

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS
BIOTECNOLÓGICOS

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

***CLASSIFICAÇÃO DAS CEPAS DE LEVEDURAS DOMINANTES
DE PROCESSOS FERMENTATIVOS UTILIZANDO
PARÂMETROS FERMENTATIVOS E TAXONOMIA NUMÉRICA***

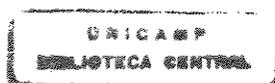
Autor: PATRICIA CANDIOTO MIGLIARI

Orientador: PROF. DR. SILVIO ROBERTO ANDRIETTA

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Campinas - São Paulo

Maio/2001



UNICAMP
M588c
Ex.
DMBO BC/45676
ROC. 16. 392/01
C D
PREC. R\$ 11,00
DATA 02/08/01
N.º CPD...

CM00158275-3

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

M588c Migliari, Patrícia Candioto
Classificação das cepas de leveduras dominantes de
processos fermentativos utilizando parâmetros
fermentativos e taxonomia numérica / Patrícia Candioto
Migliari. --Campinas, SP: [s.n.], 2001.

Orientador: Silvio Roberto Andrietta
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Fermentação. 2. Levedos. 3. Taxonomia
numérica. 4. Álcool - Indústria. I. Andrietta Silvio
Roberto. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química.

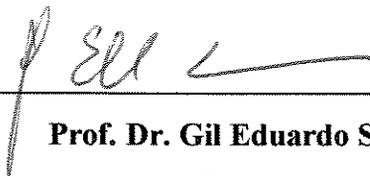
A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Andrietta', is positioned above a solid horizontal line.

Prof. Dr. Silvio Roberto Andrietta
(Orientador)

Dissertação de mestrado defendida por *Patricia Candioto Migliari* e aprovada em 10 de maio de 2001 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof. Dr. Silvio Roberto Andrietta
(Orientador)



Prof. Dr. Gil Eduardo Serra
(Titular)



Prof. Dr. Luiz Carlos Basso
(Titular)

DEDICATÓRIA

*Ao Alessandro, meu marido, pelo
exemplo, incentivo e carinho.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*À FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa
do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro e
no aprimoramento dos conhecimentos técnicos.*

AGRADECIMENTOS

- Ao Professor Dr. Silvio Roberto Andrietta por sua orientação e apoio dedicados ao desenvolvimento deste trabalho.
- À Professora Dra. Maria da Graça Stupiello Andrietta pela colaboração, apoio e dedicação em cada etapa deste trabalho.
- Aos meus pais Iracema e Clorivaldo e aos meus irmão Flávio e João Vitor, pelo apoio e incentivo.
- À Banca examinadora pelas sugestões e correções.
- Aos amigos do CPQBA, Cibele, Márcia, Milene, Marcelo, Cláudia, pelo carinho e atenção.

SUMÁRIO

| | |
|--|--------------|
| Lista de tabelas | xix |
| Resumo | xxiii |
| Summary | xxv |
| 1 - INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 3 |
| 2.1 - EVOLUÇÃO DOS PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA..... | 3 |
| 2.1.1. <i>Processos Clássicos</i> | 5 |
| 2.1.2 - <i>Processo Batelada Alimentada ou Melle-Boinot</i> | 5 |
| 2.1.3 - <i>Processo Contínuo</i> | 6 |
| 2.2 - OS MICRORGANISMOS NOS PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO | 7 |
| 2.2.1 - <i>Flora do processo</i> | 7 |
| 2.2.2 - <i>Leveduras</i> | 8 |
| 2.3 - METODOLOGIA PARA IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS | 10 |
| 2.3.1 - <i>Meios Diferenciais</i> | 10 |
| 2.3.2 - <i>Taxonomia Clássica</i> | 11 |
| 2.3.3 - <i>Taxonomia Numérica</i> | 12 |
| 2.3.4 - <i>Métodos rápidos de identificação de leveduras</i> | 12 |

| | |
|---|-----------|
| 2.3.5 - DNA - Fingerprinting..... | 13 |
| 2.3.6 - Parâmetros baseados nas características fermentativas..... | 14 |
| 3 - MATERIAL E MÉTODOS..... | 17 |
| 3.1 - ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO..... | 17 |
| 3.1.1 - Meio de cultivo..... | 17 |
| 3.1.2 - Diluição da amostra..... | 17 |
| 3.1.3 - Plaqueamento..... | 18 |
| 3.1.4 - Contagem e caracterização morfológica..... | 18 |
| 3.2 - VELOCIDADE ESPECÍFICA MÁXIMA DE CRESCIMENTO ($\mu_{\text{MÁX}}$)..... | 19 |
| 3.2.1 - Preparo do Inóculo..... | 19 |
| 3.2.2 - Meio de Cultivo..... | 19 |
| 3.2.3 - Condução do Ensaio..... | 19 |
| 3.2.4 - Cálculo de $\mu_{\text{máx}}$ | 21 |
| 3.3 - FERMENTAÇÃO..... | 22 |
| 3.3.1 - Preparo do Inóculo..... | 22 |
| 3.3.2 - Meio de Cultivo..... | 22 |
| 3.3.3 - Condução do Ensaio..... | 22 |
| 3.4 - MÉTODOS ANALÍTICOS..... | 25 |
| 3.4.1 - Determinação da Massa Seca..... | 25 |

| | |
|--|----|
| 3.4.2 - <i>Determinação do Etanol Produzido</i> | 25 |
| 3.4.2.1 - Destilação da Amostra..... | 25 |
| 3.4.2.2 - Preparo da Amostra..... | 26 |
| 3.4.3 - <i>Determinação da Glicose</i> | 26 |
| 3.4.3.1 - Preparo da Amostra..... | 26 |
| 3.4.4 - <i>Determinação de Quantidade de Nitrogênio</i> | 27 |
| 3.4.4.1 - Princípio do Método..... | 27 |
| 3.4.4.2 - Condução da Análise..... | 27 |
| 3.4.4.3 - Procedimento para Destilação do Nitrogênio | 28 |
| 3.4.4.4 - Titulação do Nitrogênio..... | 28 |
| 3.4.4.5 - Cálculo do Percentual de Nitrogênio Total | 28 |
| 3.5 - CAPACIDADE FERMENTATIVA | 29 |
| 3.5.1 - <i>Determinação da massa de etanol produzida (ETOH)</i> | 31 |
| 3.5.2 - <i>Determinação da massa de glicose consumida (GLI)</i> | 31 |
| 3.5.3 - <i>Determinação da massa celular produzida (MX)</i> | 32 |
| 3.5.4 - <i>Obtenção da produção específica de etanol (Y_p/s)</i> | 33 |
| 3.5.5 - <i>Obtenção da produção específica de células (Y_x/s)</i> | 33 |
| 3.5.6 - <i>Obtenção da produtividade (θ)</i> | 33 |
| 3.5.7 - <i>Obtenção da velocidade de consumo de substrato (VCS)</i> | 34 |

| | |
|---|-----------|
| 3.5.8 - <i>Determinação do Nível de conversão do substrato (NCO)</i> | 34 |
| 3.6 - TAXONOMIA NUMÉRICA | 35 |
| 3.6.1 - <i>Condução dos testes</i> | 36 |
| 3.6.1.1 - Inóculo..... | 36 |
| 3.6.1.2 - Preparo dos açúcares para assimilação e fermentação | 36 |
| 3.6.1.3 - Assimilação de nitrato de potássio (KNO ₃) | 37 |
| 3.6.1.4 - Crescimento em presença de alta concentração osmótica | 37 |
| 3.6.1.5 - Hidrólise do amido | 38 |
| 3.6.1.6 - Crescimento a 37°C..... | 38 |
| 3.6.1.7 - Forma celular | 38 |
| 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 39 |
| 4.1 – USINA ALVORADA | 39 |
| 4.1.1 - <i>Distribuição populacional das leveduras</i> | 39 |
| 4.1.2 - <i>Características cinéticas das leveduras</i> | 41 |
| 4.1.3 - <i>Classificação das cepas segundo Andrietta et al., 1999</i> | 49 |
| 4.1.4 - <i>Concentração de nitrogênios das leveduras</i> | 51 |
| 4.2 – CITROSUCO PAULISTA – UNIDADE MATÃO | 59 |
| 4.2.1 - <i>Resultados referentes a participação populacional</i> | 59 |
| 4.2.2 - <i>Características cinéticas das leveduras</i> | 60 |

| | |
|--|-----------|
| <i>4.2.3 - Classificação das leveduras segundo ANDRIETTA et al., 1999.....</i> | <i>63</i> |
| <i>4.2.4 - Concentração de nitrogênios das leveduras</i> | <i>64</i> |
| <i>4.2.5 - Taxonomia numérica das leveduras</i> | <i>66</i> |
| 5 - CONCLUSÃO..... | 70 |
| 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 72 |

LISTA DE TABELAS

- Tabela 01:** Limites das faixas de variação dos níveis alto, médio e baixo dos parâmetros utilizados na classificação das cepas isoladas.....29
- Tabela 02:** Valores de referência da base de cálculo dos parâmetros utilizados na classificação das cepas30
- Tabela 03:** Testes realizados para obtenção dos códigos numéricos das espécies de leveduras para caracterização através de Taxonomia Numérica35
- Tabela 04:** Participação Populacional (%) e Concentração (UFC/ml) das cepas isoladas nas coletas realizadas na Usina Alvorada39
- Tabela 05:** Resultados de: massa seca de inóculo (MS inóc.), massa seca produzida (MS prod.), etanol produzido (ET prod.), açúcar residual (GLI res.), CO₂ formado (CO₂) e glicose inicial no mosto (GLI in) para as cepas isoladas na Usina Alvorada (Fermentação 1).....42
- Tabela 06:** Resultados de: massa seca de inóculo (MS inóc.), massa seca produzida (MS prod.), etanol produzido (ET prod.), açúcar residual (GLI res.), CO₂ formado (CO₂) e glicose inicial no mosto (GLI in) para as cepas isoladas na Usina Alvorada (Fermentação 2).....42
- Tabela 07:** Resultados de: massa seca de inóculo (MS inóc.), massa seca produzida (MS prod.), etanol produzido (ET prod.), açúcar residual (GLI res.), CO₂ formado (CO₂) e glicose inicial no mosto (GLI in) para as cepas isoladas na Usina Alvorada (Fermentação 3).....43

| | |
|--|----|
| Tabela 08: Resultados de: massa seca de inóculo (MS inóc.), massa seca produzida (MS prod.), etanol produzido (ET prod.), açúcar residual (GLI res.), CO ₂ formado (CO ₂) e glicose inicial no mosto (GLI in) para as cepas isoladas na Usina Alvorada (Fermentação 4)..... | 44 |
| Tabela 09: Resultados de: massa seca de inóculo (MS inóc.), massa seca produzida (MS prod.), etanol produzido (ET prod.), açúcar residual (GLI res.), CO ₂ formado (CO ₂) e glicose inicial no mosto (GLI in) para as cepas isoladas na Usina Alvorada (Fermentação 5)..... | 45 |
| Tabela 10: Resultados de: massa seca de inóculo (MS inóc.), massa seca produzida (MS prod.), etanol produzido (ET prod.), açúcar residual (GLI res.), CO ₂ formado (CO ₂) e glicose inicial no mosto (GLI in) para as cepas isoladas na Usina Alvorada (Fermentação 6)..... | 45 |
| Tabela 11: Parâmetros cinéticos, rendimento e produtividade das cepas isoladas do processo fermentativo da Usina Alvorada onde: Y _{x/s} - g MS/g substrato, VCS - g substrato/ L x h, NCO - %, Y _{p/s} - g ET/ g substrato, Ø - g ET/ L x h, µ _{máx} - h ⁻¹ | 47 |
| Tabela 12: Código de classificação das cepas de leveduras isoladas do processo fermentativo da Usina Alvorada..... | 49 |
| Tabela 13: Limites das faixas de variação correspondentes aos níveis baixo, médio e alto para a quantidade de nitrogênio..... | 51 |
| Tabela 14: Nitrogênio total (média) das cepas isoladas do processo fermentativo da Usina Alvorada..... | 52 |
| Tabela 15: Sequência numérica e classificação das cepas isoladas através da metodologia taxonomia numérica..... | 54 |
| Tabela 16: Resultado obtido para os testes realizados com cada cepa..... | 56 |

| | |
|--|----|
| Tabela 17: Classificação das cepas nos grupos A, B, C, D obtidos através dos testes de taxonomia numérica. | 57 |
| Tabela 18: Participação Populacional (%) e Concentração (UFC/ml) das cepas isoladas nas coletas realizadas na Citrosuco Paulista – Unidade Matão. | 59 |
| Tabela 19: Resultados das análises de massa seca de inóculo (MS inóc.), massa seca produzida (MS prod.), etanol produzido (ET prod.), açúcar residual (GLI res.) e CO ₂ formado (CO ₂) para as cepas isoladas na Citrosuco Paulista - Unidade Matão..... | 61 |
| Tabela 20: Parâmetros cinéticos, rendimento e produtividade das cepas isoladas do processo fermentativo da Citrosuco Paulista - Unidade Matão onde: Y _{x/s} - g MS/g substrato, VCS - g substrato/ L x h, NCO - %, Y _{p/s} - g ET/ g substrato, Ø - g ET/ L x h, µ _{máx} - h ⁻¹ | 62 |
| Tabela 21: Código de classificação das cepas de leveduras isoladas do processo fermentativo da Usina Citrosuco..... | 63 |
| Tabela 22: Nitrogênio total (média) das cepas isoladas do processo fermentativo da Usina Citrosuco | 65 |
| Tabela 23: Sequência numérica e classificação das cepas isoladas através da metodologia taxonomia numérica. | 66 |
| Tabela 24: Resultado obtido para os testes realizados com cada cepa. | 68 |
| Tabela 25: Classificação das cepas nos grupos A, B, C, D obtidos através dos testes de taxonomia numérica. | 68 |

RESUMO

Em processos fermentativos para produção de álcool é comum o desenvolvimento de leveduras que não seja aquela selecionada como inóculo. Estas leveduras, quando presentes, podem apresentar boas qualidades fermentativas ou não. Assim, o controle microbiológico na fermentação alcoólica é importante para a detecção das leveduras contaminantes, juntamente com a avaliação de seu comportamento fermentativo e sua identificação. Através desse acompanhamento, é possível prevenir e detectar problemas relacionados com a perda de eficiência industrial, que muitas vezes estão atrelados com a presença de leveduras contaminantes que apresentam baixas qualidades fermentativas. Ou ainda, identificar entre as leveduras isoladas, aquela que apresenta qualidades fermentativas adequadas ao processo em questão.

Este trabalho teve como objetivo estudar o comportamento populacional de processos fermentativos industriais que utilizam diferentes substratos (caldo de cana e caldo de laranja) e que utilizaram como inóculo uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* (Y904) produzida pela Mauri do Brasil

Foram coletadas amostras de vinho fermentado da Usina Alvorada e Citrosuco Paulista - Unidade Matão. As amostras foram plaqueadas em meio diferencial para leveduras (WLN), para o isolamento e contagem das leveduras dominantes. As leveduras isoladas foram avaliadas através da metodologia de Capacidade Fermentativa, onde são consideradas características cinéticas, de rendimento e produtividade (ANDRIETTA *et al.*, 1999). Neste sistema de classificação são utilizados seis parâmetros sequenciais para a definição do grupo de cada cepa, sendo eles: produção específica de células ($Y_{X/S}$), velocidade de consumo de substrato (VCS), nível de conversão de substrato (NCO), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$), produtividade (PROD) e produção específica de etanol ($Y_{P/S}$). Com a obtenção destes parâmetros foi possível a avaliação e classificação das leveduras dominantes isoladas em diferentes períodos de safra das unidades fermentativas. As leveduras isoladas também foram avaliadas quanto ao teor de nitrogênio e identificadas por Taxonomia Numérica.

Na Usina Alvorada as 26 cepas isoladas nas 11 coletas realizadas foram distribuídas em 12 grupos através da metodologia Capacidade Fermentativa, sendo os grupos I e II os de maior relevância por se apresentarem repetidamente no decorrer da safra. Em relação ao perfil de concentração de nitrogênio total os isolados apresentaram-se predominantemente com baixas porcentagens. Do total dos isolados, 10 puderam ser identificados como *Saccharomyces chevalieri* (*Saccharomyces cerevisiae*). Entre os 26 isolados, foram identificados 4 diferentes grupos. O grupo A se caracteriza por sua habilidade de assimilar a maltose e a melibiose. O grupo B se caracteriza pela habilidade assimilar a maltose e inabilidade de assimilar a melibiose. O grupo C se caracteriza pela inabilidade de assimilar tanto a maltose como a melibiose. O grupo D se caracteriza pela inabilidade de assimilar a maltose e habilidade de assimilar a melibiose.

Na Citrosuco Paulista - Unidade Matão foram um total de 10 isolados, em 5 coletas realizadas, classificados através da metodologia Capacidade Fermentativa em 8 diferentes grupos. Os isolados apresentaram-se predominantemente com baixas porcentagens de nitrogênio total. Através da taxonomia numérica foi possível identificar 7 isolados como *Saccharomyces chevalieri* (*Saccharomyces cerevisiae*). Os isolados foram identificados dentro dos grupos A, assimilação de maltose e melibiose e B, assimilação da maltose e não assimilação da melibiose.

SUMMARY

In fermentative processes for alcohol production is common the development of yeasts that are not the one which were selected as inoculum. These yeasts, when present, can show good fermentative qualities or not. Thus, the microbiological control in the alcoholic fermentation is important for the detection of the wild yeasts, together with the evaluation of its fermentative behavior and its identification. Through this procedure, it is possible to prevent and to detect problems related with the loss of industrial efficiency, that are very often due to the presence of wild yeasts that show low fermentative qualities. Still it is possible to identify, among the isolated yeasts, the one that presents fermentative qualities that are suitable to the process.

This work had the objective to study the population behavior of industrial fermentative processes that use different substrates (cane broth and orange broth) and that had as inoculum a strain of *Saccharomyces cerevisiae* (Y904) produced by Mauri of Brazil.

Samples of fermented wine of Usina Alvorada and Citrusuco Paulista – Site Matão were collected. The samples were spread on plates in differential medium for yeasts (WLN), for the isolation and counting of the dominant yeasts. The isolated yeasts were evaluated through the Fermentative Capacity methodology, where kinetic, yield and productivity characteristics are considered (ANDRIETTA et al., 1999). In this classification system, six different parameters are used for the definition of the group of each strain: specific cell production ($Y_{X/S}$), substrate consumption rate (VCS), substrate conversion (NCO), maximum specific growth rate (μ_{\max}), productivity (PROD) and specific ethanol production (YP/S). With these parameters it was possible to do the evaluation and classification of the dominant yeasts isolated in different periods of crop of the fermentative units. The isolated yeasts were also evaluated with respect to total nitrogen and were identified by Numerical Taxonomy.

In Usina Alvorada the 26 strain isolated in the 11 collections made were

distributed in 12 groups through the Fermentative Capacity methodology, where the groups I and II were the ones of larger relevance due to the fact of being present repeatedly during the crop. Concerning the concentration profile of total nitrogen, the isolated yeasts had show predominantly low percentages. From the total of the isolated yeasts, 10 could be identified as *Saccharomyces chevalieri* (*Saccharomyces cerevisiae*). Among the 26 isolated yeasts, 4 different groups were identified. The group A is characterized by its ability of assimilating the maltose and the melibiose. The group B is characterized by the ability to assimilate the maltose and inability of assimilating the melibiose. The group C is characterized by the inability of assimilating either the maltose or the meliobiose. The group D is characterized by the inability of assimilating the maltose and ability of assimilating the melibiose.

In Citrosuco Paulista - Site Matão, in 5 collections made, a total of 10 yeasts were isolated, and were classified through the Fermentative Capacity methodology in 8 different groups. The isolated yeasts had shown predominantly low percentages of total nitrogen. Through the numerical taxonomy it was possible to identify 7 isolated yeasts as *Saccharomyces chevalieri* (*Saccharomyces cerevisiae*). The isolated ones were identified as belonging to group A - maltose and melibiose assimilation, and B - assimilation of maltose and non assimilation of melibiose.

1 - INTRODUÇÃO

Em processos de fermentação alcoólica, é comum a utilização de cepas de levedura de panificação como inóculo. Nos últimos anos vem ocorrendo um aumento do número de unidades que estão utilizando cepas selecionadas na partida do processo.

Trabalhos recentes (BASSO *et al.*, 1993) mostram que a utilização de levedura de panificação ou mesmo cepas isoladas de outros processos fermentativos como inóculo, causam uma rápida substituição destes por leveduras habitantes naturais do caldo.

A presença de leveduras no processo fermentativo que não seja a levedura utilizada na partida da fermentação são consideradas contaminantes. A ocorrência dessas leveduras é comum na indústria alcooleira.

Algumas unidades industriais vem enfrentando problemas com a presença de leveduras contaminantes que, com grande competitividade dentro das condições existentes, passam a predominar sobre a população de células inicialmente selecionadas. O comportamento fermentativo destas leveduras tem despertado a atenção, visto que, suas ocorrências podem estar muitas vezes atreladas a redução de eficiência industrial. Contudo, deve-se destacar que algumas leveduras contaminantes podem apresentar um bom desempenho fermentativo no processo e serem selecionadas como inóculo na próxima safra.

A escolha do fermento é de fundamental importância frente aos problemas com leveduras contaminantes. A levedura escolhida para a partida do processo deve além de proporcionar altos rendimentos, possuir condições de persistir no processo, ou seja, não ser substituída por contaminantes. A indústria alcooleira, cada vez mais, vem dando importância ao fermento utilizado na partida de fermentação, contudo resente-se da falta de metodologias adequadas à

identificação rápida e precisa desse fermento.

É importante se avaliar entre as metodologias de identificação de cepas quais são aquelas que melhor poderiam contribuir para a prevenção e solução de problemas nas unidades fermentativas, bem como sua aplicabilidade no que se refere a custo\benefício.

Devido a importância deste tema, este trabalho tem como objetivo estudar o comportamento populacional de dois processos fermentativos industriais que utilizaram como inóculo uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* (Y904) produzida pela Mauri do Brasil.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - *Evolução dos processos de fermentação alcoólica*

A fermentação alcoólica é conhecida dos homens desde a mais remota antiguidade. No entanto, o homem antigo não conhecia a causa do fenômeno fermentativo, mas ele o conhecia nos seus principais efeitos. As primeiras idéias a respeito das causa desse fenômeno apareceram por volta dos séculos XIV e XV. A partir de 1857, em função dos notáveis trabalhos de Paster, foi aceito definitivamente que o etanol obtido durante a fermentação era produto do metabolismo da levedura (OLIVEIRA, 1960).

No Brasil, consta que a primeira destilaria de álcool anidro foi montada em Piracicaba por volta de 1930. O método de fermentação usado era, seguramente, o método clássico, ou seja, pelo uso de fermento desenvolvido a partir da multiplicação do fermento para cada batelada. Nessa época distinguia-se dois tipos de fermentação: aquela utilizada para produção de álcool nas usinas de açúcar e a desenvolvida nas destilarias de aguardente (LIMA, 1985).

Um grande avanço na produção industrial de etanol foi alcançado na década de 30, quando surgiu na França o processo Melle-Boinot. Este processo consiste em linhas gerais no reaproveitamento de leveduras no curso de uma fermentação (ALMEIDA, 1960). Segundo este autor este processo possui as seguintes vantagens: economia de açúcar devido a menor reprodução celular, elevado rendimento em etanol; eliminação de contaminantes pela centrifugação do vinho fermentado; fermentação menos contaminada devido ao tratamento do leite de levedura (tratamento ácido); e eliminação da necessidade de cultura pura no preparo do pé-de-cuba, prática exigida no processo clássico, diminuindo portanto a complexidade das operações na planta.

Segundo LIMA (1960), até o início dos anos 60 os processos de corte e de

utilização de pés-de-cuba individual (clássico) eram bastante utilizados na fermentação de melaço nas indústrias brasileiras. DREWS (1964) afirmava que estes processos após 1964 estava presente somente em destilarias de pequeno porte e estava sendo rapidamente substituído pelo processo Melle-Boinot (batelada alimentada com reciclo de células).

A utilização do processo Melle-Boinot nas plantas de produção de etanol brasileiras se generalizou no final da década de 60 e nos anos 70. Segundo ZARPELLON & ANDRIETTA (1992), todas as novas destilarias instaladas quando da criação do Programa Nacional do Alcool (1976), foram equipadas com este sistema. Estes mesmos autores afirmam que apesar deste processo datar da década de 30, é um sistema satisfatório quanto à operação e eficiência na conversão do açúcar em álcool.

Segundo FINGUERUT *et al.* (1992), apesar da fermentação contínua ser uma evolução natural do processo batelada-alimentada, não é um desenvolvimento recente. Estes mesmos autores citam a existência de instalações industriais na França na década de 30, operando com melaço de beterraba. BORZANI (1960), cita vários trabalhos sobre fermentação contínua sendo o mais antigo datado de 1939. No Brasil literatura traz trabalhos datados a partir de 1951, citado por ROUSSELET (1963).

BORZANI (1960) cita como vantagens dos processos fermentativos contínuos: maior produtividade; maior uniformidade do produto; e maior adaptabilidade ao controle automático.

Segundo ZARPELLON & ANDRIETTA (1992), o interesse pelo processo de fermentação alcoólica contínua no Brasil a partir da última década, se deu principalmente pela razão desses processos terem se tornado mais confiáveis e levarem a uma redução de custo de produção.

2.1.1. Processos Clássicos

Os processos de fermentação alcoólica convencionais foram amplamente utilizados pelas destilarias nacionais até o início dos anos 60 (DREWS, 1964). Neste processo, para cada fermentação um novo pé de cuba era produzido, sendo eliminado com o próprio vinho, após cada fermentação (LIMA, 1960). A fermentação é considerada concluída quando a dorna “morre”, ou seja, quando cessa a atividade biológica por falta de nutrientes ou por excesso de produto inibidor (etanol). Neste ponto o etanol é recuperado por destilação e o reator é preparado para uma nova batelada.

Conforme MAIORELLA *et al.* (1981) o processo clássico é lento, uma vez que o reator tem que ser limpo e preparado, o mosto e o pé de cuba carregado ao sistema.

2.1.2 - Processo Batelada Alimentada ou Melle-Boinot

Segundo DREWS (1964), o processo clássico de batelada foi sendo rapidamente substituído pelo processo Melle-Boinot em meados dos anos 60. O processo se baseia na reciclagem do fermento com auxílio de separadoras centrífugas e na alimentação contínua e crescente do substrato ao fermentador (sem purga até o volume máximo deste).

O processo inicia-se com a multiplicação do fermento utilizando mosto esterilizado, enchendo-se as dornas, as quais depois de fermentadas serão centrifugadas. Na centrifugação da dorna fermentada separa-se de um lado o vinho que será encaminhado para a destilaria, e de outro o leite de leveduras que será submetido a tratamento adequado. Neste processo grande parte das bactérias que habitam a fermentação são eliminadas no vinho, devido à densidade das bactérias ser menor que as da levedura. O leite de leveduras passa por tratamento ácido (pH entre 2,5 e 4,5) para eliminar grande parte da infecção bacteriana. Terminado o tratamento, o lêvedo é encaminhado para a dorna para novamente fermentar

(ALMEIDA, 1960).

2.1.3 - Processo Contínuo

Os sistemas contínuos compreendem uma retirada do fermentado associado a uma alimentação permanente de mosto no tanque de fermentação. O mosto fermentado segue para separadoras centrífugas. A fase pesada (creme de leveduras) é enviada à cuba de tratamento ácido e a fase leve (vinho de levedurado) é enviado para uma dorna volante ou tanque pulmão da destilaria, sendo posteriormente enviado para o conjunto de colunas de destilação. O leite de levedura tratado também é adicionado ao fermentador de forma contínua. Uma das grandes vantagens deste tipo de processo é a diminuição do efeito inibitório tanto do etanol como do substrato (açúcar).

Este processo tem apresentado uma maior produtividade, com um aumento que as vezes pode atingir 100% em relação a batelada alimentada (RODRIGUES *et al.*, 1992).

A alimentação desse sistema pode ser feita por melaço diluído, por caldo de cana ou por uma mistura destes. Em todos os casos é realizado um pré-tratamento com a finalidade de eliminar impurezas grosseiras, partículas coloidais e minimizar contaminantes microbianos.

O número total de dornas de fermentação e o volume relativo de cada uma delas tem sido objeto de estudo para diversos pesquisadores. GHOSE & TYAGI (1979) concluíram que na operação utilizando-se duas dornas iguais em série, o volume total de reatores é 58% menor que usando-se apenas um reator. Recentemente, em trabalho de simulação, ANDRIETTA (1994) concluiu que o sistema ótimo é constituído por quatro reatores de mistura perfeita ligados em série com 1,5; 1,9; 2,2; e 1,45 horas de tempo de residência.

2.2 - Os microrganismos nos processos de fermentação

2.2.1 - Flora do processo

Todo desenvolvimento de microrganismos indesejáveis à fermentação constitui-se em contaminação, fato comum nas usinas/destilarias devido principalmente à falta de assepsia durante o processo e à carga microbiana que acompanha a matéria-prima até a indústria (CABRINE & GALLO, 1999).

A fonte primária dos contaminantes na fermentação alcoólica da cana-de-açúcar é a própria matéria-prima. Esses contaminantes são habitantes naturais da planta, do solo, matéria orgânica em decomposição e dos microrganismos associados as pragas e moléstias da cultura (YOKOYA, 1991).

DUNCAN & COLMER (1964), citado por YOKOYA (1991), afirmam que o número de microrganismos presentes na planta varia muito, encontrando-se entre 10^4 a 10^8 bactérias e 10^3 a 10^4 fungos por grama de colmo.

Dentre os diversos grupos de microrganismos no caldo tratado e no melaço que compõe o mosto para a fermentação alcoólica, algumas espécies crescem e se proliferam, outras são mortas nas dornas, e finalmente algumas permanecem em estágio latente durante o processo de fermentação. O comportamento de cada uma das espécies vão depender da adaptabilidade desses organismos às condições ambientais do sistema (temperatura, pH, aeração e concentrações de açúcar, ácidos e álcool) e da competitividade com outros organismos presentes (YOKOYA, 1991).

Nos processos fermentativos, a ocorrência e multiplicação de microrganismos contaminantes, é função dos fatores que definem a qualidade da matéria-prima (climáticos, por exemplo) e dos que possibilitam alterações da mesma (operações preliminares e processuais). Suas consequências estendem-se, desde a perda de açúcares, formação de compostos tóxicos causadores de redução da viabilidade e

competitividade das células de levedura, até o comprometimento da qualidade do produto final, envolvendo todo o processo industrial (SOUZA *et al.*, 1993).

O microrganismo responsável pela fermentação é a levedura, entretanto nem todas que habitam o processo são desejáveis ao mesmo.

2.2.2 - Leveduras

Mais recentemente, algumas unidades industriais têm-se deparado com problemas atribuídos à presença de leveduras contaminantes que, com grande competitividade dentro das condições existentes, passam a predominar na população de células presente. Seus comportamentos fermentativos têm despertado a atenção em função do perigo potencial que podem significar pois, suas ocorrências têm sido, com frequência, atreladas a ocasiões em que se verificam reduções significativas da eficiência industrial (SOUZA *et al.*, 1993).

CABRINI & GALLO (1999) citam que algumas leveduras podem trazer sérios prejuízos ao processo fermentativo, como redução no rendimento, maior tempo de fermentação, problemas operacionais, etc. Contudo, algumas leveduras contaminantes podem, ao contrário dos efeitos prejudiciais citados anteriormente, apresentar bom desempenho fermentativo, podendo ser selecionadas para atuarem como as leveduras de processo numa safra posterior.

AMORIM *et al.* (1989), constataram problemas no processo fermentativo, decorrentes da contaminação pela levedura *Candida krusei*. Foi constatado que a levedura era proveniente da cana-de-açúcar. Nestas usinas foram constatados problemas com o fornecimento da matéria-prima sendo que por uma semana se trabalhou com cana deteriorada. Entretanto, em trabalho realizado por AMORIM *et al.* (1991), 3 leveduras contaminantes isoladas do mosto e do vinho de uma unidade industrial, não foram responsáveis pela redução do rendimento da fermentação alcoólica, sendo tal fato, comprovado através de ensaios fermentativos, comparando-se as leveduras contaminantes com uma levedura de

processo (CABRINE & GALLO, 1999).

ANDRIETTA *et al.* (1997), detectaram no processo fermentativo de uma unidade industrial cepas de levedura que possuíam características fermentativas totalmente desfavorável e com velocidade específica máxima de crescimento bem abaixo dos valores obtidos por cepas normalmente encontradas em processos de fermentação alcoólica em escala industrial. Estes autores constataram que apesar de sua baixa velocidade de crescimento e tolerância ao etanol, estas cepas puderam dominar o processo devido as condições favoráveis de operação, pois no início da safra trabalhou-se com baixa concentração de etanol em função da elevada fabricação de açúcar.

Trabalhos recentes (BASSO *et al.*, 1993) tem mostrado que quando se parte um processo fermentativo utilizando cepas de panificação ou mesmo cepas isoladas de outros processos fermentativos, estas são rapidamente eliminadas do mesmo sendo substituídas por leveduras habitantes naturais do caldo.

No período final de uma safra ao isolar a levedura do processo pode ocorrer que esta seja diferente daquela introduzida no início. No entanto, se ela tiver uma boa capacidade fermentativa, ela será considerada a mais adequada ao processo na próxima safra. Nesse caso, analisando os seus aspectos bioquímicos e microbiológicos pode-se avaliar suas peculiaridades que permitiram seu domínio sobre outras populações (RODRIGUES & ANDRIETTA, 1995).

2.3 - Metodologia para identificação de leveduras

2.3.1 - Meios Diferenciais

Os meios de cultivo possuem propriedades que vão inibir ou selecionar determinado tipo de levedura. Segundo CAMPBELL (1987), os meios mais utilizados para o isolamento de leveduras habitantes do processos são: (i) meios onde as leveduras selvagens crescem, ficando a levedura de processo inibida, sendo os mais utilizados, meios contendo cristal violeta, actidiona, fucsina e sulfito; e (ii) meios onde são adicionados ao meio fontes de carbono que apenas as leveduras selvagens são capazes de utilizar, como amido e xilose por exemplo.

LIN (1975), testou a eficiência de cinco meios diferenciais na detecção de leveduras selvagens de cervejaria. Estes meios diferenciais foram classificados em dois grupos. O grupo I, adequado para detecção de não-*Saccharomyces*, consiste em meios contendo actidiona e lisina. O grupo II, adequado para detecção de *Saccharomyces*, consiste em meios contendo cristal violeta, fucsina-sulfito e meios onde se tem uma mistura de cristal violeta e fucsina-sulfito. Dentro do grupo I o meio lisina detecta mais espécies de leveduras selvagens que o meio actidiona. No grupo II, o meio contendo uma mistura de cristal violeta e fucsina-sulfito é superior aos demais. Este mesmo autor cita que na detecção de leveduras selvagens nenhum meio diferencial pode ser usado sozinho com resultados satisfatórios. O uso de 2 ou mais meios diferenciais ou meio diferencial combinado com outros métodos irá garantir melhores resultados na detecção destas leveduras.

RODRIGUEZ (1987), sugere para identidade de leveduras selvagens quatro diferentes meios de cultivo sendo esses adicionado de lisina, actidiona e cloreto de sódio e o ultimo livre de pantotenato.

SPINA (1989), propõe para identificação de levedura selvagem em unidades produtoras de álcool a utilização de dois meios de cultivo a base de farinha de milho. Segundo este autor este meio favorece o crescimento de leveduras selvagens

inibindo o crescimento de *Saccharomyces*.

SOUZA *et al.* (1993), através de meio diferencial WLN, agrupou de acordo com semelhanças morfológicas, nove grupos (biotipos) distintos de cepas de levedura de amostras de caldo primário e mosto. Cada um destes grupos foi submetido a uma avaliação em meios de cultura seletivos. Foram empregados os seguintes meios de cultura: ágar-lisina, ágar-cristal violeta, ágar-mycosel, medium-candida, ágar-cloreto 2,3,5-trifeniltetrazólio, ágar-saboraud. Na avaliação dos nove biotipos nos diferentes meios, com exceção de um biotipo, os demais constituíram-se em leveduras selvagens não pertencentes ao gênero *Saccharomyces*.

2.3.2 - Taxonomia Clássica

A taxonomia clássica de leveduras tem sido largamente utilizada por pesquisadores para identificar esses microrganismos a nível de gênero e espécie. Esse tipo de classificação data do século XIX onde Hansen, em 1888, diferenciou as culturas de leveduras com base na morfologia celular e ascoporal e introduziu as seguintes características: crescimento em meio líquido, temperatura ótima de crescimento e habilidade em fermentar determinados açúcares (VAN DER WALT, 1987).

Com o passar dos anos, os taxonomistas estenderam a lista de Hansen incluindo outras características tais como: a presença ou ausência de estágios sexuais, a formação de pigmentos, a utilização de fontes de carbono, tolerância a alta concentração de glicose, liquefação de gelatina, crescimento a várias temperaturas, resistência a cicloheximida, estrutura da coenzima Q no sistema de elétrons (BARNET *et al.*, 1983).

2.3.3 - Taxonomia Numérica

GRIFFITHS (1981) propôs uma metodologia para classificação de leveduras baseado em uma bateria de 21 testes de características fisiológicas, como capacidade de fermentação e assimilação de açúcares, crescimento em altas temperaturas, crescimento em meios com alta pressão osmótica, assimilação de nitrato e presença de células alongadas. A partir dos resultados, obtém-se uma sequencia numérica de 7 dígitos que é comparado com uma base de dados que contém 429 cepas de referência. A partir disto é possível se classificar algumas leveduras até nível de espécie.

CABRINE & GALLO (1999), fizeram um levantamento da variedade de espécies de leveduras presentes em um processo de fermentação industrial para produção de álcool. A identificação das leveduras isoladas foi realizada por taxonomia numérica. Foram isoladas um total de 63 culturas de leveduras, das quais 55 puderam ser identificadas por esta metodologia. Dentre as 55 leveduras identificadas observou-se a presença de 5 gêneros, sendo o gênero *Saccharomyces* o de maior incidência e 19 espécies, sendo a espécie *Sacharomyces cerevisiae* a dominante na unidade industrial pesquisada.

2.3.4 - Métodos rápidos de identificação de leveduras

A indústria fornecedora de material e equipamento para uso em microbiologia têm se preocupado em desenvolver métodos rápidos para identificação de microrganismo, principalmente para os que são transmitidos por alimentos e que oferecem riscos ao consumidor. Esses métodos normalmente são constituídos de "kits" prontos onde todo as etapas são de fácil execução e a obtenção dos resultados é acelerada. Entre esses "kits" disponíveis no mercado existem alguns que identificam leveduras de uma forma mais rápida que os processos tradicionais.

Os "kits" para identificação de leveduras normalmente são baseados na assimilação de fontes de carbono. O resultado obtido é comparado com uma base

de dados fornecido pelo fabricante, que contem o perfil de grande parte das leveduras descritas.

A Biolog® desenvolveu um sistema baseado na assimilação e/ou na oxidação de 96 diferentes tipos de fontes de carbono para identificação de leveduras. Segundo o fornecedor esse sistema é capaz de identificar em 04 horas 267 espécies de leveduras.

A bioMerieux® também desenvolveu um sistema para identificação rápida de leveduras. Esse sistema é constituído de 32 testes que após 24 horas de incubação classifica as leveduras baseando-se na comparação dos resultados obtidos com os disponíveis em um banco de dados. KUHLE & JESPERSEN (1998) fizeram uso desse "kit" para identificação de leveduras isoladas de cervejaria. Os autores relatam que obtiveram sucesso na identificação de 124 diferentes isolados. Desses isolados 57% foram descritos como *Saccharomyces cerevisiae*.

2.3.5 - DNA - Fingerprinting

O material genético, isto é, o DNA tem sido utilizado como recurso para identificação de levedura.

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

A técnica da cariotipagem (DNA "fingerprint"), baseada na separação eletroforética do DNA cromossômico intacto (moléculas que se diferenciam tanto em número como em tamanho, contidas no núcleo da levedura e primordialmente relacionados com suas característica genéticas), tem se mostrado como uma excelente ferramenta na diferenciação de gêneros, espécies, bem como de diferentes

linhagens de uma mesma espécie.

TAVARES *et al.* (1992) distinguiu linhagens de leveduras utilizadas na fermentação alcoólica através de análises de DNA e eletroforese de proteínas, concluindo que os dois métodos complementam as técnicas convencionais que apenas permitem a distinção de espécies diferentes, abrindo a possibilidade de se distinguir variações de linhagens de mesma espécie no fermento.

Muito esforço tem sido feito no sentido de se obter linhagens de leveduras adequadas à fermentação alcoólica industrial, não apenas por procedimentos clássicos de melhoramento genético como também por abordagens mais sofisticadas como a técnica do DNA recombinante (PANCHAL & TAVARES, 1990), mas poucos são os relatos de seu emprego em escala industrial (BASSO *et al.*, 1993).

2.3.6 - Parâmetros baseados nas características fermentativas

As técnicas tradicionais de caracterização de cepas de leveduras tais como o isolamento em meios diferenciais (HARRIS & WATSON, 1968; LIN, 1975; SOUZA, 1993), taxonomia clássica (LODDER, 1970), taxonomia numérica (GRIFFITHS, 1981) até técnicas sofisticadas como a de separação eletroforética do DNA cromossômico (BASSO *et al.*, 1993), não são capazes de fornecer parâmetros que permitam a elaboração de um diagnóstico dos problemas ocorridos no processo (ANDRIETTA *et al.*, 1995).

Perdas de produtividade e de rendimento sem explicação de ordem operacional, despertou a atenção para um fator até então não considerado, a qualidade fermentativa das cepas de levedura presentes no processo (ANDRIETTA *et al.*, 1997).

ANDRIETTA *et al.*, (1995), através de parâmetros cinéticos e de produção avaliaram sete cepas isoladas de final de safra, verificando que as informações

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

RODRIGUES (1989), realizou testes como curvas de crescimento para determinação velocidade específica máxima de crescimento, tolerância ao etanol (JIMENEZ & VAN UDEN, 1985), e alguns parâmetros medidos usualmente em cepas atípicas isoladas do processo de fermentação alcoólica, concluindo que através destes testes não é possível classificar taxonomicamente as leveduras, porém é muito importante quando se quer analisar o comportamento dessas leveduras no processo (MALTO, 1997).

SOUZA *et al.* (1993) isolaram e caracterizaram, através de meios diferenciais, leveduras presentes em amostras de caldo de cana e mosto de uma unidade produtora de álcool que na época apresentava problemas relacionados à contaminação microbiológica. Neste trabalho, os autores estudaram os seguintes parâmetros dos isolados: taxa de crescimento, capacidade fermentativa, acidez sulfúrica, concentração alcoólica, concentração de redutores residuais, rendimento fermentativo e desempenho global. Neste mesmo trabalho, o comportamento das leveduras isoladas pertencentes ao gênero *Saccharomyces* apresentou desempenho global muito superior aos demais isolados. No entanto, este grupo possuía uma pequena participação populacional.

ANDRIETTA *et al.* (1999) desenvolveram um sistema de classificação de leveduras que leva em consideração as características cinéticas, de rendimento e produtividade das linhagens. Neste sistema de classificação são utilizados seis parâmetros seqüenciais para a definição do grupo de cada levedura isolada, sendo eles: produção específica de células, velocidade de consumo de substrato, nível de

conversão de substrato, velocidade específica máxima de crescimento, produtividade e produção específica de etanol. Para cada parâmetro foram definidos 3 faixas distintas de valores, sendo: alta (1), média (2), baixa (3). Os grupos foram definidos pela combinação dos 6 algarismos, sendo que cada um deles pode assumir valores de 1 a 3. Foram considerados isolados pertencentes ao mesmo grupo, aqueles que apresentaram a mesma seqüência.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Isolamento e Purificação

Foram coletadas amostras de vinho fermentado durante a safra 98/99 das Usinas Alvorada - Itumbiara e Citrosuco Paulista - Unidade Matão. No primeiro mês de safra da Usina Alvorada foram coletadas amostras semanais. As demais amostras foram coletadas mensalmente nas duas unidades fermentativas. As amostras foram coletadas em frascos limpos e esterilizados (15 minutos a 121°C), ocupando no máximo a metade da capacidade do mesmo para permitir uma perfeita homogeneização. Estas amostras foram refrigeradas e enviadas ao Laboratório da Divisão Processos e Biotecnologia do CPQBA/UNICAMP, onde foram plaqueadas.

3.1.1 - Meio de cultivo

Foi utilizado meio diferencial para leveduras (WLN -Difco 0424-01-7), visto que o uso deste meio permite separar morfologicamente as leveduras.

Foi adicionado ao meio esterilizado e resfriado ($\pm 50^{\circ}\text{C}$.) uma solução de antibiótico (ácido nalidíxico - 0,1g, HJ - 0,1g, água destilada - 10ml) para inibir o crescimento de bactérias. Foi utilizado 1ml de antibiótico para cada 100ml de meio.

Verteu-se 25 ml de meio, em placas de Petri previamente esterilizadas.

3.1.2 - Diluição da amostra

Foram esterilizados em autoclave (15 minutos a 121°C) 8 tubos de ensaio contendo 9,2 ml de água destilada. Com o auxílio de pipeta estéril (1 ou 2 ml) foi transferido 1 ml da amostra de vinho fermentado, previamente agitado, para um tubo contendo 9 ml de água estéril ($\pm 0,2$ ml de água evaporam na autoclavagem). Deste tubo, depois de agitado, foi transferido com outra pipeta estéril 1 ml para

outro tubo, e assim até o tubo 8. Desta forma a amostra foi diluída até nível de 10^{-8} .

3.1.3 - Plaqueamento

Com o auxílio de pipeta estéril foi transferido para as placas de WLN 0,1 ml das diluições 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} . Com alça de Drigalsky esterilizada (mergulhada em etanol absoluto e flambada), o inóculo foi espalhado sobre o meio de modo a ficar distribuído homogeneamente na placa. Esperou-se algum tempo para que o inóculo fosse absorvido pelo meio, inverteu-se a placa e incubou-se por 7 dias a $32^{\circ}\text{C} \pm 1$. No caso da Citrosuco as amostras foram plaqueadas a partir de 10^{-4} em função da baixa concentração de células neste processo.

3.1.4 - Contagem e caracterização morfológica

Após o período de incubação as placas foram observadas quanto a ocorrência de colônias morfológicamente diferentes. As colônias foram analisadas quanto a cor, tamanho, forma e textura.

O resultado foi expresso em unidade formadora de colônia por ml de amostra (UFC/ml). Este foi obtido multiplicando-se o número de colônias contadas por 10 (para que o resultado fosse expresso por ml, uma vez que foi plaqueado 0,1 ml) e pela diluição utilizada.

Representantes de cada tipo de colônia foram purificadas em PDA (Potato Dextrose Ágar) e incubadas a $32^{\circ}\text{C} \pm 1$ por 2 dias

As colônias purificadas foram transferidas para "slants" (ágar inclinado com meio PDA) e incubadas por 48 horas a $32^{\circ}\text{C} \pm 1$. Os slants foram conservados em óleo mineral estéril sobre refrigeração.

3.2 - Velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$)

A determinação deste parâmetro foi realizada através do acompanhamento do crescimento dos microrganismos em meio de cultivo contendo quantidades não limitantes de substrato e onde não estejam presentes fatores de inibição.

3.2.1 - Preparo do Inóculo

As culturas conservadas no óleo mineral foram transferidas para “slants” de P.D.A. e incubadas a 32°C por 24 horas. Após este período estes “slants” foram ressuspensos em água estéril .

3.2.2 - Meio de Cultivo

Foi utilizado meio com a seguinte composição em g/l: Glicose - 40; Fosfato Diácido de Potássio - 5; Cloreto de Amônio - 1,5; Sulfato de Magnésio heptaidratado - 1; Cloreto de Potássio - 1; Extrato de Levedo - 2.

3.2.3 - Condução do Ensaio

Foram preparados frascos Erlenmeyer de 250 ml, de acordo com o número de leveduras a serem testadas (em duplicata), contendo 100 ml de meio de cultivo e esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121°C. Foi preparado um frasco a mais para calibrar o espectrofotômetro. Os frascos foram inoculados com 10 ml de suspensão de leveduras. Imediatamente após a inoculação foram retiradas amostras de cada frasco para a leitura inicial ($t = 0$). Os frascos foram incubados em shaker a 32°C e 150 rpm. O acompanhamento do crescimento da levedura foi realizado através da determinação da densidade ótica a 600 nm em intervalos de tempo regulares. As três primeiras leituras foram feitas em intervalos de uma hora e as demais em intervalos de meia hora, até o final da fase exponencial, totalizando 7 horas de experimento. O ensaio foi conduzido em conjunto com uma cepa cujo $\mu_{m\acute{a}x}$ é conhecido. A Figura 01 representa o esquema geral para a condução do ensaio.

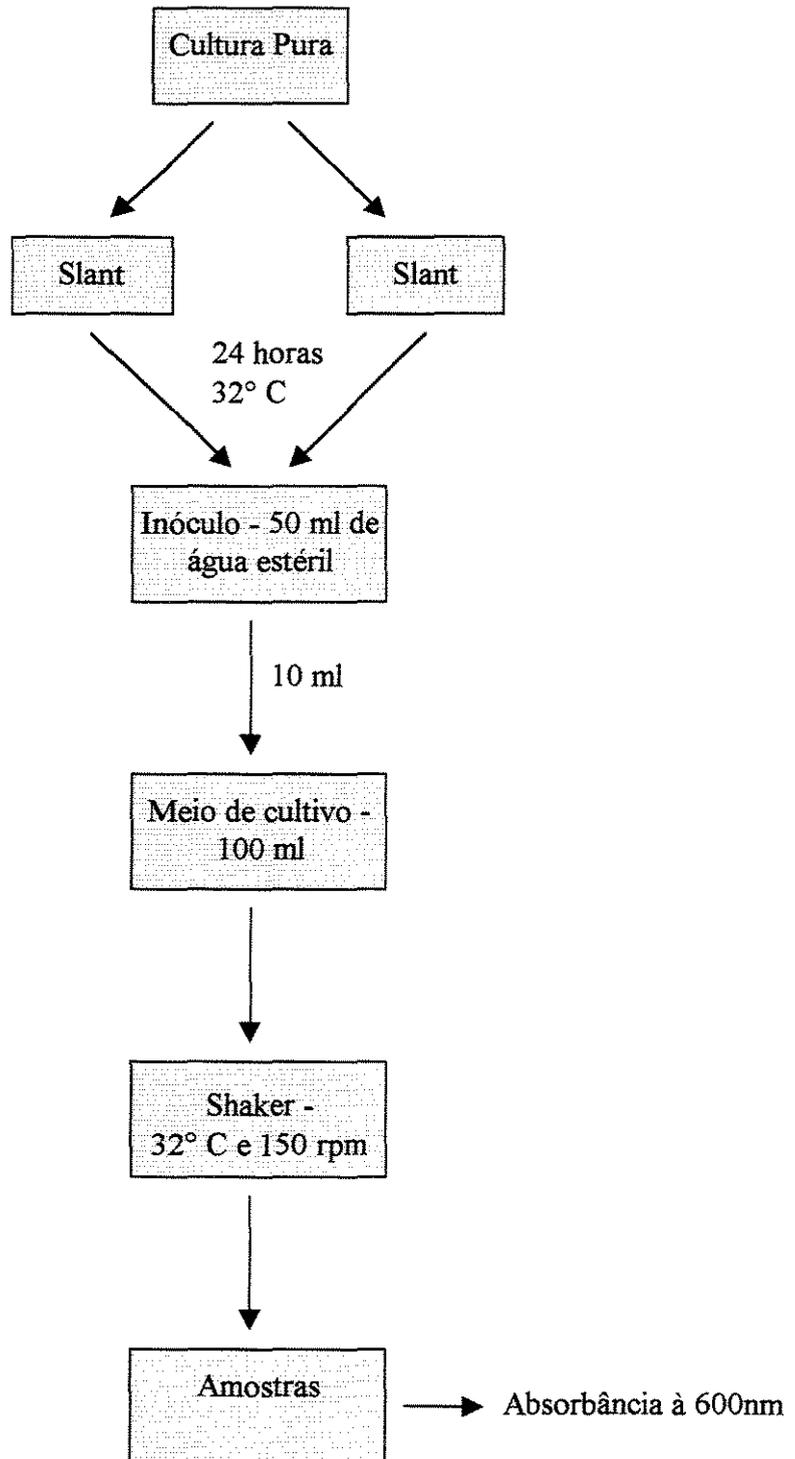


Figura 01: Esquema geral para condução do ensaio para obtenção de $\mu_{\text{máx}}$

3.2.4 - Cálculo de $\mu_{\text{máx}}$

O valor de $\mu_{\text{máx}}$ foi obtido através da curva de crescimento do microrganismo na fase exponencial descrito por RODRIGUES & ANDRIETTA, 1995.

A velocidade específica de crescimento do microrganismo (μ_x) é definida como:

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$$

Integrando-se a equação acima tem-se:

$$\int_0^t \mu_x dt = \int_{X_0}^X \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$$

A fase exponencial de crescimento é caracterizada por $\mu_x = \mu_{\text{máx}} = \text{cte}$, e assim a equação acima fica:

$$\mu_{\text{máx}} \cdot t = \ln \frac{X}{X_0}$$

A equação acima é similar a equação de uma reta onde o coeficiente angular é $\mu_{\text{máx}}$. Assim, com os dados da densidade ótica em função do tempo, obtidos durante o ensaio, plota-se:

$$\ln \frac{DO}{DO_0} = \mu_{\text{máx}} \cdot t$$

onde, DO é a densidade ótica no tempo t, e DO_0 é a densidade ótica correspondente a $t = 0$.

O $\mu_{\text{máx}}$ foi obtido calculando-se o coeficiente angular da parte linear da curva, que corresponde ao crescimento exponencial do microrganismo.

3.3 - Fermentação

3.3.1 - Preparo do Inóculo

As culturas conservadas no óleo mineral foram transferidas para “slants” de P.D.A. e incubadas a 32°C por 24 horas. Após este período estes “slants” foram ressuspensos em 40 ml de água estéril.

3.3.2 - Meio de Cultivo

Foi utilizado meio com a seguinte composição (g/l): Glicose - 150; Fosfato Diácido de Potássio - 5; Cloreto de Amônio - 1,5; Sulfato de Magnésio heptaidratado - 1; Cloreto de Potássio - 1; Extrato de Levedo - 6.

3.3.3 - Condução do Ensaio

Foram preparados frascos Erlenmeyer 250 ml de acordo com o número de leveduras a serem testadas (os testes foram realizados em triplicata) e ainda dois frascos a mais para a análise da concentração inicial de açúcar no mosto. Estes frascos foram fechados com rolhas de borracha, as quais possuem um orifício com algodão que permite a saída do gás carbônico produzido durante a fermentação, e então pesados em balança eletrônica (1). Foi transferido para cada erlenmeyer 100 ml de meio de cultivo, fechou-se com as respectivas rolhas de borracha, cobriu-se com papel alumínio e esterilizou-se em autoclave por 15 minutos a 121°C. Após esfriar, os frascos foram pesados novamente (2). Os frascos foram inoculados com 10 ml de suspensão de cada levedura selecionada. Pesou-se os frascos para determinar a quantidade de inóculo utilizado na fermentação (3). Os frascos foram incubados em shaker a 32°C e 150 rpm por 24 horas. Terminado o tempo de fermentação, os frascos foram pesados para se determinar a quantidade de gás carbônico produzido (4). As amostras de vinho fermentado foram utilizadas na determinação de: concentração de etanol, massa celular e açúcar. A Figura 02 mostra o esquema geral para a condução do ensaio.

Este teste foi conduzido em triplicata. Em função do número limitado de frascos no shaker como também do número de isolados nas amostras de vinho fermentado, as fermentações foram realizadas em 6 etapas (denominadas de: Fermentação 1, 2, 3, 4, 5, 6). Em cada uma das etapas as cepas foram testadas em conjunto com uma cepa padrão que apresenta características fermentativas previamente conhecidas e consideradas satisfatórias para o processo industrial. Com esse procedimento elimina-se as possíveis variações (agitação, temperatura, etc.) que podem ocorrer entre um ensaio e outro, uma vez que os parâmetros da cepa padrão são utilizados como base de cálculo, o que elimina as variações em cada fermentação.

obs:(1) - massa do frasco vazio = m_{frasco}

(2) - massa do frasco + meio esterilizado = $m_{\text{est.}}$

(3) - massa do frasco + meio esterilizado + inóculo = $m_{\text{inóc.}}$

(4) - massa do frasco + vinho fermentado = $m_{\text{ferm.}}$

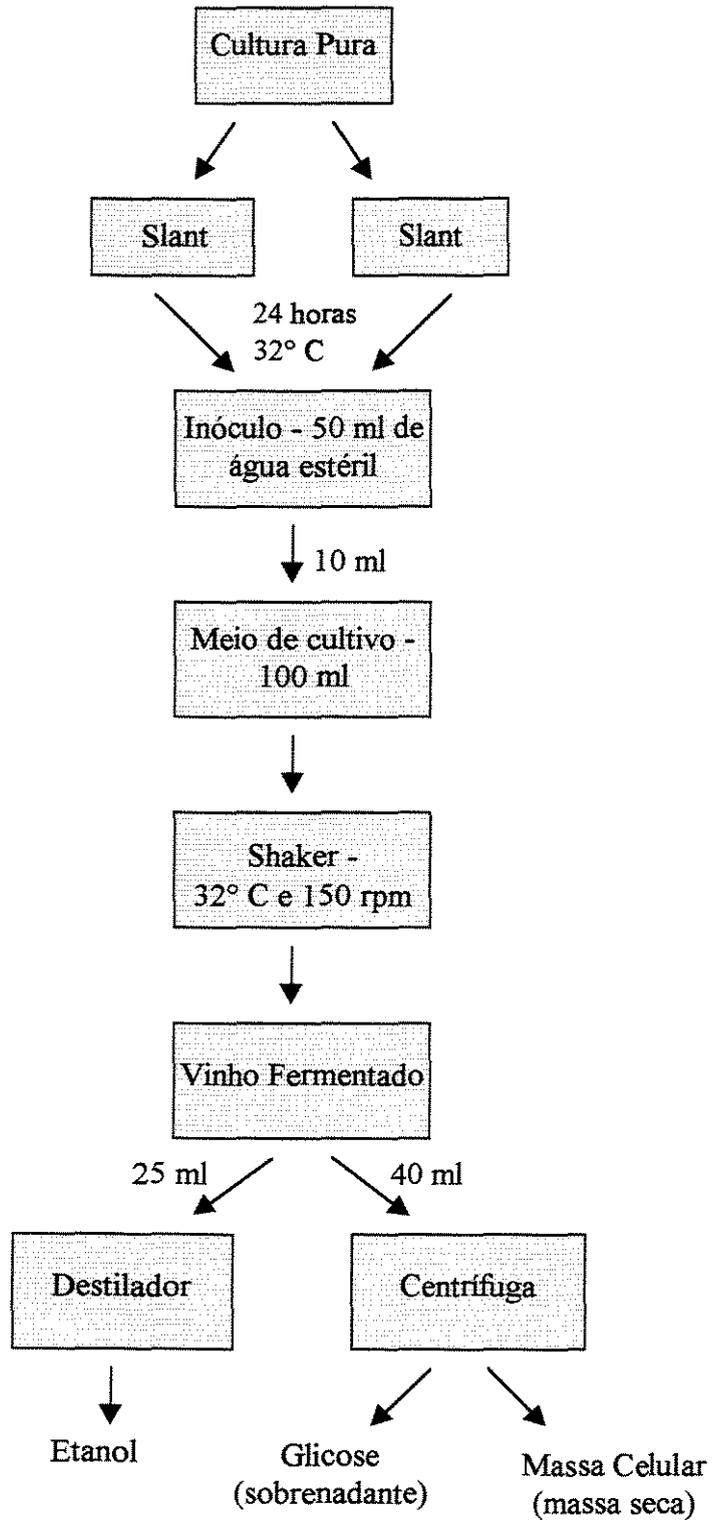


Figura 02: Esquema geral para condução do ensaio de fermentação

3.4 - Métodos analíticos

3.4.1 - Determinação da Massa Seca

Inóculo: Uma alíquota de 10 ml de inóculo foi transferida para placa previamente tarada e levou-se para estufa a 80°C até peso constante. O valor da massa seca foi obtido pela diferença do peso inicial da placa ($MS_{inóc.}$).

Vinho Fermentado: A determinação foi feita pela retirada de alíquotas de 40 ml de vinho fermentado que foi centrifugado a 4000 rpm por 5 minutos. O centrifugado foi lavado com água e recentrifugado por três vezes. Em seguida, foi transferido para uma placa previamente tarada e levado para estufa a 80°C até peso constante. O valor da massa seca foi obtido pela diferença do peso inicial da placa (MS_{vinho}).

3.4.2 - Determinação do Etanol Produzido

Foi utilizado método espectrofotométrico para determinação de teores alcoólicos em misturas hidroalcoólicas. O método (SALIK E POVH, 1993) se baseia na oxidação do etanol a ácido acético, através da reação com dicromato de potássio em meio ácido. A solução adquire uma tonalidade verde proporcional a concentração de álcool na amostra, possibilitando a leitura em espectrofotômetro. A quantificação do etanol é feita através da comparação com uma curva padrão construída com concentrações conhecidas de etanol.

3.4.2.1 - Destilação da Amostra

As amostras de vinho fermentado foram submetidas a uma destilação, em microdestilador, para evitar interferência de outras substâncias presentes no vinho. Para isto, destilou-se 25 ml do vinho fermentado, e recolheu-se 50 ml em balão volumétrico, garantindo assim que todo o etanol fosse destilado.

3.4.2.2 - *Preparo da Amostra*

As amostras destiladas foram diluídas na proporção de 1 ml da amostra para 25 ml de água destilada em balão volumétrico.

Foram transferidos 5 ml de cada amostra diluída para tubos de ensaio e acrescentou-se 2 ml de água destilada e 2 ml de reagente de cor.

Os tubos foram colocados em banho-maria a 60°C por 30 minutos. Em seguida resfriou-se os tubos até temperatura ambiente e realizou-se a leituras de suas absorvâncias em espectrofotômetro a 600 nm de comprimento de onda.

3.4.3 - Determinação da Glicose

A determinação foi feita por via enzimática utilizando glicose-oxidase (kit Laborlab) O método baseia-se na oxidação da glicose pela enzima glicose-oxidase e peroxidase. Nesta reação ocorre a redução de um reativo de cor (aminofenazona e fenol) com desenvolvimento de coloração rosa proporcional a concentração de açúcar na amostra. A concentração de glicose presente foi determinada através leitura de absorvância a 505 nm. A absorvância da amostra é comparada com uma curva padrão construída com concentrações conhecidas de glicose.

3.4.3.1 - *Preparo da Amostra*

Com o auxílio de uma pipeta automática transferiu-se 0,1 ml de vinho fermentado e centrifugado para tubos de ensaio. Adicionou-se 10 ml do reagente de cor e levou-se ao banho-maria por 10 minutos a 37°C. Em seguida resfriou-se os tubos até temperatura ambiente e realizou-se as leituras de absorvância em espectrofotômetro a 505 nm de comprimento de onda.

3.4.4 - Determinação de Quantidade de Nitrogênio

Utilizou-se o método Kjeldahl para determinação de nitrogênio total. Os ensaios foram conduzidos seguindo a metodologia utilizada por PULZATTO (2000).

No método Kjeldahl determina-se o nitrogênio contido na matéria orgânica, incluindo o nitrogênio protéico e outros compostos nitrogenados não protéicos, tais como aminas, amidas, lecitina, nitrilas, aminoácidos. Neste caso o resultado será dado como nitrogênio bruto (ou total).

3.4.4.1 - Princípio do Método

A metodologia para obtenção do teor de nitrogênio da amostra é conduzida em três etapas, sendo elas: digestão, destilação e titulação.

Na digestão, proteínas e compostos nitrogenados são decompostos na presença de H_2SO_4 concentrado a quente produzindo sulfato de amônio.

Na etapa de destilação, o sulfato de amônio em presença de solução de hidróxido de sódio libera NH_3 que é recebido em solução de ácido bórico.

A amônia na solução de ácido bórico é titulada com solução de H_2SO_4 com normalidade conhecida e assim determina-se o teor de nitrogênio na amostra.

3.4.4.2 - Condução da Análise

Pesou-se aproximadamente 0,2g da amostra de massa seca em papel alumínio e transferiu-se para balão volumétrico de 100ml. Preparou-se um branco com 0,2 ml de água destilada. Adicionou-se 10 ml de H_2SO_4 concentrado e levou-se para o aparelho de digestão (Hach Company, modelo 23130-20) a uma temperatura de 450°C.

3.4.4.3 - Procedimento para Destilação do Nitrogênio

A destilação foi feita em aparelho destilador TECNAL modelo TE036-E.

Seguindo-se instruções para utilização do aparelho, utilizou-se 25 ml de amostra digerida, 20 ml de NaOH 50% e recolheu-se cerca de 125 ml de destilado em erlenmeyer contendo 50ml de ácido bórico 2% com indicador misto (5 ml de solução de vermelho de metila 0,1% em etanol absoluto e 25 ml de verde de bromocresol 0,1 em etanol absoluto por litro de H₃BO₃ 2%).

3.4.4.4 - Titulação do Nitrogênio

O nitrogênio presente na amostra destilada na forma de (NH₄)₃BO₃, foi titulado com H₂SO₄ 0,1N.

3.4.4.5 - Cálculo do Percentual de Nitrogênio Total

A partir da equação abaixo, calculou-se o percentual de nitrogênio total (%N). das cepas isoladas.

$$\% N = \left[\frac{(\text{Vol. H}_2\text{SO}_4 - \text{Vol. H}_2\text{SO}_4(\text{branco})) \times 14,007 \times N(\text{H}_2\text{SO}_4) \times 10000}{25 \times \text{peso amostra (mg)}} \right]$$

3.5 - Capacidade Fermentativa

ANDRIETTA *et al.* (1999), desenvolveram um sistema de classificação de leveduras que leva em consideração as características cinéticas, de rendimento e produtividade das linhagens

Neste sistema de classificação são utilizados seis parâmetros sequenciais para a definição do grupo de cada cepa, sendo eles: produção específica de células ($Y_{X/S}$), velocidade de consumo de substrato (VCS), nível de conversão de substrato (NCO), velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}), produtividade (PROD) e produção específica de etanol ($Y_{P/S}$).

Cada parâmetro contempla 3 faixas distintas de valores, sendo: alta (1), média (2), baixa (3).. Estas faixas foram definidas de acordo com experiências adquiridas em trabalhos anteriores (ANDRIETTA *et al.*, 1995, ANDRIETTA *et al.*, 1997). A Tabela 01 apresenta as faixas de cada parâmetro estudado.

Tabela 01: Limites das faixas de variação dos níveis alto, médio e baixo dos parâmetros utilizados na classificação das cepas isoladas

| Número Parâmetro | Parâmetro | Nível Alto (1) | Nível Médio (2) | Nível Baixo (3) |
|------------------|--------------|----------------|-------------------|-----------------|
| Primeiro | $Y_{X/S}$ | Maior 0,044 | entre 0,044/0,041 | menor 0,041 |
| Segundo | VCS | Maior 5,7 | entre 5,7/5,2 | menor 5,2 |
| Terceiro | NCO | Maior 98,5 | entre 98,5/90 | menor 90 |
| Quarto | μ_{\max} | Maior 0,55 | entre 0,55/0,45 | menor 0,45 |
| Quinto | \emptyset | Maior 2,4 | entre 2,4/2,2 | menor 2,2 |
| Sexto | $Y_{P/S}$ | Maior 0,45 | entre 0,45/0,42 | menor 0,42 |

Os grupos são definidos pela combinação de 6 algarismos, sendo que cada um deles pode assumir valores de 1 a 3. Foram consideradas cepas pertencentes ao mesmo grupo, aquelas que apresentam a mesma sequência.

O procedimento para obtenção dos 6 algarismos foi: a) a partir dos testes realizados calculou-se os parâmetros produção específica de células ($Y_{X/S}$), velocidade de consumo de substrato (VCS), nível de conversão de substrato (NCO), velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}), produtividade (\emptyset) e produção específica de etanol ($Y_{P/S}$). Estes parâmetros tiveram seus valores corrigidos para uma base de cálculo única. A correção foi feita dividindo-se o resultado da cepa padrão pelo respectivo valor de referência (Tabela 02). O resultado obtido para a cepa isolada foi corrigido por este fator encontrado. b) os valores dos parâmetros de cada cepa foram utilizados para classificá-las de acordo com suas características, em grupos que agregam cepas de comportamento fermentativo similares.

Tabela 02: Valores de referência da base de cálculo dos parâmetros utilizados na classificação das cepas

| Parâmetro | Unidade | Valor de Referência |
|--|-----------------------|---------------------|
| Produção específica de células ($Y_{X/S}$) | g MS/g substrato | 0,04 |
| Velocidade de consumo de substrato (VCS) | g substrato/ l x h | 5,8 |
| Nível de conversão de substrato (NCO) | % | 99,5 |
| Velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) | l/h | 0,5 |
| Produtividade (\emptyset) | g etanol/ l x h | 2,5 |
| Produção específica de etanol ($Y_{P/S}$) | g etanol/ g substrato | 0,46 |

3.5.1 - Determinação da massa de etanol produzida (ETOH)

Foi determinado pela massa de vinho bruto multiplicado pela concentração de etanol.

$$ETOH = \frac{\text{massa vinho fermentado} \times \text{concentração de etanol no vinho} \times \text{densidade etanol}}{\text{densidade do vinho} \times 100}$$

onde:

$$ETOH = g$$

$$\text{massa de vinho fermentado (g)} = m_{\text{ferm.}} - m_{\text{frasco}}$$

$$\text{concentração de etanol no vinho} = \text{ml}/100\text{ml}$$

$$\text{densidade do etanol} = 0,79\text{g/ml}$$

$$\text{densidade do vinho} = \text{g/ml}$$

3.5.2 - Determinação da massa de glicose consumida (GLI)

Foi determinada pela diferença entre a glicose inicial no mosto e a final do vinho fermentado.

$$\text{glicose inicial} = \frac{\text{massa de mosto} \times \text{concentração de glicose no mosto}}{\text{densidade do mosto}}$$

$$\text{glicose final} = \frac{\text{massa vinho} \times \text{concentração de glicose no vinho}}{\text{densidade do vinho}}$$

$$GLI = \text{glicose inicial} - \text{glicose final}$$

onde:

$$GLI = g$$

$$\text{massa de mosto (g)} = m_{\text{est.}} - m_{\text{frasco}}$$

$$\text{concentração de glicose no mosto} = \text{g/ml}$$

$$\text{massa de vinho} = m_{\text{ferm.}} - m_{\text{frasco}}$$

$$\text{concentração de glicose no vinho} = \text{g/ml}$$

$$\text{densidade do mosto} = \text{g/ml}$$

$$\text{densidade do vinho} = \text{g/ml}$$

3.5.3 - Determinação da massa celular produzida (MX)

Foi determinada pela diferença entre a massa seca no vinho fermentado e a massa seca de inóculo.

$$MX = \left[\frac{\text{massa de vinho}}{\text{densidade do vinho}} \times MS_{\text{vinho}} \right] - \left[\frac{\text{massa de inóculo}}{\text{densidade do inóculo}} \times MS_{\text{inóc.}} \right]$$

onde:

$$MX = \text{g}$$

$$\text{massa de vinho} = m_{\text{ferm.}} - m_{\text{frasco}}$$

$$\text{densidade do vinho} = \text{g/ml}$$

$$MS_{\text{vinho}} = \text{g/ml}$$

$$\text{massa de inóculo} = m_{\text{inóc.}} - m_{\text{est.}}$$

$$\text{densidade do inóculo} = \text{g/ml}$$

$$MS_{\text{inóc.}} = \text{g/ml}$$

3.5.4 - Obtenção da produção específica de etanol ($Y_{p/s}$)

Foi determinada pela razão entre o etanol produzido e a glicose consumida.

$$Y_{p/s} = \frac{ETOH}{GLI}$$

onde: $Y_{p/s}$ = g de etanol/g de substrato

3.5.5 - Obtenção da produção específica de células ($Y_{x/s}$)

Foi determinada pela razão entre massa celular produzida e a glicose consumida.

$$Y_{x/s} = \frac{MX}{GLI}$$

onde: $Y_{x/s}$ = g MX/g de substrato

3.5.6 - Obtenção da produtividade (\emptyset)

Foi determinada pela razão entre a massa de etanol produzida por volume de meio em fermentação por unidade de tempo.

$$\emptyset = \frac{ETOH}{\text{volume de meio} \times \text{tempo de fermentação}}$$

onde:

$$\emptyset = \text{g de etanol/L} \times \text{h}$$

$$\text{volume de meio} = 100\text{ml} = 0,1\text{L}$$

$$\text{tempo de fermentação} = 24 \text{ horas}$$

3.5.7 - Obtenção da velocidade de consumo de substrato (VCS)

Foi determinada pela razão entre a massa de glicose consumida por volume de meio em fermentação por unidade de tempo.

$$VCS = \frac{GLI}{\text{volume de meio} \times \text{tempo de fermentação}}$$

onde:

$$VCS = \text{g de substrato/L} \times \text{h}$$

$$\text{volume de meio} = 100\text{ml} = 0,1\text{l}$$

$$\text{tempo de fermentação} = 24 \text{ horas}$$

3.5.8 - Determinação do Nível de conversão do substrato (NCO)

$$NCO = \frac{\text{glicose inicial} - \text{glicose final}}{\text{glicose inicial}} \times 100$$

onde:

$$NCO = \%$$

3.6 - Taxonomia Numérica

Os ensaios foram conduzidos segundo metodologia descrita por GRIFFITHS (1981), a qual baseia-se em testes bioquímicos de assimilação e fermentação de fontes de carbono, atribuindo-lhes valores dos quais são obtidos códigos numéricos de identificação. A partir desta metodologia este autor caracterizou 429 cepas conhecidas.

As cepas são caracterizadas utilizando vinte e um testes. Estes testes são separados em sete grupos. Cada uma destes grupos possuem 3 diferentes testes. Cada um destes testes corresponde a uma pontuação se positivo. Se negativo a pontuação é igual a 0. A partir dos testes realizados os pontos são somados para cada um dos sete grupos. Desta maneira, são obtidos 7 diferentes dígitos, que agrupados são comparados com os padrões descritos pelo autor.

A tabela 03 apresenta os testes realizados e sua respectiva pontuação.

Tabela 03: Testes realizados para obtenção dos códigos numéricos das espécies de leveduras para caracterização através de Taxonomia Numérica.

| | | | |
|----------|-----------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| DÍGITO 1 | Maltose Crescimento (4) | galactose crescimento (2) | lactose crescimento (1) |
| DÍGITO 2 | Nitrato Crescimento (4) | eritritol crescimento (2) | amido hidrólise (1) |
| DÍGITO 3 | Ribitol Crescimento (4) | crescimento em 37°C (2) | Crescimento glicose/NaCl (1) |
| DÍGITO 4 | Sacarose Fermentação (4) | galactose fermentação (2) | glicose fermentação (1) |
| DÍGITO 5 | Sacarose Crescimento (4) | inositol crescimento (2) | celobiose crescimento (1) |
| DÍGITO 6 | Rafinose Crescimento (4) | manitol crescimento (2) | Melibiose crescimento (1) |
| DÍGITO 7 | Lactose Fermentação (4) | xilose crescimento (2) | células alongadas (1) |

3.6.1 - Condução dos testes

3.6.1.1 - Inóculo

Os testes, com exceção da forma celular e hidrólise do amido, foram conduzidos com as leveduras crescidas em YEPD por 24 horas à 32° C.

Composição do meio YEPD (g/l): extrato de levedura - 10, peptona - 20, dextrose 20.

3.6.1.2 - Preparo dos açúcares para assimilação e fermentação

Todos os açúcares foram dissolvidos em uma solução basal em uma concentração final igual a 2%. No caso da rafinose foi utilizado uma concentração final de 4%. A inoculação foi feita com 0,1 ml da levedura crescida em YEPD. A solução foi distribuída em tubos de ensaio em um volume igual a 5 ml. Nos tubos referentes a fermentação tubos de Duran foram adicionados. Os teste de assimilação foram considerados positivos quando houve formação de biomassa. No caso da fermentação ocorre sempre desprendimento de CO₂, e conseqüentemente produção de gás. Assim, os tubos de Duran, que nada mais são que captadores de gás, indicaram se a levedura foi capaz de fermentar e conseqüentemente produzir gás na presença de um dado açúcar.

Solução basal para teste de açúcares (g/l): sulfato de amônio - 5, fosfato monobásico - 1, sulfato de magnésio - 0,5, açúcar a ser testado - 20 (no caso da rafinose - 40).

Açúcares a serem testados: *Assimilação*: maltose, galactose, lactose, eritritol, ribitol, sacarose, inositol, celobiose, rafinose, manitol, melibiose, xilose. *Fermentação*: glicose, galactose, lactose, sacarose.

Todos os açúcares foram esterilizados em autoclave por 3 minutos à 121°C. Foi preparado um tubo onde não foi adicionado o açúcar (branco). Esse

procedimento foi realizado para descartar um resultado de falso positivo. Todos os testes foram realizados em duplicata. As leituras (observações) foram feitas em 24, 48 e 72 horas.

3.6.1.3 - Assimilação de nitrato de potássio (KNO_3)

A inoculação foi feita com 0,1 ml da levedura crescida em YEPD. A solução basal foi colocada em tubos de ensaio em um volume igual a 5 ml. Este teste foi incubado a 32° C por 48 horas. Passado esse período de incubação foi colocado 3 gotas da solução A (N,N dimethyl-1-naphtyl-amine - 0,6g, ácido acético 5M - 100 ml) e 3 gotas da solução B (ácido sulfanílico - 0,8g, ácido acético 5M - 100 ml). O teste foi considerado positivo com a formação de uma coloração rósea a vermelho. No caso de reação negativa (meio não alterado) adicionou-se um pouco de pó de zinco ao meio. Se o nitrato não foi utilizado o zinco o reduzirá quimicamente formando uma cor vermelha.

Solução basal para nitrato (g/l): sulfato de amônio - 5, fosfato monobásico - 1, sulfato de magnésio - 0,5, nitrato de potássio - 1, agar - 1,7.

A solução basal foi esterilizada por 15 minutos em autoclave à 121°C.

3.6.1.4 - Crescimento em presença de alta concentração osmótica

A inoculação foi feita com 0,1 ml da levedura crescida em YEPD. A solução foi colocada em tubos de ensaio em um volume igual a 5 ml. O teste foi considerado positivo quando houve a formação de biomassa, indicando assim que a levedura foi capaz de crescer em concentração osmótica (sal e açúcar).

Crescimento em NaCl 10% (g/l): glicose - 20, peptona - 20, extrato de levedura - 10, cloreto de sódio - 100. Crescimento em glicose 50% (g/l): sulfato de amônio - 5, fosfato monobásico - 1, sulfato de magnésio - 0,5, glicose - 500. Esterilização: 3 minutos em autoclave à 121°C.

3.6.1.5 - Hidrólise do amido

Para inoculação deste teste, a levedura foi estriada no meio contendo amido e encubada por 24-48 horas a 32° C. A partir da cultura crescida, uma colônia foi transferida para outra placa contendo o mesmo meio. A placa foi incubada por 24-48 horas a 32° C. Após o crescimento da cultura adicionou-se uma gota de Lugol. A reação foi considerada positiva com a formação de uma halo ao redor da colônia.

Meio (g/l): amido - 20, extrato de levedura - 10, peptona - 10, agar - 15. Este meio depois de esterilizado em autoclave por 15 minutos à 121°C, foi distribuído em placas estéreis (cerca de 20/placa).

Lugol: iodeto de potássio - 2g, iodo metálico - 1g, água destilada - 300 ml.

3.6.1.6 - Crescimento a 37°C

O meio utilizado foi YEPD distribuído em tubos de ensaio em volume igual a 5 ml. A inoculação foi feita com 0,1 ml de levedura crescida em YEPD. O tubo inoculado foi incubado por 24-48 horas a 37° C. O teste foi considerado positivo com formação de biomassa.

Esterilização: 15 minutos em autoclave à 121°C.

3.6.1.7 - Forma celular

Foi utilizado meio de extrato de malte para este teste. O meio foi distribuído em tubos de ensaio em volume igual a 5 ml. A inoculação foi feita com 0,1 ml da levedura crescida em YEPD. O tubo inoculado foi incubado por 24 hora a 32° C. A forma celular foi observada em microscópio (400x) em lâmina úmida sem coloração. Teste positivo: presença de células alongadas.

Meio (g/l): extrato de malte - 6, maltose - 6, dextrose - 6, extrato de levedura - 1,2. Esterilização: 15 minutos em autoclave à 121°C.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Usina Alvorada

4.1.1 - Distribuição populacional das leveduras

A Tabela 04 mostra os valores de concentração e participação populacional das 26 cepas isoladas nas 11 coletas realizadas na Usina Alvorada., como também as características morfológicas de cada colônia. É importante ressaltar neste trabalho, que a palavra “cepa” não pretende identificar uma unidade taxonômica precisa, mas um grupo de leveduras com características morfológicas semelhantes. Assim, durante o trabalho, quando se faz referência as “cepas isoladas” ou mesmo “isolados”, trata-se dos biotipos inicialmente separados através das diferenças morfológicas.

Tabela 04: Participação Populacional (%) e Concentração (UFC/ml) das cepas (biotipos) isolados nas coletas realizadas na Usina Alvorada.

| Coleta | Biotipo | Concentração (UFC/ml) | Participação Populacional (%) | Características da colônia |
|--------|---------|-----------------------|-------------------------------|---|
| 1 | AL0198 | $1,4 \times 10^8$ | 99,80 | típica, centro escuro, borda branca e lisa |
| | AL0298 | $1,3 \times 10^6$ | 0,92 | pequena, centro escuro e grande, borda branca e lisa |
| 2 | AL0398 | $1,5 \times 10^8$ | 91,46 | grande, borda branca e lisa, centro escuro |
| | AL0498 | $1,4 \times 10^7$ | 8,54 | média, borda branca e lisa, centro branco e cremoso |
| 3 | AL0598 | $1,4 \times 10^8$ | 43,75 | grande, borda branca e lisa, centro escuro |
| | AL0698 | $1,8 \times 10^8$ | 56,25 | média, borda branca e lisa, centro branco e cremoso |
| 4 | AL0798 | $6,0 \times 10^8$ | 59,41 | grande, borda branca e lisa, centro escuro |
| | AL0898 | $4,0 \times 10^8$ | 39,06 | média, borda branca e lisa, centro verde escuro intenso |
| | AL0998 | $1,0 \times 10^7$ | 0,99 | média, rugosa e inteira branca |

| | | | | |
|----|--------|-------------------|-------|--|
| 5 | AL1098 | $3,1 \times 10^8$ | 62,00 | grande, borda branca e lisa, centro escuro |
| | AL1198 | $1,7 \times 10^8$ | 34,00 | média, borda branca e lisa, centro branco e cremoso |
| | AL1298 | $1,0 \times 10^7$ | 2,00 | pequena, finíssima borda branca e lisa, centro dominante e de coloração verde intenso |
| | AL1398 | $1,0 \times 10^7$ | 2,00 | média, rugosa, borda branca e fina, centro escuro |
| 6 | AL1498 | $1,6 \times 10^8$ | 55,17 | grande, borda branca e lisa, centro escuro |
| | AL1598 | $1,2 \times 10^8$ | 41,38 | média, borda branca e lisa, centro branco e cremoso |
| | AL1698 | $1,0 \times 10^7$ | 3,45 | pequena, finíssima borda branca e lisa, centro dominante e de coloração verde intenso |
| 7 | AL1798 | $1,6 \times 10^8$ | 50,00 | com centro com gradiente de cor verde |
| | AL1898 | $1,0 \times 10^8$ | 50,00 | verde escura com borda lisa, branca e fina |
| 8 | AL1998 | $1,2 \times 10^8$ | 92,31 | colônia típica |
| | AL2098 | $1,0 \times 10^7$ | 7,69 | irregular brilhante, com centro branco rodeado por verde escuro (vulcão) |
| 9 | AL2198 | $2,0 \times 10^8$ | 71,43 | colônia típica |
| | AL2298 | $8,0 \times 10^7$ | 28,47 | semelhante à típica, porém apresenta pontos brancos no centro |
| 10 | AL2398 | $4,0 \times 10^7$ | 7,41 | centro verde claro, com gradiente de cor |
| | AL2498 | $5,0 \times 10^8$ | 92,59 | centro dominante, de coloração verde escuro, com gradiente de cor, borda branca, fina e lisa |
| 11 | AL2598 | $2,0 \times 10^8$ | 95,45 | centro verde com gradiente de cor |
| | AL2698 | $1,0 \times 10^7$ | 4,55 | centro verde escuro, com "chantilly" em cima, centro predominante, borda fina e lisa |

Na primeira e segunda coletas observa-se a predominância de um único biotipo; uma vez que estes estavam presentes nas porcentagens de 99,80 e 91,46 na primeira e segunda coletas respectivamente. Na terceira coleta observa-se que a participação populacional de dois biotipos (43,75% e 56,25%) são praticamente equivalentes. Nas coletas 4, 5 e 6 observa-se a dominância de dois biotipos, sendo que os demais apresentam-se em concentrações consideradas inexpressivas. Na sétima coleta observa-se que a participação populacional de dois biotipos são iguais (50%). A partir da oitava coleta até o final da safra (11ª coleta) o mesmo comportamento observado nas primeiras duas coletas volta a ocorrer, isto é, a presença de apenas um biotipo dominante.

É importante observar que os biotipos que apresentaram baixa participação populacional não são menos importantes que as demais, pois suas concentrações são maiores ou iguais a 10^6 UFC/ml. Isto significa que havendo condições favoráveis estes podem dominar o processo. Esta situação pode representar cuidados para com o processo dependendo das qualidades fermentativas destes biotipos.

Quanto as características morfológicas da colônia, pode-se observar que isolados em coletas distintas apresentaram-se com a mesma morfologia. Este fato é um indício de se tratarem de cepas iguais, mas nada pode ser afirmado visto que pode acontecer de cepas diferentes apresentarem características morfológicas iguais.

4.1.2 - Características cinéticas das leveduras

Esses resultados correspondem a metodologia descrita no item 3.3. Os resultados apresentados nas Tabelas 05, 06, 07, 08, 09 e 10 são referentes a média dos três valores (triplicata) obtidos para cada cepa (biotipo).

Tabela 05: Resultados de: massa seca de inóculo (MS inóc.), massa seca produzida (MS prod.), etanol produzido (ET prod.), açúcar residual (GLI res.), CO₂ formado (CO₂) e glicose inicial no mosto (GLI in) para as cepas isoladas na Usina Alvorada (Fermentação 1).

| | Cepa | MS inóc. (g/ml) | MS prod. (g/ml) | ET prod. (°GL) | GLI res.(g/ml) | CO ₂ (g) | GLI in (g/ml) |
|---------------|--------|------------------------|--------------------|-------------------|-------------------|---------------------|------------------|
| Fermentação 1 | AL0198 | 9,2 x 10 ⁻⁴ | 0,0062 | 7,54 | 0 | 6,70 | |
| | AL0298 | 8,5 x 10 ⁻⁴ | 0,0062 | 7,44 | 0 | 6,70 | |
| | AL0398 | 9,7 x 10 ⁻⁴ | 0,0061 | 7,41 | 0,757 | 6,60 | 148,60 |
| | AL0498 | 8,9 x 10 ⁻⁴ | 0,0072 | 7,54 | 0 | 6,65 | |
| | Padrão | 9,1 x 10 ⁻⁴ | 0,0063 | 7,73 | 0 | 6,71 | |

Na Tabela 05 observa-se que todas as cepas consumiram toda a glicose presente no mosto (GLI res.= 0), com exceção da cepa AL0398, que apresentou em residual de 0,757 g/ml deste açúcar. O etanol produzido se apresenta praticamente na mesma faixa para as quatro cepas, sendo a AL0398 a que apresenta o menor valor (7,41°GL). A massa seca produzida é praticamente igual para todas as cepas com exceção da AL0498 que apresentou este parâmetro maior (0,0072 g/ml) em comparação as demais.

Tabela 06: Resultados de: massa seca de inóculo (MS inóc.), massa seca produzida (MS prod.), etanol produzido (ET prod.), açúcar residual (GLI res.), CO₂ formado (CO₂) e glicose inicial no mosto (GLI in) para as cepas isoladas na Usina Alvorada (Fermentação 2).

| | Cepa | MS inóc. (g/ml) | MS prod. (g/ml) | ET prod. (°GL) | GLI res.(g/ml) | CO ₂ (g) | GLI in (g/ml) |
|---------------|--------|------------------------|--------------------|-------------------|-------------------|---------------------|------------------|
| Fermentação 2 | AL0598 | 9,7 x 10 ⁻⁴ | 0,0060 | 7,56 | 0,511 | 6,63 | |
| | AL0698 | 7,9 x 10 ⁻⁴ | 0,0063 | 7,63 | 0 | 6,64 | |
| | AL0798 | 8,9 x 10 ⁻⁴ | 0,0070 | 7,64 | 0 | 6,61 | 152,70 |
| | AL0898 | 8,1 x 10 ⁻⁴ | 0,0061 | 7,60 | 0 | 6,68 | |
| | Padrão | 8,4 x 10 ⁻⁴ | 0,0062 | 7,73 | 0 | 6,67 | |

Na Tabela 06 observa-se que com exceção da cepa AL0598, que apresentou um residual de 0,511 g/ml de glicose no vinho fermentado, as demais cepas consumiram toda a glicose presente no mosto (GLI res.= 0). A produção de etanol foi menor para a cepa AL0598 (7,56°GL), sendo que para as demais, os valores para este parâmetros estão bem próximos. A massa seca produzida foi maior para a cepa AL0798, e para as demais os valores estão relativamente próximos.

Tabela 07: Resultados de: massa seca de inóculo (MS inóc.), massa seca produzida (MS prod.), etanol produzido (ET prod.), açúcar residual (GLI res.), CO₂ formado (CO₂) e glicose inicial no mosto (GLI in) para as cepas isoladas na Usina Alvorada (Fermentação 3).

| | Cepa | MS inóc. (g/ml) | MS prod. (g/ml) | ET prod. (°GL) | GLI res.(g/ml) | CO ₂ (g) | GLI in (g/ml) |
|---------------|--------|-------------------------|--------------------|-------------------|-------------------|---------------------|------------------|
| Fermentação 3 | AL0998 | 15,8 x 10 ⁻⁴ | 0,0069 | 7,38 | 0 | 6,80 | |
| | AL1098 | 7,1 x 10 ⁻⁴ | 0,0066 | 7,44 | 0 | 6,81 | |
| | AL1198 | 8,0 x 10 ⁻⁴ | 0,0071 | 7,55 | 0 | 6,79 | 149,90 |
| | AL1298 | 5,0 x 10 ⁻⁴ | 0,0047 | 5,39 | 38,17 | 4,57 | |
| | AL1398 | 14,6 x 10 ⁻⁴ | 0,0062 | 7,65 | 0 | 6,81 | |
| | Padrão | 7,3 x 10 ⁻⁴ | 0,0062 | 7,62 | 0 | 6,83 | |

Na Tabela 07 observa-se que todas as cepas deste consumiram toda a glicose presente no mosto, com exceção da AL1298 que apresentou um residual elevado (38,17 g/ml de glicose no vinho). Porém, observa-se que esta cepa apresenta valores inferiores para todos os parâmetros. Para as demais cepas, a produção de etanol e massa celular foram satisfatórios, com pouca variação entre os valores.

Tabela 08: Resultados de: massa seca de inóculo (MS inóc.), massa seca produzida (MS prod.), etanol produzido (ET prod.), açúcar residual (GLI res.), CO₂ formado (CO₂) e glicose inicial no mosto (GLI in) para as cepas isoladas na Usina Alvorada (Fermentação 4).

| | Cepa | MS inóc. (g/ml) | MS prod. (g/ml) | ET prod. (°GL) | GLI res. (g/ml) | CO ₂ (g) | GLI in (g/ml) |
|---------------|--------|-------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|---------------------|------------------|
| Fermentação 4 | AL1498 | 8,4 x 10 ⁻⁴ | 0,0065 | 7,63 | 0 | 6,59 | |
| | AL1598 | 10,0 x 10 ⁻⁴ | 0,0063 | 7,79 | 0,65 | 6,53 | |
| | AL1698 | 5,3 x 10 ⁻⁴ | 0,0048 | 4,91 | 47,54 | 4,04 | |
| | AL1798 | 8,0 x 10 ⁻⁴ | 0,0063 | 7,04 | 6,58 | 6,12 | 153,85 |
| | AL1898 | 6,9 x 10 ⁻⁴ | 0,0068 | 7,47 | 0 | 6,58 | |
| | AL1998 | 8,0 x 10 ⁻⁴ | 0,0074 | 7,65 | 0 | 6,61 | |
| | AL2098 | 8,5 x 10 ⁻⁴ | 0,0073 | 7,78 | 0 | 6,61 | |
| | Padrão | 9,6 x 10 ⁻⁴ | 0,0065 | 7,84 | 0 | 6,62 | |

Na Tabela 08 observa-se que entre as sete cepas testadas no bloco, três não consumiram toda glicose presente no mosto. Entre estas três, a cepa AL1698 é a que apresenta maior valor para a glicose residual no vinho (47,54 g/ml), sendo que por consequência, os demais parâmetros apresentam valores bem inferiores quando comparados com as outras cepas. A cepa AL1798 apesar de apresentar 6,58 g/ml de glicose no vinho, os demais parâmetros não ficam tão distantes das faixas observadas nas outras cepas do bloco. A cepa AL1598 apresenta uma glicose residual pouco expressiva. Prova disto é o não comprometimento dos outros parâmetros.

Tabela 09: Resultados de: massa seca de inóculo (MS inóc.), massa seca produzida (MS prod.), etanol produzido (ET prod.), açúcar residual (GLI res.), CO₂ formado (CO₂) e glicose inicial no mosto (GLI in) para as cepas isoladas na Usina Alvorada (Fermentação 5).

| Fermentação 5 | Cepa | MS inóc. (g/ml) | MS prod. (g/ml) | ET prod. (°GL) | GLI res.(g/ml) | CO ₂ (g) | GLI in (g/ml) |
|---------------|--------|-----------------------|--------------------|-------------------|-------------------|---------------------|------------------|
| | AL2198 | $7,2 \times 10^{-4}$ | 0,0059 | 5,81 | 0 | 5,05 | 153,25 |
| | AL2298 | $13,6 \times 10^{-4}$ | 0,0074 | 7,31 | 0 | 6,63 | |
| | AL2398 | $4,6 \times 10^{-4}$ | 0,0074 | 7,46 | 0 | 6,65 | |
| | AL2498 | $12,1 \times 10^{-4}$ | 0,0075 | 7,50 | 0 | 6,64 | |
| | Padrão | $14,0 \times 10^{-4}$ | 0,0066 | 7,51 | 0 | 6,65 | |

Na Tabela 09 observa-se que todas as cepas consumiram toda a glicose presente no mosto. A cepa AL2198 apresenta o etanol produzido bem inferior aos demais. O comportamento dos outros parâmetros desta cepa são todos inferiores quando comparados aos valores das demais cepas.

Tabela 10: Resultados de: massa seca de inóculo (MS inóc.), massa seca produzida (MS prod.), etanol produzido (ET prod.), açúcar residual (GLI res.), CO₂ formado (CO₂) e glicose inicial no mosto (GLI in) para as cepas isoladas na Usina Alvorada (Fermentação 6).

| Fermentação 6 | Cepa | MS inóc. (g/ml) | MS prod. (g/ml) | ET prod. (°GL) | GLI res.(g/ml) | CO ₂ (g) | GLI in (g/ml) |
|---------------|--------|-----------------------|--------------------|-------------------|-------------------|---------------------|------------------|
| | AL2598 | $8,9 \times 10^{-4}$ | 0,0072 | 7,54 | 0 | 6,64 | 154,95 |
| | AL2698 | $13,5 \times 10^{-4}$ | 0,0069 | 7,39 | 2,06 | 6,41 | |
| | Padrão | $10,6 \times 10^{-4}$ | 0,0065 | 7,51 | 0 | 6,65 | |

Na Tabela 10 observa-se que as duas últimas cepas isoladas apresentam bons resultados, sendo que a cepa AL2698 apresenta resultados um pouco inferiores e com um residual de glicose no vinho de 2,06 g/ml.

Analisando os resultados com um todo verifica-se que a maior parte das cepas isoladas do processo fermentativo da Usina Alvorada consumiram toda a glicose presente no mosto, com alta produção de etanol. Apenas 7 cepas não apresentaram esta capacidade (AL0398, AL0598, AL1298, AL1598, AL1698, AL1798, AL2698). Entre estas, 2 apresentaram uma produção de etanol bem inferior as demais (AL1298 e AL1698).

A cepa AL2198, embora tenha consumido toda a glicose, apresentou baixa produção de etanol quando comparado as demais. Visto que a massa seca produzida por esta cepa está relativamente próxima as obtidas pelas outras cepas, provavelmente parte da glicose consumida foi desviada para produção de outros produtos (ácidos, glicerol, álcoois superiores, etc), os quais não foram quantificados neste trabalho.

Os resultados apresentados na Tabela 11 são os valores corrigidos para a base de cálculo única, como descrito no item 3.5.

Tabela 11: Parâmetros cinéticos, rendimento e produtividade das cepas isoladas do processo fermentativo da Usina Alvorada onde: Yx/s - g MS/g substrato, VCS - g substrato/ L x h, NCO - %, Yp/s - g ET/ g substrato, \emptyset - g ET/ L x h, μ_{\max} - h^{-1} .

| Cepa | Yx/s | VCS | NCO | μ_{\max} | \emptyset | Yp/s |
|--------|--------|--------|-------|--------------|-------------|--------|
| AL0198 | 0,0394 | 5,8000 | 99,64 | 0,54 | 2,5156 | 0,4631 |
| AL0298 | 0,0398 | 5,8000 | 99,64 | 0,55 | 2,4822 | 0,4569 |
| AL0398 | 0,0389 | 5,7675 | 99,08 | 0,53 | 2,4703 | 0,4578 |
| AL0498 | 0,0461 | 5,8000 | 99,64 | 0,54 | 2,5156 | 0,4632 |
| AL0598 | 0,0384 | 5,7786 | 99,27 | 0,51 | 2,4455 | 0,4521 |
| AL0698 | 0,0407 | 5,8000 | 99,64 | 0,52 | 2,4698 | 0,4546 |
| AL0798 | 0,0450 | 5,8000 | 99,64 | 0,54 | 2,4719 | 0,4550 |
| AL0898 | 0,0392 | 5,8000 | 99,64 | 0,54 | 2,4590 | 0,4527 |
| AL0998 | 0,0351 | 5,8000 | 99,64 | 0,62 | 2,4221 | 0,4456 |
| AL1098 | 0,0422 | 5,8000 | 99,64 | 0,49 | 2,4156 | 0,4446 |
| AL1198 | 0,0453 | 5,8000 | 99,64 | 0,49 | 2,4524 | 0,4511 |
| AL1298 | 0,0432 | 4,1716 | 71,66 | 0,48 | 1,7203 | 0,4496 |
| AL1398 | 0,0395 | 5,8000 | 99,64 | 0,55 | 2,5227 | 0,4641 |
| AL1498 | 0,0400 | 5,8000 | 99,64 | 0,48 | 2,4613 | 0,4527 |
| AL1598 | 0,0387 | 5,7730 | 99,18 | 0,49 | 2,5122 | 0,4642 |
| AL1698 | 0,0462 | 3,8213 | 65,65 | 0,45 | 1,5507 | 0,4436 |
| AL1798 | 0,0405 | 5,5260 | 94,94 | 0,50 | 2,2645 | 0,4395 |
| AL1898 | 0,0416 | 5,8000 | 99,64 | 0,49 | 2,4097 | 0,4433 |
| AL1998 | 0,0453 | 5,8000 | 99,64 | 0,49 | 2,4689 | 0,4542 |
| AL2098 | 0,0448 | 5,8000 | 99,64 | 0,49 | 2,5097 | 0,4619 |
| AL2198 | 0,0456 | 4,6577 | 80,01 | 0,53 | 1,9125 | 0,4447 |
| AL2298 | 0,0452 | 5,8000 | 99,64 | 0,49 | 2,4345 | 0,4480 |
| AL2398 | 0,0460 | 5,8000 | 99,64 | 0,47 | 2,4833 | 0,4571 |
| AL2498 | 0,0457 | 5,8000 | 99,64 | 0,49 | 2,5366 | 0,4668 |
| AL2598 | 0,0445 | 5,8000 | 99,64 | 0,54 | 2,5100 | 0,4619 |
| AL2698 | 0,0432 | 5,7140 | 98,16 | 0,58 | 2,4590 | 0,4599 |

Os dados da Tabela 11 mostram que a maioria das cepas isoladas do processo fermentativo da Usina Alvorada apresentam nível alto para produção específica de etanol (Y_p/s). Apenas 9 cepas apresentam nível médio para este parâmetro.

Analisando os resultados para produção específica de células (Y_x/s) verifica-se que nas primeiras coletas as cepas isoladas apresentaram baixo nível para este parâmetro. Já no final da safra, essas apresentam valores elevados para o mesmo. Isto pode ser devido ao maior volume de levedura sangrando do processo para secagem após o segundo mês de operação.

A velocidade de consumo de substrato (VCS) é alta para a maioria das cepas isoladas, com exceção das cepas AL1298, AL1698 e AL2198 que apresentaram nível baixo para este parâmetro e da cepa AL1798 que apresentou nível médio.

O nível de conversão do substrato (NCO), com exceção das cepas AL1298, AL1698, AL1798, AL1898 e AL2198, apresentaram níveis altos.

A produtividade (\emptyset) apresentou nível alto para a maior parte das cepas, com exceção das cepas AL0598, AL0998, AL1098, AL1798, AL2298 que apresentaram nível médio e das cepas AL1298, AL1698 e AL2198 que apresentaram nível baixo para este parâmetro.

A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) apresentou nível médio para a maioria das cepas, com exceção das cepas AL0298, AL0998, AL1398 e AL2698 que apresentaram alto nível e da cepa AL1698 baixo nível para este parâmetro.

As cepas AL1298, AL1698 que apresentam, de forma geral, resultados não satisfatórios, representaram uma pequena participação populacional, mas em concentração significativa. Isto mostra que o processo fermentativo apresentou condições favoráveis para o desenvolvimento destas cepas, representando perigo para a produção, em casos onde houvesse problemas de condução do processo.

4.1.3 - Classificação das cepas segundo ANDRIETTA *et al.*, 1999.

A Tabela 12 apresenta, para cada uma das cepas isoladas durante a safra, os grupos em que cada uma foi classificada, assim como o código de identificação. Da mesma forma que no item 4.1.1, é importante destacar que a palavra “cepa” está sendo utilizada no sentido de identificar grupos de leveduras com desempenho equivalente, e não uma unidade taxonômica precisa.

Tabela 12: Código de classificação das cepas de leveduras isoladas do processo fermentativo da Usina Alvorada.

| Grupo | Código | Cepas |
|-------|-------------|--|
| I | 3.1.1.2.1.1 | AL0198, AL0398, AL0698, AL0898, AL1498, AL1598 |
| II | 1.1.1.2.1.1 | AL0498, AL0798, AL1198, AL1998, AL2098, AL2398, AL2498, AL2598 |
| III | 3.1.1.1.1.1 | AL0298, AL1398 |
| IV | 2.1.1.2.2.2 | AL1098, AL1898 |
| V | 1.3.3.2.3.2 | AL2198 |
| VI | 3.2.2.2.2.2 | AL1798 |
| VII | 1.1.1.2.2.2 | AL2298 |
| VIII | 3.1.1.2.2.1 | AL0598 |
| IX | 2.1.2.1.1.1 | AL2698 |
| X | 1.3.3.3.3.2 | AL1698 |
| XI | 2.3.3.2.3.2 | AL1298 |
| XII | 3.1.1.1.2.2 | AL0998 |

Analisando a Tabela 12, observa-se que as leveduras pertencentes aos grupo I (3.1.1.2.1.1), AL0198, AL0398, AL0698, AL0898, AL1498, AL1598, dominaram na primeira (99,08%), segunda (91,46%), terceira (56,25%) e sexta (96,55%) coletas. As leveduras pertencentes ao grupo II (1.1.1.2.1.1), AL0498, AL0798, AL1198, AL1998, AL2098, AL2398, AL2498, AL2598, dominaram na quarta (59,41%), oitava (92,31%), décima (92,59%), décima primeira coletas (95,45%)

As leveduras pertencentes ao grupo IV (2.1.1.2.2.2), AL1098 e AL1898, dominaram na quinta (62,00%) e sétima coletas (50,00%). O grupo V (1.3.3.2.3.2), AL2198, dominou na nona coleta (71,43%). O grupo VI (3.2.2.2.2.2), AL1798, dominou na sétima coleta (50,00%).

Os outros grupos, VII (1.1.1.2.2.2), VIII (3.1.1.2.2.1), IX (2.1.2.1.1.1), X (1.3.3.3.3.2), XI (2.3.3.2.3.2), XII (3.1.1.1.2.2), apareceram uma única vez no decorrer da safra e em concentrações inferiores àquelas apresentadas pelas cepas dominantes.

Os grupos I e II apresentam relativa importância em relação aos demais, visto que estes grupos foram observados no decorrer da safra em concentrações significativas.

Os grupos IV, V e VI apesar de apresentarem cepas que dominaram o processo, representam menor importância, pois não aparecem repetidamente no decorrer da safra. Porém encontraram condições favoráveis e se instalaram no processo.

4.1.4 - Concentração de nitrogênio das leveduras

As cepas (biotipos) isoladas foram separadas em grupos de alto, médio e baixo teores de nitrogênio. A Tabela 13 mostra as faixas de nitrogênio que cada grupo abrange. Estas faixas foram determinadas através da média do nitrogênio total da cepa padrão e seu desvio padrão ($8,40 \pm 0,06$)%. A partir do intervalo desta média e seus limites inferior e superior definiu-se as faixas dos grupos de baixo, médio e alto teor de nitrogênio.

Tabela 13: Limites das faixas de variação correspondentes aos níveis baixo, médio e alto para a quantidade de nitrogênio.

| Grupo | Nitrogênio (%) |
|-------|-----------------|
| Baixa | menor 8,34 |
| Média | entre 8,34/8,46 |
| Alta | maior 8,46 |

A Tabela 14 apresenta a média dos resultados encontrados para nitrogênio total das cepas isoladas (feita em duplicata), os grupos em que as mesmas foram classificadas e o percentual de cada grupo em relação ao total de isolados.

Tabela 14: Nitrogênio total (média) das cepas isoladas do processo fermentativo da Usina Alvorada.

| Grupo | Cepas | Nitrogênio Total (%) | % em relação ao total de isolados |
|--------|--------|----------------------|-----------------------------------|
| Alta | AL0198 | 9,60 | 23,08 |
| | AL0298 | 9,48 | |
| | AL1398 | 8,61 | |
| | AL1598 | 8,68 | |
| | AL1798 | 8,59 | |
| | AL2698 | 8,59 | |
| Média | AL0398 | 8,38 | 7,69 |
| | AL2198 | 8,46 | |
| Baixa | AL0498 | 7,61 | 69,23 |
| | AL0598 | 7,74 | |
| | AL0698 | 7,86 | |
| | AL0798 | 7,71 | |
| | AL0898 | 8,00 | |
| | AL0998 | 8,03 | |
| | AL1098 | 8,24 | |
| | AL1198 | 7,80 | |
| | AL1298 | 6,43 | |
| | AL1498 | 7,67 | |
| | AL1698 | 6,57 | |
| | AL1898 | 7,59 | |
| | AL1998 | 7,64 | |
| | AL2098 | 7,60 | |
| | AL2298 | 7,91 | |
| AL2398 | 7,82 | | |
| AL2498 | 7,83 | | |
| AL2598 | 7,83 | | |

O objetivo desta análise seria de relacionar a quantidade de nitrogênio com os resultados obtidos para os 6 parâmetros estudados, $Y_{x/s}$, VCS, NCO, μ_{\max} , \emptyset , $Y_{p/s}$, ou seja, verificar se há alguma relação entre as faixas baixo, médio e alto nitrogênio com os níveis baixo, médio e alto dos parâmetros estudados. Porém pela Tabela 15 observa-se que as cepas classificadas dentro de uma mesma faixa de nitrogênio, podem apresentar os três níveis (baixo, médio e alto) para os parâmetros estudados ($Y_{x/s}$, VSC, NCO, μ_{\max} , \emptyset , $Y_{p/s}$). Dentro do grupo de baixo teor de nitrogênio foram observadas cepas pertencentes aos grupos I (311211), II (111211), IV (211222), VII (111222), VIII (311221), X (133332), XI (233232), XII (311122); no médio os grupos III (311111), V (133232), e no alto os grupos I (311211), III (311111), VI (322222) e IX (212111).

Dentro das 26 cepas isoladas, 18 apresentaram baixo teor de nitrogênio, 2 teores médios e 6 altos. Quando se compara os resultados de massa produzida (Tabela 11) com nível de nitrogênio (Tabela 14) nota-se que todas as cepas que apresentaram alta produção de massa seca possuem também baixos teores de nitrogênio.

4.1.5 - Taxonomia numérica das leveduras

Na Tabela 15 encontram-se a sequência dos sete dígitos encontrados para as cepas utilizando Taxonomia Numérica. A sequência numérica obtida para cada uma das cepas foi comparada com a proposta por GRIFFITHS (1981), para se obter a classificação do gênero e espécie da levedura isolada. As respostas, positivas ou negativas, para cada teste são apresentadas na Tabela 16.

Tabela 15: Sequência numérica e classificação das cepas isoladas através da metodologia taxonomia numérica.

| Cepa | Sequência numérica | Classificação |
|--------|--------------------|--------------------------------------|
| AL0198 | 6037450 | não obtida |
| AL0298 | 6037440 | <i>S. chevalieri (S. cerevisiae)</i> |
| AL0398 | 6037450 | não obtida |
| AL0498 | 6037440 | <i>S. chevalieri (S. cerevisiae)</i> |
| AL0598 | 6037450 | não obtida |
| AL0698 | 6037450 | não obtida |
| AL0798 | 6037450 | não obtida |
| AL0898 | 6037450 | não obtida |
| AL0998 | 6037450 | não obtida |
| AL1098 | 2037440 | não obtida |
| AL1198 | 6037440 | <i>S. chevalieri (S. cerevisiae)</i> |
| AL1298 | 6037440 | <i>S. chevalieri (S. cerevisiae)</i> |
| AL1398 | 6037440 | <i>S. chevalieri (S. cerevisiae)</i> |
| AL1498 | 6037450 | não obtida |
| AL1598 | 2037440 | não obtida |
| AL1698 | 6037440 | <i>S. chevalieri (S. cerevisiae)</i> |
| AL1798 | 2037450 | não obtida |
| AL1898 | 6037450 | não obtida |
| AL1998 | 6037440 | <i>S. chevalieri (S. cerevisiae)</i> |
| AL2098 | 6037450 | não obtida |
| AL2198 | 6037440 | <i>S. chevalieri (S. cerevisiae)</i> |
| AL2298 | 6037440 | <i>S. chevalieri (S. cerevisiae)</i> |
| AL2398 | 6037440 | <i>S. chevalieri (S. cerevisiae)</i> |
| AL2498 | 6037440 | <i>S. chevalieri (S. cerevisiae)</i> |
| AL2598 | 6037450 | não obtida |
| AL2698 | 6037440 | <i>S. chevalieri (S. cerevisiae)</i> |

Pelos resultados apresentados na Tabela 15, verifica-se que de um total de 26 isolados da Usina Alvorada, apenas 10 puderam ser identificados por Taxonomia Numérica, correspondendo a 38,5%. Estes 10 isolados foram identificados como *Saccharomyces chevalieri* (*Saccharomyces cerevisiae*). A indicação entre parênteses corresponde à atualização das espécies segundo BARNETT *et al.* (1986) e KREGER-VAN RIJ (1984). Estes autores utilizam *Saccharomyces chevalieri* como sinônimo de *Saccharomyces cerevisiae*. Observando a diferença entre esses dois gêneros no trabalho de GRIFFITHS (1981), observa-se que a única variação encontrada é a ocorrência de célula alongada para a espécie *cerevisiae*.

A sequência numérica, (6037450), obtida para os isolados AL0198, AL0398, AL0598, AL0698, AL0798, AL0898, AL0998, AL1498, AL1898, AL2098, AL2598, não confere com nenhuma sequência numérica apresentada por GRIFFITHS (1981). A não classificação das cepas é função do teste de assimilação da melibiose (dígito 6). Este teste, se negativo, permite a obtenção de uma sequência numérica que identifica o isolado como *Saccharomyces chevalieri*. Porém este teste se apresentou positivo, o que significa que os isolados foram capazes de assimilar a melibiose. Assim, a sequência numérica obtida para estes isolados impossibilita a identificação através da metodologia utilizada.

Problema similar foi detectado com os isolados AL1098, AL1398, AL1598, AL1698, AL1798. A sequência numérica obtida para estes isolados foi 2037440. Observa-se que a diferença está no primeiro dígito da sequência, mais especificamente no teste de assimilação de maltose. Este teste, se positivo, a sequência numérica 6037440 é obtida, possibilitando a identificação do isolado como *Saccharomyces chevalieri*. Porém este teste apresentou resultado negativo, o que significa que os isolados não assimilam a maltose. Desta forma, a sequência numérica obtida para estes isolados não coincide com nenhuma sequência apresentado por GRIFFITHS (1981).

Tabela 16: Resultado obtido para os testes realizados com cada cepa.

| Cepa | Fonte de carbono | Malt. Ass. | Gal. Ass. | Lact. Ass. | Nitr. Ass. | Ery. Ass. | Am. Hid. | Rib. Ass. | 37° C | GI/NaCl | Sac. Fer. | Gal. Fer. | Gl. Fer. | Sac. Ass. | Ino. Ass. | Cel. Ass. | Raf. Ass. | Man. Ass. | Mel. Ass. | Lact. Fer. | Xil. Ass. | Cel. Along |
|--------|------------------|------------|-----------|------------|------------|-----------|----------|-----------|-------|---------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|------------|
| AL0198 | | + | + | . | . | . | . | . | + | +/- | + | + | + | + | . | . | + | . | + | . | . | . |
| AL0298 | | + | + | . | . | . | . | . | + | +/- | + | + | + | + | . | . | + | . | . | . | . | . |
| AL0398 | | + | + | . | . | . | . | . | + | +/- | + | + | + | + | . | . | + | . | + | . | . | . |
| AL0498 | | + | + | . | . | . | . | . | + | +/- | + | + | + | + | . | . | + | . | . | . | . | . |
| AL0598 | | + | + | . | . | . | . | . | + | +/- | + | + | + | + | . | . | + | . | + | . | . | . |
| AL0698 | | + | + | . | . | . | . | . | + | +/- | + | + | + | + | . | . | + | . | + | . | . | . |
| AL0798 | | + | + | . | . | . | . | . | + | +/- | + | + | + | + | . | . | + | . | + | . | . | . |
| AL0898 | | + | + | . | . | . | . | . | + | +/- | + | + | + | + | . | . | + | . | + | . | . | . |
| AL0998 | | + | + | . | . | . | . | . | + | +/- | + | + | + | + | . | . | + | . | + | . | . | . |
| AL1098 | | - | + | . | . | . | . | . | + | ++ | + | + | + | + | . | . | + | . | . | . | . | . |
| AL1198 | | + | + | . | . | . | . | . | + | ++ | + | + | + | + | . | . | + | . | . | . | . | . |
| AL1298 | | + | + | . | . | . | . | . | + | +/- | + | + | + | + | . | . | + | . | . | . | . | . |
| AL1398 | | + | + | . | . | . | . | . | + | ++ | + | + | + | + | . | . | + | . | . | . | . | . |
| AL1498 | | + | + | . | . | . | . | . | + | ++ | + | + | + | + | . | . | + | . | + | . | . | . |
| AL1598 | | - | + | . | . | . | . | . | + | ++ | + | + | + | + | . | . | + | . | . | . | . | . |
| AL1698 | | + | + | . | . | . | . | . | + | +/- | + | + | + | + | . | . | + | . | . | . | . | . |
| AL1798 | | - | + | . | . | . | . | . | + | ++ | + | + | + | + | . | . | + | . | + | . | . | . |
| AL1898 | | + | + | . | . | . | . | . | + | ++ | + | + | + | + | . | . | + | . | + | . | . | . |
| AL1998 | | + | + | . | . | . | . | . | + | ++ | + | + | + | + | . | . | + | . | . | . | . | . |
| AL2098 | | + | + | . | . | . | . | . | + | ++ | + | + | + | + | . | . | + | . | + | . | . | . |
| AL2198 | | + | + | . | . | . | . | . | + | ++ | + | + | + | + | . | . | + | . | . | . | . | . |
| AL2298 | | + | + | . | . | . | . | . | + | ++ | + | + | + | + | . | . | + | . | . | . | . | . |
| AL2398 | | + | + | . | . | . | . | . | + | ++ | + | + | + | + | . | . | + | . | . | . | . | . |
| AL2498 | | + | + | . | . | . | . | . | + | ++ | + | + | + | + | . | . | + | . | . | . | . | . |
| AL2598 | | + | + | . | . | . | . | . | + | ++ | + | + | + | + | . | . | + | . | + | . | . | . |
| AL2698 | | + | + | . | . | . | . | . | + | +/- | + | + | + | + | . | . | + | . | . | . | . | . |

Analisando os resultados apresentados na Tabela 16, verifica-se que entre os 26 isolados, foram identificados 4 diferentes grupos. A Tabela 17 apresenta estes grupos e as cepas classificadas em cada um deles. Verifica-se que a diferença entre os quatro grupos está na resposta dos testes de assimilação de maltose e melibiose. As respostas dos demais testes são idênticas para os quatro grupos.

Tabela 17: Classificação das cepas nos grupos A, B, C, D obtidos através dos testes de taxonomia numérica.

| Grupo | Característica do grupo | | Isolados | % em relação ao total de isolados |
|-------|-------------------------|-----------|--|-----------------------------------|
| | Maltose | Melibiose | | |
| A | + | + | AL0198, AL0398, AL0598, AL0698, AL0798, AL0898, AL0998, AL1498, AL1898, AL2098, AL2598 | 42,31 |
| B | + | - | AL0298, AL0498, AL1198, AL1298, AL1398, AL1698, AL1998, AL2198, AL2298, AL2398, AL2498, AL2698 | 46,15 |
| C | - | - | AL1098, AL1598 | 7,69 |
| D | - | + | AL1798 | 3,85 |

Pela Tabela 17 observa-se que os grupos A (11 isolados) e B (12 isolados) apresentam características que englobam a grande maioria dos isolados. O grupo C e o grupo D representam poucos isolados, 2 e 1 respectivamente. Observa-se de uma forma geral que dentro dos quatro grupos a maltose acaba sendo determinante, ou seja, o número de cepas que assimilam a maltose (88,46%) é bem maior que do que as que não assimilam (11,54%).

Embora o teste de taxonomia numérica seja uma ferramenta de grande valia paea o estudo de identificação de leveduras de processo, o mesmo não utiliza a possibilidade de assimilação variavel para os açúcares testados. Barnett (1992) considera pertencentes a espécie *cerevisiae* linhagens que assimilam ou não a maltose e a melibiose. Como são estes dois açúcares que apresentaram problemas para a classificação dos isolados pode-se assumir baseado no descrito por aquele autor que todos os isolados são pertencentes a espécie *cerevisiae*.

Assim como nesse trabalho, KUHLE & JESPERSEN (1998) encontram linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de cervejaria que não assimilam a maltose.

4.2 – Citrosuco Paulista – Unidade Matão

4.2.1 - Resultados referentes a participação populacional

A Tabela 18 mostra os valores de concentração e participação populacional das 10 cepas isoladas nas 5 coletas realizadas na Citrosuco Paulista. como também as características morfológicas de cada colônia. Ressalta-se que as mesmas observações feitas no item 4.1.1, quanto a utilização da palavra “cepa”, devem ser consideradas aqui.

Tabela 18: Participação Populacional (%) e Concentração (UFC/ml) dos biotipos isolados nas coletas realizadas na Citrosuco Paulista – Unidade Matão.

| Número da Coleta | Biotipo | Concentração (UFC/ml) | Participação Populacional (%) | Características da colônia |
|------------------|---------|-----------------------|-------------------------------|--|
| 1 | CT0198 | $7,0 \times 10^7$ | 100,00 | Grande, borda branca e lisa, centro escuro com gradiente de coloração |
| | CT0298 | $1,4 \times 10^7$ | 73,68 | Grande com centro escuro e denso, borda branca, lisa espessa e com raios verdes |
| 2 | CT0398 | $2,0 \times 10^6$ | 10,53 | grande, com centro verde e pequeno, borda branca, lisa, espessa e sem raios verdes |
| | CT0498 | $3,0 \times 10^6$ | 15,79 | Média, borda parcialmente lisa e branca, grande centro verde com gradiente de coloração, não apresenta características de rugosa |
| 3 | CT0598 | $4,0 \times 10^4$ | 40,00 | borda lisa, centro verde escuro com gradiente de coloração |
| | CT0698 | $3,0 \times 10^4$ | 30,00 | Borda lisa, centro verde escuro rodeado por verde claro |
| | CT0798 | $3,0 \times 10^4$ | 30,00 | Borda lisa, centro verde escuro e pequeno, rodeado por verde bem claro |
| 4 | CT0898 | $1,0 \times 10^7$ | 50,00 | Branca, com centro pequeno e verde claro |
| | CT0998 | $1,0 \times 10^7$ | 50,00 | Colônia verde intenso, borda fina e branca |
| 5 | CT1098 | $1,0 \times 10^7$ | 100,00 | centro verde claro, com gradiente de cor, centro predominante |

Pelos dados da Tabela 18, observou-se na primeira coleta a presença de apenas um biotipo (100,00%). Na segunda coleta observou-se a presença de três, sendo que um biotipo (CT0298) destacou-se apresentando participação populacional de 73,68%. Na terceira coleta os três biotipos presentes apresentaram participação populacional bem próximas, sendo duas delas iguais. A quarta coleta apresenta dois biotipos com a mesma participação (50%). A última coleta apresenta um único biotipo (100,00%). Na última coleta observa-se o mesmo comportamento da primeira coleta, isto é, um único biotipo presente.

Da mesma forma que na Usina Alvorada, os biotipos que apresentaram baixa participação populacional não são menos importantes que as demais, pois suas concentrações são maiores ou iguais a 10^6 UFC/ml. Estes biotipos encontrando condições favoráveis para dominar o processo, e apresentando características desfavoráveis quanto a performance fermentativa, podem representar em perigo para o processo.

Quanto as características morfológicas das colônias, pode-se observar pela descrição das colônias (Tabela 18) que os isolados apresentam grande diversidade na morfologia. Isto pode ser um indício de se tratar de cepas diferentes, porém da mesma forma que na Usina Alvorada, nada pode ser afirmado visto que pode acontecer da mesma cepa apresentar características morfológicas diferentes.

4.2.2 - Características cinéticas das leveduras

Os ensaios de fermentação foram realizados em triplicata. Os resultados apresentados na Tabela 19 são referentes a média dos valores obtidos das três repetições realizadas para cada cepa (biotipo).

Tabela 19: Resultados das análises de massa seca de inóculo (MS inóc.), massa seca produzida (MS prod.), etanol produzido (ET prod.), açúcar residual (GLI res.) e CO₂ formado (CO₂) para as cepas isoladas na Citrosuco Paulista - Unidade Matão.

| Cepa | MS inóc. (g/ml) | MS prod. (g/ml) | ET prod. (°GL) | GLI res. (g/ml) | CO ₂ (g) | GLI in (g/ml) |
|--------|-------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|---------------------|------------------|
| CT0198 | 9,3 x 10 ⁻⁴ | 0,0059 | 8,21 | 0 | 6,70 | |
| CT0298 | 14,5 x 10 ⁻⁴ | 0,0068 | 8,25 | 0 | 6,56 | |
| CT0398 | 8,8 x 10 ⁻⁴ | 0,0062 | 7,56 | 9,95 | 5,90 | |
| CT0498 | 8,9 x 10 ⁻⁴ | 0,0060 | 5,99 | 31,87 | 4,53 | |
| CT0598 | 9,0 x 10 ⁻⁴ | 0,0068 | 8,27 | 0 | 6,61 | |
| CT0698 | 8,6 x 10 ⁻⁴ | 0,0066 | 8,37 | 0 | 6,61 | 161,76 |
| CT0798 | 8,4 x 10 ⁻⁴ | 0,0067 | 7,99 | 0 | 6,61 | |
| CT0898 | 8,4 x 10 ⁻⁴ | 0,0066 | 8,19 | 1,27 | 6,37 | |
| CT0998 | 8,1 x 10 ⁻⁴ | 0,0069 | 8,54 | 0 | 6,61 | |
| CT1098 | 8,5 x 10 ⁻⁴ | 0,0065 | 8,12 | 0 | 6,5 | |
| Padrão | 14,4 x 10 ⁻⁴ | 0,0061 | 8,51 | 0 | 6,68 | |

Os dados da Tabela 19 mostram que a maior parte das cepas isoladas do processo fermentativo da Citrosuco Paulista - Unidade Matão consumiram toda a glicose presente no mosto, com alta produção de etanol. Apenas três cepas não consumiram toda a glicose, sendo a cepa CT0498 a que apresenta maior residual de glicose no vinho (31,87 g/ml). Esta mesma cepa é a que apresenta menor valor para o etanol produzido (5,99°GL). O segundo menor valor de etanol produzido é o da cepa CT0398 (7,56°GL), que também não consumiu toda a glicose presente no mosto. (GLI res. = 9,95 g/ml). Embora a cepa CT0898 também tenha apresentado açúcar no final da fermentação uma concentração de álcool adequada foi observada.

Da mesma forma que na Usina Alvorada, os testes foram realizados em conjunto com uma cepa padrão que possui os parâmetros estudados definidos. A cepa padrão é a mesma utilizada nos ensaios da Usina Alvorada. Neste caso foi possível testar todas as cepas em apenas um ensaio. Da mesma forma como

mencionado anteriormente (Usina Alvorada), os resultados da cepa padrão foram utilizados para transformar os resultados obtidos, para as cepas isoladas, em uma base única. Assim, calculou-se para a cepa padrão (Tabela 19) os parâmetros $Y_{x/s}$, VCS, NCO, PROD, $Y_{p/s}$ da mesma forma como citado no item 3.5. Os resultados apresentados na Tabela 20 são os valores corrigidos para a base única.

Tabela 20: Parâmetros cinéticos, rendimento e produtividade das cepas isoladas do processo fermentativo da Citrosuco Paulista - Unidade Matão onde: $Y_{x/s}$ - g MS/g substrato, VCS - g substrato/ L x h, NCO - %, $Y_{p/s}$ - g ET/ g substrato, \emptyset - g ET/ L x h, μ_{\max} - h^{-1} .

| Cepa | $Y_{x/s}$ | VCS | NCO | μ_{\max} | \emptyset | $Y_{p/s}$ |
|--------|-----------|--------|-------|--------------|-------------|-----------|
| CT0198 | 0,0382 | 6,3608 | 99,64 | 0,56 | 2,7323 | 0,4431 |
| CT0298 | 0,0416 | 6,3609 | 99,64 | 0,47 | 2,7418 | 0,4466 |
| CT0398 | 0,0448 | 5,9292 | 92,88 | 0,46 | 2,4835 | 0,4399 |
| CT0498 | 0,0518 | 4,5355 | 77,81 | 0,53 | 1,7347 | 0,4164 |
| CT0598 | 0,0459 | 6,3609 | 99,64 | 0,51 | 2,7483 | 0,4477 |
| CT0698 | 0,0444 | 6,3609 | 99,64 | 0,43 | 2,7787 | 0,4528 |
| CT0798 | 0,0451 | 6,3609 | 99,64 | 0,40 | 2,6179 | 0,4263 |
| CT0898 | 0,0451 | 6,3059 | 98,78 | 0,43 | 2,7140 | 0,4480 |
| CT0998 | 0,0471 | 6,3609 | 99,64 | 0,43 | 2,8377 | 0,4620 |
| CT1098 | 0,0435 | 6,3609 | 99,64 | 0,45 | 2,6968 | 0,4395 |

Observa-se pela Tabela 20 que apenas uma cepa, CT0998, isolada do processo fermentativo da Citrosuco Paulista - Unidade Matão, apresentou nível alto para produção específica de etanol. As demais cepas apresentaram nível médio para este parâmetro. Estes resultados diferem daqueles obtidos para as cepas isoladas da unidade fermentativa da Usina Alvorada, mostrando que a matéria prima utilizada na fermentação interfere diretamente na população de cepas no processo.

Os resultados obtidos para $Y_{x/s}$ mostram que as cepas com alta produção específica de células predominaram no processo. Esta fato provavelmente é devido a

grande perda de fermento pela centrifuga observada no processo. Esta perda esta relacionada a grande quantidade de polpa presente no meio fermentativo que acaba por prejudicar o desempenho das centrífugas.

Com exceção da cepa CT0498, as demais cepas apresentaram alta velocidade de consumo de substrato (VCS).

Analisando os resultados para o nível de conversão do substrato (NCO), com exceção das cepas CT0398 e CT0498, as demais cepas apresentam nível alto para este parâmetro.

A produtividade (\emptyset) foi alta para todas as cepas, com exceção da CT0498.

4.2.3 - Classificação das leveduras segundo ANDRIETTA *et al.*, 1999

A Tabela 21 apresenta, para cada uma das cepas isoladas durante a safra, os grupos em que cada uma foi classificada, assim como o código de identificação. Da mesma forma que no item 4.1.3, a palavra “cepa” está sendo utilizada no sentido de identificar grupos de leveduras com desempenho equivalente, e não uma unidade taxonômica precisa.

Tabela 21: Código de classificação das cepas de leveduras isoladas do processo fermentativo da Usina Citrosuco.

| Grupo | Código | Cepas |
|-------|--------------|----------------|
| V | 1.3.3.2.3.2 | CT0498 |
| XIII | 3.1.1.1.1.2 | CT0198 |
| XIV | 2.1.1.2.1.2. | CT0298, CT1098 |
| XV | 1.1.2.2.1.2 | CT0398 |
| XVI | 1.1.1.2.1.2 | CT0598 |
| XVII | 2.1.1.3.1.2 | CT0698 |
| XVIII | 1.1.1.3.1.2 | CT0798, CT0898 |
| XIX | 1.1.1.3.1.1 | CT0998 |

Na Tabela 21 observa-se que a levedura pertencente ao grupo XIII (3.1.1.1.1.2), CT0198, foi observada apenas na primeira coleta (100,00%). As leveduras pertencentes ao grupo XIV (2.1.1.2.1.2), CT0298 e CT1098 dominaram na segunda (73,68%) e quinta coletas (100,00%). Os grupos XVI (1.1.1.2.1.2), CT0598; XVIII (1.1.1.3.1.2), CT0798 e CT0898; XIX (1.1.1.3.1.1), CT0998; dominaram respectivamente a terceira e quarta coletas. O grupo XIV é o de maior relevância por ser o grupo dominante na segunda coleta e se repetir na última com 100,00% de participação populacional. O grupo XVIII também apresenta relativa importância, pois ele é observado na terceira e quarta coletas, sendo que nesta última ele passa a ser dominante.

4.2.4 - Concentração de nitrogênio das leveduras

Os grupos foram definidos da mesma forma descrita no item 4.1.5. Desta forma, as cepas (biotipos) foram separadas em grupos de acordo com a percentagem de nitrogênio encontrada, ou seja, baixo, médio e alto teor de nitrogênio, cujos intervalos foram definidos conforme item 4.1.4 e apresentados na Tabela 13.

A Tabela 22 apresenta a média dos resultados encontrados para nitrogênio total das cepas isoladas (feita em duplicata), os grupos em que as mesmas foram classificadas e o percentual de cada grupo em relação ao total de isolados.

Tabela 22 - Nitrogênio total (média) das cepas isoladas do processo fermentativo da Usina Citrosuco.

| Grupo | Cepas | Nitrogênio Total (%) | % em relação ao total de isolados |
|-------|--------|----------------------|-----------------------------------|
| Alta | CT0198 | 9,13 | 10 |
| | CT0298 | 7,18 | |
| Baixa | CT0398 | 6,78 | |
| | CT0498 | 6,78 | |
| | CT0598 | 7,18 | |
| | CT0698 | 7,22 | |
| | CT0798 | 6,66 | |
| | CT0898 | 6,37 | |
| | CT0998 | 7,24 | |
| | CT1098 | 6,47 | |

Analisando a Tabela 22 observa-se que entre os 10 isolados, apenas um (CT0198) apresentou alto nitrogênio. O restante dos isolados (90%) apresentaram percentual de nitrogênio total que os classificam no grupo que apresenta baixo teor para este composto. Isto coincide com os resultados obtidos neste trabalho para a Usina Alvorada.

Da mesma forma que na Usina Alvorada, verificou-se que as cepas classificadas dentro de uma mesma faixa de nitrogênio podem apresentar os níveis baixo, médio e alto para os parâmetros Y_x/s , VSC, NCO, μ_{\max} , θ e Y_p/s . O grupo de baixo nitrogênio apresenta cepas pertencentes aos grupos V (1.3.3.2.3.2), XIV (2.1.1.2.1.2), XV (1.1.2.2.1.2), XVI (1.1.1.2.1.2), XVII (2.1.1.3.1.2), XVIII (1.1.1.3.1.2) e XIX (1.1.1.3.1.1). Entre estes grupos, verificou-se a predominância de cepas que apresentam nível alto (1) para Y_x/s .

A quantidade de cepas isoladas neste processo contendo baixo teor de nitrogênio indica que ou o meio de fermentação utilizado no processo da Citrosuco

Paulista (licor de última pressão do bagaço da laranja) contém menor quantidade de nitrogênio que o utilizado no processo da Usina Alvorada (melaço + caldo de cana); ou a perda de células no processo da Citrosuco Paulista é maior favorecendo a dominância de cepas com altos Yx/s e portanto baixa concentração de nitrogênio.

4.2.5 - Taxonomia numérica das leveduras

Os resultados encontrados para a sequência numérica e classificação das cepas isoladas utilizando Taxonomia Numérica são apresentados na Tabela 23. A sequência numérica obtida para cada uma das cepas foi comparada com a proposta por GRIFFITHS (1981), para se obter a classificação do gênero e espécie da levedura isolada.

Tabela 23: Sequência numérica e classificação das cepas isoladas através da metodologia taxonomia numérica.

| Cepa | Sequência numérica | Classificação |
|--------|--------------------|--------------------------------------|
| CT0198 | 6037450 | <i>não obtida</i> |
| CT0298 | 6037440 | <i>S. chevalieri (S. cerevisiae)</i> |
| CT0398 | 6037440 | <i>S. chevalieri (S. cerevisiae)</i> |
| CT0498 | 6037440 | <i>S. chevalieri (S. cerevisiae)</i> |
| CT0598 | 6037450 | <i>não obtida</i> |
| CT0698 | 6037450 | <i>não obtida</i> |
| CT0798 | 6037440 | <i>S. chevalieri (S. cerevisiae)</i> |
| CT0898 | 6037440 | <i>S. chevalieri (S. cerevisiae)</i> |
| CT0998 | 6037440 | <i>S. chevalieri (S. cerevisiae)</i> |
| CT1098 | 6037440 | <i>S. chevalieri (S. cerevisiae)</i> |

Pela Tabela 23, verifica-se que 7 de um total de 10 isolados puderam ser identificados pela metodologia Taxonomia Numérica, correspondendo a 70 %. Estes foram identificados como *Saccharomyces chevalieri* (*Saccharomyces cerevisiae*). A indicação entre parênteses corresponde à atualização das espécies segundo BARNETT *et al.* (1986) e KREGER-VAN RIJ (1984). Estes autores utilizam *Saccharomyces chevalieri* como sinônimo de *Saccharomyces cerevisiae*.

Os isolados CT0198, CT0598, CT0698, cuja sequência numérica obtida foi 6037450, não puderam ser identificados, pois esta sequência não confere com nenhuma apresentada por GRIFFITS (1981). Essa não identificação está associado a assimilação da melibiose (dígito 6). Este teste, se negativo, permite a obtenção da sequência numérica 6037440, possibilitando a identificação do isolado como *Saccharomyces chevalieri* (*Saccharomyces cerevisiae*). Porém este teste se apresentou positivo, significando que os isolados foram capazes de assimilar a melibiose. Assim, a sequência numérica obtida para estes impossibilita a identificação através da metodologia utilizada.

As respostas, positivas ou negativas, para cada teste são apresentadas na Tabela 24.

Tabela 24: Resultado obtido para os testes realizados com cada cepa.

| Cepa | Fonte de carbono | Malt. Ass. | Gal. Ass. | Lact. Ass. | Nitr. Ass. | Ery. Ass. | Am. Hid. | Rib. Ass. | 37° C | GI/NaCl | Sac. Fer. | Gal. Fer. | Gl. Fer. | Sac. Ass. | Ino. Ass. | Cel. Ass. | Raf. Ass. | Man. Ass. | Mel. Ass. | Lact. Fer. | XII. Ass. | Cel. Along. |
|--------|------------------|------------|-----------|------------|------------|-----------|----------|-----------|-------|---------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|-------------|
| CT0198 | | + | + | - | - | - | - | - | + | ++ | + | + | + | + | - | - | + | - | + | - | - | - |
| CT0298 | | + | + | - | - | - | - | - | + | ++ | + | + | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - |
| CT0398 | | + | + | - | - | - | - | - | + | +/- | + | + | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - |
| CT0498 | | + | + | - | - | - | - | - | + | +/- | + | + | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - |
| CT0598 | | + | + | - | - | - | - | - | + | +/- | + | + | + | + | - | - | + | - | + | - | - | - |
| CT0698 | | + | + | - | - | - | - | - | + | +/- | + | + | + | + | - | - | + | - | + | - | - | - |
| CT0798 | | + | + | - | - | - | - | - | + | +/- | + | + | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - |
| CT0898 | | + | + | - | - | - | - | - | + | +/- | + | + | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - |
| CT0998 | | + | + | - | - | - | - | - | + | +/- | + | + | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - |
| CT1098 | | + | + | - | - | - | - | - | + | +/- | + | + | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - |

Analisando os resultados apresentados na Tabela 24, verifica-se que entre os 10 isolados, foram identificados 2 diferentes grupos. Trata-se dos grupos A e B cujas características foram apresentadas na Tabela 17 (item 4.1.5). A Tabela 25 apresenta as cepas classificadas nos grupos A e B.

Tabela 25: Classificação das cepas nos grupos A, B, C, D obtidos através dos testes de taxonomia numérica.

| Grupo | Característica do grupo | | Isolados | % em relação ao total de isolados |
|-------|-------------------------|-----------|--|-----------------------------------|
| | Maltose | Melibiose | | |
| A | + | + | CT0198, CT0598, CT0698 | 30 |
| B | + | - | CT0298, CT0398, CT0498, CT0798, CT0898, CT0998, CT1098 | 70 |

Observa-se pela Tabela 25 que 7 isolados apresentaram características que os classificam no grupo B e 3 no grupo A. O fato das cepas isoladas desta unidade fermentativa (Citrosuco Paulista) serem todas (100%) classificadas nos grupos A (30%) e B (70%) coincide com os resultados apresentados para a Usina Alvorada, onde estes mesmos grupos representam 88,46% dos isolados.

Similarmente a discussão feita para a Usina Alvorada, segundo BARNETT (1992), a espécie *cerevisiae* apresenta resposta variável para o teste de assimilação de melibiose. Pode-se assumir assim que todos os isolados são pertencentes a espécie *cerevisiae*.

5 - CONCLUSÃO

Na unidade fermentativa da Usina Alvorada os grupos dominantes no início da safra apresentaram menores valores para produção específica de células sendo posteriormente substituídos por grupos que apresentavam alta produção específica de células. Isto aconteceu devido ao processo apresentar condições favoráveis para o desenvolvimento destas (sangria). Este fato reforça a influência das condições de operação sobre a seleção da cepa dominante.

De forma geral, a maior parte das cepas isoladas na unidade fermentativa da Usina Alvorada apresentaram características fermentativas satisfatórias. Alguns grupos apresentaram-se repetidamente no decorrer da safra, sendo que os de maior importância foram os grupos I e II. Isto sugere que as leveduras deste grupo podem ser uma opção para o início da próxima safra, pois apresentam boas qualidades fermentativas e possuem condições de dominar o processo em questão.

O processo fermentativo da Citrosuco Paulista, as cepas isoladas apresentaram nível médio para produção específica de etanol, e quando comparada com as cepas da Usina Alvorada, são inferiores no que diz respeito as características fermentativas.

Os dois processos estudados apresentaram uma grande instabilidade populacional. Isto pode ser devido ao fato dos dois processos fermentativos terem utilizado na partida cepas de panificação.

Com relação ao nitrogênio total o que se verifica é que independente dela pertencer ao grupos de alto, médio ou baixo teor de nitrogênio, seus parâmetros fermentativos podem variar entre as faixas do alto (1), médio (2), ou baixo (3). O que se verifica nas duas unidades estudadas é a predominância de cepas que apresentam baixo teor de nitrogênio.

A metodologia Taxonomia Numérica se mostrou pouco eficiente na

identificação dos isolados das duas unidades industriais. As duas unidades fermentativas juntas apresentaram um total de 36 isolados, sendo que aproximadamente apenas 47 % deles puderam ser identificados pela metodologia.

A metodologia de classificação de leveduras através de parâmetros cinéticos e fermentativos apresentada neste trabalho não identifica taxonômica ou geneticamente os isolados, porém fornece dados importantes a respeito de qualidades fermentativas dos isolados. Os códigos obtidos por esta metodologia representam uma forma rápida de se avaliar as características das cepas presentes na unidade fermentativa. Assim, é uma importante ferramenta a ser utilizada junto ao acompanhamento da dinâmica de população de leveduras, possibilitando a tomada de decisões e resolução de problemas em destilarias.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J. L., Processo de Recuperação de Leveduras ou Processo Melle-Boinot. In: *Semana da Fermentação Alcoólica*, 1, Piracicaba, 1960, Anais, p.254-262.
- AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; OLIVEIRA, A. J. , 1991. Apud: CABRINI, K. T. & GALLO, C. R., Identificação de Leveduras Contaminantes no Processo de Fermentação Alcoólica na Usina Santa Elisa, *STAB- Açúcar Álcool e Subprodutos*, v.17, n.4, p.48-50, 1999.
- AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; ZAGO, E. A.; BASSO, L. C.; GALLO, C. R., 1989. Apud: CABRINI, K. T. & GALLO, C. R., Identificação de Leveduras Contaminantes no Processo de Fermentação Alcoólica na Usina Santa Elisa, *STAB- Açúcar Álcool e Subprodutos*, v.17, n.4, p.48-50, 1999.
- ANDRIETTA, S. R., *Modelagem e Controle de Fermentação Alcoólica Contínua em Escala Industrial*. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1994. Tese (Doutorado).
- ANDRIETTA, S. R.; ANDRIETTA, M. G. S.; SERRA, G. E., Leveduras não Fermentativas - Processo de Instalação e Forma de Detecção e Eliminação, *STAB- Açúcar Álcool e Subprodutos*, v.15, n.6, 1997.
- ANDRIETTA, S. R.; ANDRIETTA, M. G. S; RODRIGUES, M. I., Método de Caracterização de Leveduras de Processo Utilizando Parâmetros Cinéticos e Produção Específica, *STAB- Açúcar Álcool e Subprodutos*, v.13, n.4, p.22-25, 1995.

- ANDRIETTA, S. R.; MIGLIARI, P. C.; ANDRIETTA, M. G. S. Classificação das Cepas de levedura de processos Industriais de Fermentação Alcoólica Utilizando Capacidade Fermentativa, *STAB- Açúcar Álcool e Subprodutos*, v.17, n.5, p.54-59, 1999.
- BARNETT, J. A; PAYNE, R. W.; YARROW, D., *Yeast: Characteristics and Identification*, Cambridge: University Press, 1002p, 1983.
- BARNETT, J. A., The taxonomy of the Genus *Saccharomyces* Meyen ex Press: a Short Review for Non-taxonomists, *Yeast*, v.8, p.1-23, 1992.
- BASSO, L. C.; OLIVEIRA, A. J.; ORELLI, V. F. D. M.; CAMPOS, A. A.; GALLO, C. R.; AMORIM, E. H. V., Dominância das leveduras contaminantes sobre as linhagens industriais avaliadas pela técnica de cariotipagem. In: *Congresso Nacional da STAB*, 5, Águas de São Pedro, 1993, Anais, p.245-250.
- BIOLOG® - Especialized Microbiology test panels - sem data.
- BORZANI, W., Fermentação Alcoólica Contínua. In: *Semana da Fermentação Alcoólica*, 1, Piracicaba, 1960, Anais, p.263-276.
- CABRINI, K. T. & GALLO, C. R., Identificação de Leveduras Contaminantes no Processo de Fermentação Alcoólica na Usina Santa Elisa, *STAB- Açúcar Álcool e Subprodutos*, v.17, n.4, p.48-50, 1999.
- CAMPBELL, I., Wild Yeasts in Brewing and Distiling. In: *Brewing Microbiology*. London, Elsevier Applied Science, p.187-205, 1987.
- DREWS, W. A., Fermentação do Melaço de Cana-de-açúcar no Brasil. In: *Simpósio de Fermentação*, 1, São Paulo, 1964, Anais, p.213-222.

- DUNCAN, C. L. & COLMER, A. R., Coliforms associated with sugar cane plants and juices, *Appl. Microbiol*, v.12, n.2, p.173-177,1964.
- FINGUERUT, J.; CESAR, R. P.; LEIMER, K. H.; VAZ ROSSEL, C. E., Fermentação Contínua em Múltiplos Estágios, *STAB- Açúcar Alcool e Subprodutos*, v.10, n.3, p.41-42, 1992.
- GHOSE, T. K. & TYAGI, R. D., Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. I. Batch versus continuous systems, *Biotechnol. Bioeng.*, v.21, n.8, p.1387-1400, 1979.
- GRIFFITHS, A. J., A Numericlature of the Yeast, *Antonie van Leeuwenhoek*, v.47, p.547-563, 1981.
- HARRIS, J. O. & WATSON, W., The use of controlled levels of actidione for brewing and non brewing yeast strain differentiation, *Journal of Institute of Brewing*, v.74, p.286-290, 1968.
- KREGER-VAN RIJ, N. J. W., *The yeasts: a taxonomic study*, 3 ed. Amsterdam: Elsevier Science, 1082p.,1984.
- KUHLE, A. VAN DER AA & JESPERSEN, L., Detection and identification of wild yeasts in lager breweries, *International Journal of Food Microbiology*, v. 43, p. 205-213, 1998.
- LIMA, U A, Sistema de Fermentação Alcoólica. In: *Semana da Fermentação Alcoólica*, 1, Piracicaba, 1960, Anais, p.242-253.
- LIMA, U. A., Evolução dos Processos Fermentativos no Brasil, IV Semana de Fermentação Alcoólica, Piracicaba, p.1-6, 1985.
- LIN, Y., Detection of wild in the brewery efficiency of differential media, *Journal of Institute of Brewing*, v.81, p.410-417, 1975.

- LODDER, J., *The yeasts, a taxonomic study*. 2^a ed., Amsterdam, 1970.
- MAIORELLA, B. L.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R., *Alcohol Production and Recovery*. In: Flechter, A., *Advances in Biochemical Engineering*. Heildeberg: Spring Verlag, 1981, v.20, p.41-73.
- MALTO, M. L., *Estudo de Metodologia para Caracterização de Leveduras da Fermentação Alcoólica Industrial através da Taxonomia Numérica e Potencial Fermentativo*. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1997. Tese (Mestrado).
- MEADEN, P., *DNA Fingerprinting of Brewers Yeast: Current Perspectives*, *Journal of the Institute of Brewing*, v.96, n.4, p.195-200, 1990.
- OLIVEIRA, E. R., *Histórico da Fermentação Alcoólica*, In: *Semana da Fermentação Alcoólica*, 1, Piracicaba, 1960, Anais, p.196-205.
- PANCHAL, C.J. & TAVARES, F. C. A., *Yeast Strain Selection for Fuel Ethanol Production*, In: PANCHAL, C.J (Ed). *Yeast Strain Selection*. New York: Marcel Dekker, 1990, p.225-243.
- PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R., *Microbiologia - Conceitos e Aplicações*, v.1, 2^a ed., Makron Books, 1996.
- PULZATTO, M. E., *Fatores que influenciam na obtenção de biomassa de levedura seca (Saccharomyces cerevisiae) da fermentação alcoólica*. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2000. Tese (Doutorado).

- RODRIGUES, M. I; ANDRIETTA, S. R.; MAUGERI, F. F., Simulação da produtividade e rendimento em fermentação alcoólica contínua, para reatores em fermentação alcoólica contínua, para reatores operando em condições ideais e não ideais de mistura. *STAB- Açúcar Álcool e Subprodutos*, v.10, n.5, p.35-47, 1992.
- RODRIGUES, M. I., Desenvolvimento de Técnicas para Controle da Fermentação, In: *Reunião Técnica sobre Fermentação Alcoólica* - Copersucar, p.27-60, 1989.
- RODRIGUES, M. I & ANDRIETTA, M. G. S, *Controle da fermentação alcoólica através de testes microbiológicos e bioquímicos*. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, Campinas, p.54, 1995 (Curso de Extensão).
- RODRIGUEZ, S. B., A system for identifying spoilage yeast in packaged wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, v.38, n.4, p.273-76, 1987.
- ROUSSELET, G. R., Fermentação do Caldo de Cana. *Semana da Fermentação Alcoólica*, 1, Piracicaba, 1963, Anais, p.154-161.
- SALIK, F.L.M.; POVH, N.P., Método electrofotométrico para determinação de teores alcoólicos em mistura hidroalcoólicas. In: *Congresso Nacional da Stab*, 5, Águas de São Pedro, 1993. Anais, p.262-263, Piracicaba.
- SOUZA, M. A. C.; MARQUES, M. O.; MELO, W. J., Caracterização de leveduras em caldo primário e mosto. In: *Congresso Nacional da STAB*, 5, Águas de São Pedro, 1993, Anais, p.235-240, Piracicaba.
- SPINA, I. T., Novos meios de cultura para bactérias e leveduras. In: *Reunião Técnica sobre Fermentação Alcoólica*, 1., Piracicaba, Anais, p.74-84, 1989.

- TAVARES, F. C. A.; ECHEVERRIGARAY, S.; GOMES, L. H.; SOUBIHE, M.
Identificação Molecular de Leveduras da Fermentação Alcoólica, *STAB-
Açúcar Álcool e Subprodutos*, v.10, p.34-39, 1992.
- VAN DER WALT, J. P., *The Typological Yeast Species and its Delimitation*. In:
Rose, A. h. e Harrison, J. S. *The Yeasts*. London, Academic Press, v.1, p.95-
121, 1987.
- YOKOYA, F., Problemas com contaminantes na fermentação alcoólica. *STAB-
Açúcar Álcool e Subprodutos*, v.1, p.38-39, 1991.
- ZARPELON, F. & ANDRIETTA, S. R., Fermentação Contínua para Produção de
Álcool, *STAB- Açúcar Álcool e Subprodutos*, v.10, n4, p.23-28, 1992.