas.

[açúcar] %	Varição de massa g/100ml	Rendimento em etanol (%)
20	5.3	52.53
24 (controle)	5.7	56.62
24	7.5	74.50
30	5.5	54.29
35	5.0	49.99

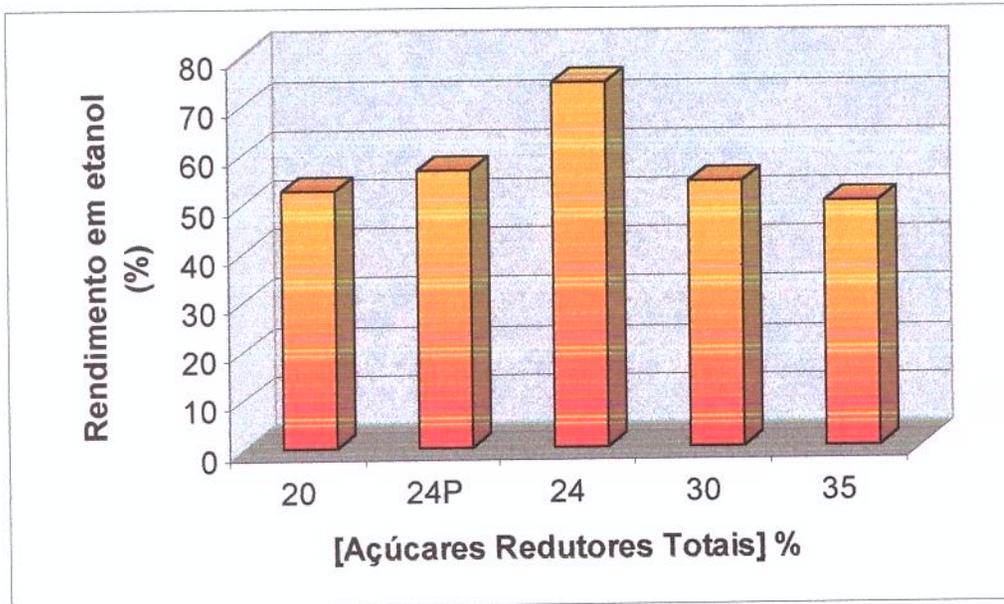


Figura 13- Influência de diferentes concentrações de açúcares redutores totais na fermentação alcoólica de *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 em 100 ml de melaço, 700 ppm de KH_2PO_4 , 0.0025% de CTAB e pH 5.5 a 35° C após 3 horas e analisadas através de cromatografia gasosa.

O uso do CTAB apesar de acarretar um aumento no custo final do produto, em cerca de 10%, leva a um incremento no rendimento alcoólico de 17.88% em 3 horas de fermentação e 26.32% em 24 horas de fermentação. O que demonstra a viabilidade de sua utilização, uma vez que a quantidade de álcool produzida hoje no Brasil, apesar de elevada, não é suficiente para atender a demanda mundial do produto nas suas mais variadas aplicações.

5- Conclusões

- 1- As condições ótimas para o crescimento celular de linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* AJ061 foi: 10 % de açúcares redutores totais, pH 5.0 e 30° C num período de 24 horas.

- 2- A concentração de 0.0025 % de CTAB foi a concentração ótima que promoveu um aumento de 16.12 % na produção de etanol em relação à produção da fermentação alcoólica sem adição de CTAB, no período de 24 horas.

- 3- As condições ótimas para a fermentação alcoólica adicionada de CTAB e realizada no período de 24 horas foram de : 24 % de açúcares redutores totais, pH 5.5 e 30° C.

- 4- As condições ótimas para a fermentação alcoólica adicionada de CTAB e realizada durante 3 horas foram de : 24 % de açúcares redutores totais, pH5.5 e 35° C, com uma concentração celular (peso úmido) de 30g/100ml.

- 5- Na fermentação alcoólica rápida, realizada durante 3 horas, não houve um requerimento de substrato maior do que aquele utilizado na fermentação alcoólica realizada durante 24 horas (24% de açúcares redutores).
- 6- O uso do CTAB na fermentação alcoólica levou a um aumento na produção de álcool, sendo que a quantidade de álcool produzida em 3 horas com o uso de CTAB foi maior que a produzida na fermentação de 24 horas, sem CTAB, em cerca de 4%.

6- Referências Bibliográficas

1. AMORIM, H.V. Nutrição mineral de leveduras. Aspectos teóricos e práticos. IN: **Semana da fermentação alcoólica “Jaime Rocha de Almeida”**, 4 Piracicaba, Anais. ESALQ/STAB. P. 44-48, 1985.
2. ARMSTRONG, W. McD.. Surface active agents and cellular metabolism. I. The effect of cationic detergents on baker's yeast. **Arch. Biochem. Biophys.** **71**, 137, 1957.
3. ANDREASEN, A. A.; STIER, T.J.B. Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. (II) Unsaturated fatty acid requirements for growth in a defined medium. **J. Cell Comp. Physiol.** **43**:271-81.
4. ARTHUR, H.; WATSON, K. Thermal adaptation in yeasts: growth, temperatures, membrane lipid, and cytochrome composition of psychrophilic, mesophilic, and thermophilic yeasts. **J. Bacterol.** **128**(1):56-68,1976.

5. BARFORD, J.P.; PHILLIPS, J.P.; ORLOWSKI, J.H. A new model of multiple sugars by *Saccharomyces cerevisiae*, II **Bioprocess Eng.** 7:303-7, 1992.
6. BARNES, J. M.. A new disinfectant and cleaning agent. **Lancet** 242 (6192), 531-32, 1942.
7. BHAT, N.; NAINA, N. S.; GOWDA, L. R. and BHAT, S. G.. Detergent permeabilized yeast cells as the source of intracellular enzymes for estimation of biomolecules. **Enzyme Microb. Technol.** 15, 796-800, 1993.
8. BERTOLINI, M.C.;ERNANDES, J.R.; LALUCE, C.. New Yeast strains for alcoholic fermentation at higher sugar concentration. **Biotech. Lett.** 13 (3):197-202, 1991.
9. 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. **Eur. J. Appl. Microbiol. Biotech** 11: 151-55, 1981.
10. CAMHI, J. D.. *J. Physiol.* 32, 1905 In: A fermentação alcoólica e sua otimização. **Brasil açucareiro, XCIV** (2), 126-32, 1979.

11. CARTWRIGHT, C.P.; ROSE, A.H.; CALDERBANK, J.; KEENAN, M.H.J.. Solute transport. IN: ROSE, A.H. & HARRISON, J.S. **The Yeasts**. 2nd ed. Academic Press, 1989, vol.3, cap.2, p.5-56.
12. CASON, D.T.; REID, G.C.; GATNER, E.M.S. On the differing rates of fructose and glucose utilisation in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Inst. Brew.** **93**: 23-25, 1987.
13. CHAPMAN, C.; BARTLEY, W. The kinetics of enzyme changes in yeast under conditions that cause the loss of mitochondria. **Bioch. J.** **107**:455-65, 1968.
14. CIFTCI, T.; CONSTANTINIDES, A.; WANG, S.S. Optimization of conditions and cell feeding procedures for alcohol fermentation. **Biotech. Bioeng.** **XXV** (8): 2007-23, 1983.
15. CUCCI, M. W.. Quaternary ammonium compounds, a review. **Soap Sant. Chem.** **25** (10), 129-34, 1949.
16. D'AMORE, T.; PANCHAL, C.J.; STEWART, G.G. The effect of osmotic pressure on the intracellular accumulation of ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation in wort. **J. Inst. Brew.** **93**: 472-76, 1987.

17. D'AMORE, T.; PANCHAL, C.J.; STEWART, G.G. Intracellular ethanol accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. **Appl. Env. Microb.** **54**:110-14, 1988.
18. D'AMORE, T.; STEWART, G. G. Ethanol tolerance of yeast. **Enzyme microb. Technol.** **9** (6): 322-330, 1987.
19. van DJIKEN, J.P.; SCHEFFERS, W.A. Studies on alcoholic fermentation in yeasts. **Innovat. Biotechnol.**: 497-506, 1984.
20. DOMBEK, K.M.; INGRAM, L.O. Magnesium limitation and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation. **Appl. Env. Microbiol.** **52** (5): 975-81, 1986.
21. EGUCHI, S. Y.; YOKOYA, F.; PRADA, G. M. M.; UMINO, C. Y. E CASTRO, M. M. S.. Usinas de Açúcar e Álcool: Estudo das Leveduras e dos Fatores que Afetam a Fermentação. In: **Curso de Treinamento**. Campinas, Fundação Tropical de Pesquisas e tecnologia André Tosello". 1995.
22. EKUNSANMI, T.I.; ODUNFA, S. A. Ethanol olerance, sugar tolerance and invertase activities of some yeasts strain isolated from steep

water of fermentating cassava tubers. **J. Appl. Bacteriol.** **67**: 672-75, 1990 .

23. FEDERAL REGISTER, 1969. Part 121-food additives; subpart F-food additives resulting from contact with containers or equipment and food additives otherwise affecting food. 11/26/1969; Fed. Reg. 34/117, 18556. 12/13 1969; Fed. Reg. 34/239, 19655. 8/9/1974; Fed. Reg. 39/155, 28627. Apud: PETROCCI, A .N. Disinfection, strerilization and preservation. Cap. 14, 309-329, 1983. **In**: UENO, M.. Tese de doutorado: Efeito do Brometo de Cetiltrimetilamônio no metabolismo e na fisiologia de bactérias e leveduras; Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, 1992.

24. FIECHTER, A.; FUHRMANN,G.F.; KÄPELLI,O. Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. **Adv. Microbiol. Phys.** **22**:123-83, 1981.

25. de la FUENTE, G.; SOLS, A. Transport of sugars in yeast. II. Mechanism of utilization of dissaccharides and related glycosides. **Biochem. Biophys. Acta** **56**:49-62

26. FURTADO, R.. O incerto amanhã. **In**: **Revista Globo Rural** **128**, 78-85, 1996.

27. GALE, E. F.; TAYLOR, E. S.. The action of tyrocidin and detergents in liberating amino-acids from bacterial cells. **Nature**. **157**, 549-50, 1946.
28. GANCEBO, C.; SERRANO, R. Energy-yielding metabolism. IN: **The Yeasts**, 2nd ed. Academic Press, 1989, vol.3 cap.6 p. 205-59.
29. GAO, C.; FLEET, G.H.. The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of *wine yeasts*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. **J. Appl. Bacteriol.** **65**: 405-9, 1988.
30. GILBY, A. R.; FEW, A.V.. Lysis of protoplasts of *Micrococcus lysodeikticus* by ionic detergents. **J. Gen. Microbiol.** **23**, 19-25, 1960.
31. GILLILAND, R. B.. Brewing yeast, IN: **Brewing Science**, vol.II ed. Pollok, J.R.A. Academic Press, London, 1-60, 1981
32. GOWDA, L.R.; BACHHAWAT, N.; BHAT, S. G.. Permeabilization of bakers' yeast by cetyltrimethylammonium bromide for intracellular enzyme catalysis. **Enzyme Microb. technol.** **13**, 154-57, 1991.

33. HALÁSZ, A.; LÁSZTITY, R. **Use of yeast biomass in food production**, CRC press, 1995, cap. 4,p. 45-60.
34. HARRISON, J.S.; GRAHAM. Yeast in distillery practice. IN: ROSE, A.H. & J.S. HARRISON. **The Yeast**, Academic Press, 1970. V.3.298p.
35. HUGO, W.B. The mode of action of antibacterial agents. **J. Appl. Bacteriol.** **30** (1): 17-50, 1967.
36. JACOBS, W. A.; HEIDELBERGER, M.; AMOS, H.L..The bactericidal properties of the quaternary salts of hexamethylenetetramine. II. The relation between constitution and bactericidal action in the substituted benzylhexamethylenetetrammonium salts. **J. Exp. med.** **23**, 569, 1916.
37. JONES, R. P.; PAMMENT, N. ; GREENFIELD, P. F.. Alcohol fermentation by yeasts: The effect of environmental and other variables. **Process Biochemistry** **16**, 42-49, 1981.
38. JOSHI, M. S.; GOWDA, L. R.; BHAT, S. G..Permeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces fragilis*) to lactose by

cetyltrimethylammonium bromide. **Biotechnol. Letts.** **9** (8), 549-54, 1987.

39. JOSHI, M. S.; BACHHAWAT, N.; BHAT, S. G.. Stabilization of cetyltrimethylammonium bromide permeabilized yeast whole cell lactase. **Biotechnol. Letts.** **11** (5), 349-52, 1989.

40. KHUN, R. ; BIELIG, H.J. Uber invertseijen. I: die Einwirkung von invertseifen auf Eiweiss-stoffe. **Ber. Dt. Chem. Ger.** **73**: 1080, 1940 IN: UENO, M.. Tese de doutorado: Efeito do brometo de cetiltrimetilamônio no metabolismo e na fisiologia de bactérias e leveduras; Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1992.

41. KUNKEE, R.E.; GOSWELL, R.. Tables wines, IN: **Economic microbiology**, Vol I ed. Rose, A.H. Academic Press, london, 315-386, 1977.

42. LALUCE, C.; PALMIERI, M.C.; CRUZ, C.L. Growth and fermentation characteristics of new selected strains of *Saccharomyces cerevisiae* at high temperature and high cell densities. **Biotech. Bioeng.** **37**:528-36, 1990.

43. LARUE, 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. Lett.** 6 (10):687-92 .
44. LEES, R.. **Manual de análise de alimentos**, Tradução de A. M.
BARRADO. Editorial Acribia, Zaragoza, Espanha, 1969.
45. MEI, Efeito do conteúdo da umidade residual. **Criobiologic** 2 (5): p,
1966
46. MILLER, G. L.. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination
of reducing sugar. **Anal. Chem.** 31 (3), 426-28, 1959.
47. MAGER, W.H.; VARELA, J.C.S. Osmostress response of the yeast
Saccharomyces. **Mol. Microbiol.** 10(2): 253-58, 1993.
48. MARQUES, T.A.. Influência de dois níveis de temperatura e reciclo de
células na fermentação alcoólica. Tese de mestrado apresentada à
ESALQ-USP, 1991.
49. MWESIGYE, P.K ; BARFORD, J.P. Transport of sucrose by
Saccharomyces cerevisiae **J. Ferm. Bioeng.** 77(6): 687-90, 1994

50. NAGODAWITHANA, T.W.; CASTELLANO, C.; STEINKRAUS, K.H. Effect of dissolved oxygen, temperature, initial cell count, and sugar concentration on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in "rapid fermentation". **Appl. Microbiol.** **28** : 383-91, 1974
51. NAGODAWITHANA, T.W.; STEINKRAUS, K.H. Influence of the ratio of the ethanol production and accumulation on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in "rapid fermentation". **Appl. Environ. Microbiol.** **31**:158-62, 1976.
52. NAINA, N. S.; GOWDA, L. R.; BHAT, S.G.. Preparation of NADH/NADPH using cetyltrimethylammonium bromide permeabilized baker's yeast cells. **Anal. Biochem.** **196**, 234-37, 1991.
53. NOVAK, M.; STREHAIANO, P.; MORENO, M.; GOMA. Alcoholic fermentation: on the inhibitory effect of ethanol. **Biotechnol. Bioeng.** **XXIII**: 201-11, 1981
54. OURA, E. Effect of aeration intensity on the biochemical composition of baker's yeast. I Factors affecting the type of metabolism. **Biotechnol. Bioeng.** **XVI** (9): 1197-212, 1974

55. PANCHAL, C.J.; STEWART, G.G. The effect of osmotic pressure on the production and excretion of ethanol and glycerol by a brewing yeast strain. **J. Inst. Brew.** **86**: 207-10, 1980
56. PANCHAL, C.J. ; TAVARES, F.C.A.. Yeast strain selection for fuel ethanol production. IN: PANCHAL, C.J. **Yeast strain selection** ed.Marcel Deckker, cap. 8, p.225-43, 1990.
57. PARK,Y.; RIVERA, B.. Alcohol production from various enzyme-converted starches with or without cooking. **Biotech. and Bioeng.** **24**, 495-500, 1982.
58. PRADA, G.M.M.. Usinas de Açúcar e Álcool: Estudo das leveduras e dos Fatores que afetam a Fermentação. In: **Curso de Treinamento**. Campinas, Fundação Tropical de Pesquisas e tecnologia “André Tosello”, 1995.
59. RATLEDGE, C.; EVANS, C.T. Lipids and their metabolism. IN: ROSE, A.H. & HARRISON, J.S. **The Yeasts**. 2nd ed. Academic Press, 1989 vol.3 cap.10,p.367-455
60. 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, **9**, 103-21, 1980.

61. SHELTON, R. S.; van CAMPEN, M. G.; TILFORD, H. C. LANG, L.; NISONGER, BANDELIN, F. J.; RUBERBOENIG, H. L. Quaternary ammonium salts as germicides I. Non acylated quaternary ammonium derived from aliphatic amines. **J. Am. Chem. Soc.** **68**, 753-55, 1946.
62. SKOTNICKI, M. L.; LEE, K. J.; TRIBE, D. E.; ROGERS, P. L. .In: **Genetic Engineering of microorganisms for Chemical**. 271-90. Eds. A. H. Hollaender et al., Plenum Press (new York), 1981.
63. SMART, K. A . The importance of the brewing yeast cell wall. **Brewers'guardian** **4**, 44-50, 1995.
64. STREHALIANO, N.; MOTA, M.; GOMA, G. Effects of inoculum level on kinetics of alcoholic fermentation. **Biotechnol. Lett.****5**:135-40, 1983.
65. TAKESHIGE, K.; OUCHI, K.. Factors Affecting the ethanol productivity of yeast in molasses. **J. Ferment. Bioeng.** **79** (5), 449-52, 1995.

66. UENO, M.. Tese de doutorado: Efeito do brometo de cetiltrimetilamônio no metabolismo e na fisiologia de bactérias e leveduras; Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1992.
67. van UDEN, N. Ethanol toxicity and ethanol tolerance in yeast. IN: TSAO, G.T. **Annual Reports on Fermentation Procees**, ed.Academic Press, 1985, vol.8, cap. 2, p.11-58
68. VEGA, J.L.; NAVARRO, A.R.; CLANSEN,E.C.; GLADDY, J.L.. Effects of inoculum size on ethanol inhibition modeling and other fermentation parameters. **Biotechnol. Bioeng.** **29**:633-38, 1987
69. WATSON, K. Temperature relations. IN: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. **The Yeasts**.2nd ed. Academic Press, 1987, vol.2, cap.3 p.41-71
70. WHITE, J.. Effects of common bactericidal substances and of heat on yeast growth and viability. **J. Inst. Brewing.** **58** (6), 470-79, 1953.

71. YAMAMURA, M.; TAKEO, K.; KAMIHARA, T. *Saccharomyces* yeast cells grown at elevated temperatures are susceptible to autolyses. **Agric. Biol. Chem.** **55**(11), 2861-64, 1991