AVALIAÇÃO DE LEVEDURAS INDUSTRIAIS EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

GENOVEFA PEISINO
(Bióloga)

Orientador: Prof. Dr. FLÁVIO CÉSAR ALMEIDA TAVARES

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia. ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: *Genética e Melhoramento de Plantas.*

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Novembro - 1986

.i.

Ao companheiro amigo,

Andrê Luiz

A minha filha,

Thalita

COM AFETO

.ii.

A

minha mãe e irmãos

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

- Prof. Dr. Flávio César Almeida Tavares.
- Prof. Dr. Isaías Olivio Geraldi.
- Prof.^a Dr.^a Maria Ruth Buzzato Alleoni.
- Erotides Alice Rocon Stange.
- Luzia Doretto Paccola.
- Paulo Eduardo Moretti.
- Maria Helena Fungaro e Dayse Figueiredo.
- Flávia Maria de Oliveira.
- Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner.
- José Hernann Fandiño.
- Cláudio e Vanda Lopez de Souza.
- Antonio da Rocha Campos, Luiz Próspero, Paulo Ortolan Filho, Marcos Antonio Puppín, Francisco Pilizzari, Ana Maria Brancalhon e Luiz Umberto Gomes.
- Terezinha de Jesus Barrete e Eisa Aparecida Cesar.
- Colegas do Curso de Pós-Graduação.
- Professores do Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

- Professores do Departamento de Biologia da Universi
dade Federal do Espírito Santo.
- Instituto de Genética da Escola Superior de Agricultu
tura "Luiz de Queiroz" na pessoa do Prof. Dr. João
Lúcio de Azevedo.
- Universidade Federal do Espírito Santo - PICD/CAPES.

I N D I C E

	<u>Página</u>
RESUMO	xiii
SUMMARY.	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.	3
2.1. Efeitos do etanol	3
2.2. Efeitos do substrato.	19
2.3. Efeitos da temperatura.	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1. Material biológico.	42
3.2. Meios de cultivo.	43
3.2.1. Meio completo para leveduras - meio de composição não definida (MORTIMER & HAWTHORNE, 1969), usado para o prepa ro dos inóculos de multiplicação. . . .	43
3.2.2. Meios de multiplicação.	43
3.2.3. Meios de fermentação.	44
3.3. Soluções e reagentes.	45
3.3.1. Solução de sais para os meios de multi plicação e fermentação	45
3.3.2. Solução de sais Ringer (LEE, S.S. <i>et alii</i> , 1981), solução usada para diluição das amostras.	45

Página

3.3.3. Solução corante (LEE, S.S. <i>et alii</i> , 1981). Solução usada para determinação da via- bilidade celular.	46
3.3.4. Reativo de Somogyi (AMORIM <i>et alii</i> , 1982)..	46
3.3.5. Reativo de Nelson (AMORIM <i>et alii</i> , 1982)...	47
3.4. Determinação de açúcares redutores totais no môsto - Segundo método de Somogyi e Nelson, adaptado por AMORIM <i>et alii</i> (1982).	47
3.5. Preparo dos inóculos de multiplicação.	48
3.6. Preparo dos inóculos dos testes de fermen- tação.	49
3.7. Montagem e condução dos ensaios de fermenta- ção.	49
3.8. Destilação do vinho (AMORIM <i>et alii</i> , 1982). .	51
3.9. Determinação do teor alcoólico do destilado (AMORIM <i>et alii</i> , 1982).	51
3.10. Determinação de açúcares redutores no vinho (AMORIM <i>et alii</i> , 1982).	51
3.11. Cálculos dos rendimentos.	53
3.12. Cálculos da eficiência.	54
3.13. Viabilidade.	54
3.14. Brotamento.	55
3.15. Multiplicação celular	55
3.16. Peso úmido de células	56
3.17. Peso seco de células.	56
3.18. Procedimento estatístico.	57

4. RESULTADOS	59
4.1. Avaliação de caracteres fermentativos sob diferentes concentrações de açúcares e temperaturas.	59
4.1.1. Produção de etanol e rendimento	59
4.1.2. Eficiência	60
4.1.3. Viabilidade celular.	64
4.1.4. Brotamento	65
4.1.5. Multiplicação celular.	68
4.2. Avaliação de caracteres fermentativos sob diferentes concentrações de sorbitol - Tolerância à pressão osmótica.	75
4.2.1. Produção de etanol e rendimento.	75
4.2.2. Eficiência.	78
4.2.3. Viabilidade celular.	80
4.2.4. Peso celular	82
5. DISCUSSÃO.	90
5.1. Avaliação de caracteres fermentativos sob diferentes concentrações de açúcares e temperaturas.	90
5.1.1. Produção de etanol	90
5.1.2. Viabilidade.	99
5.1.3. Multiplicação celular.	104
5.2. Avaliação de caracteres fermentativos sob diferentes concentrações de sorbitol - Tolerância à pressão osmótica.	114

.viii.

	<u>Página</u>
5.2.1. Produção de etanol.	114
5.2.2. Viabilidade.	119
5.2.3. Peso celular	119
6. CONCLUSÕES	123
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
1 - Produção de etanol (% v/v) apresentada por leveduras industriais em misturas de melaço e xarope de cana.	61
2 - Rendimentos (%) obtidos com leveduras industriais em misturas de melaço e xarope de cana.	62
3 - Eficiência (%) apresentada por leveduras industriais em cinco, de uma série de dez, fermentações conduzidas em misturas de melaço e xarope de cana.	63
4 - Viabilidade celular (%) apresentada por leveduras industriais após cinco, de uma série de dez, fermentações conduzidas em misturas de melaço e xarope de cana.	66
5 - Brotamento (%) apresentado por leveduras industriais em cinco, de uma série de dez, fermentações conduzidas em misturas de melaço e xarope de cana.	69
6 - Viabilidade dos brotos (%) apresentada por leveduras industriais em cinco, de uma série de dez, fermentações conduzidas em misturas de melaço e xarope de cana.	70

TabelaPágina

7	-	Variações nos números de células por mililitro de leveduras industriais após dez fermentações conduzidas em misturas de melaço e xarope de cana.	71
8	-	Significâncias das diferenças observadas entre concentrações de açúcares dentro de levedura e temperatura.	72
9	-	Significâncias das diferenças observadas entre temperaturas dentro de concentrações de açúcares e de levedura.	73
10	-	Significâncias das diferenças observadas entre leveduras dentro de concentração de açúcares e de temperatura	74
11	-	Produção de etanol (% v/v) apresentada por leveduras industriais em misturas de melaço e xarope de cana a 11,00% de açúcares redutores totais.	76
12	-	Rendimentos (%) obtidos com leveduras industriais em misturas de melaço e xarope de cana a 11,00% de açúcares redutores totais. .	77

TabelaPágina

13 - Eficiência (%) apresentada por leveduras industriais em misturas de melaço e xarope de cana a 11,00% de açúcares redutores totais.	79
14 - Viabilidade celular (%) apresentada por leveduras industriais em quatro, de uma série de oito, fermentações conduzidas em misturas de melaço e xarope de cana a 11,00% de açúcares redutores totais.	81
15 - Variações nos pesos (g) úmidos de células de leveduras industriais após 8 fermentações conduzidas em misturas de melaço e xarope de cana a 11,00% de açúcares redutores totais.	84
16 - Variações nos pesos (g) secos de células de leveduras industriais após 8 fermentações conduzidas em misturas de melaço e xarope de cana a 11,00% de açúcares redutores totais.	85
17 - Significâncias das diferenças observadas entre concentrações de sorbitol dentro de leveduras.	86
18 - Significâncias das diferenças observadas entre leveduras dentro de concentração de sorbitol.	87

TabelaPágina

19 - Açúcar consumido (%) por leveduras industriais em cinco, de uma série de dez, fermentações conduzidas em misturas de melaço e xarope de cana com reciclagem de células.	88
20 - Açúcar consumido (%) por leveduras industriais em misturas de melaço e xarope de cana a 11,00% de açúcares redutores totais. .	89

AVALIAÇÃO DE LEVEDURAS INDUSTRIAIS EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Autora: *Genovefa Peisino*

Orientador: Prof. Dr. Flávio César Almeida Tavares

R E S U M O

O presente trabalho objetivou avaliar os parâmetros de fermentação alcoólica: teor de álcool produzido, rendimento, eficiência, viabilidade, brotamento e multiplicação celular para as leveduras M300A (híbrido entre as linhagens 12671 e 12672 de *Saccharomyces cerevisiae*) e Fleischmann sob diferentes condições ambiente. As leveduras foram ensaiadas em misturas de melaço e xarope de cana a diferentes concentrações de açúcares redutores totais e temperaturas, bem como em misturas a diferentes concentrações de sorbitol. Foi observado que as duas leveduras apresentaram produtividade de etanol semelhante, mas a produção média de etanol pela linhagem M300A tornou-se menor do que a da Fleischmann em concentrações de açúcares acima de 12,30% quando a temperatura foi aumentada de 30°C para 35°C. Tanto a 30°C como a 35°C a fermentação não foi completamente inibida mesmo com 20,60% de açúcares e respectivas concentrações de etanol produzidas. O aumento da tem

peratura ocasionou menores produções de etanol quando os móstos continham 16,50% e 20,60% de açúcares. A 30°C ambas leveduras apresentaram maior queda da viabilidade nas fermentações conduzidas com 20,60% de açúcares. A 35°C a viabilidade diminuiu mais que a 30°C e o aumento da temperatura reduziu significativamente a multiplicação celular. A produção de etanol, rendimento e eficiência diminuíram significativamente com o aumento da pressão osmótica, mas a viabilidade celular não foi afetada. O aumento da concentração de sorbitol resultou em menores pesos úmidos de células, enquanto que os pesos secos de células foram menores com 25,00% e 30,00% do açúcar. A menor multiplicação e maior desidratação das células da levedura M300A resultou em menores produções de etanol comparado à Fleischmann nas fermentações com 15,00%, 20,00% e 25,00% de sorbitol. Pode-se concluir dos resultados obtidos, que a alta taxa de morte das células limita tornar a produção de etanol mais rápida pelo aumento da temperatura, bem como a obtenção de altas concentrações de etanol pelo aumento da concentração de açúcares. Os efeitos do etanol sobre a fermentação são menos severos do que sobre a multiplicação e viabilidade celular, e, os efeitos sobre a última são mais severos do que sobre a multiplicação celular. A concentração de 12,30% de açúcares a 30°C correspondem às melhores condições sob as quais há melhor utilização de açúcares e a viabilidade celular é mantida acima de 80% para a le

vedura M300A e de 90% para a Fleischmann. Nem sempre é possível relacionar multiplicação celular com percentagens de brotamento, possivelmente devido aos efeitos do substrato e do etanol sobre estes parâmetros, à viabilidade celular e/ou ao método empregado para contagem dos brotos. O aumento da temperatura é acompanhado por uma diminuição da tolerância ao etanol: A desidratação das células causada por alta pressão osmótica limita a obtenção de altas concentrações de etanol pelo aumento da concentração de substrato. Há variação de resposta quanto à tolerância ao etanol conforme o critério de avaliação considerado.

INDUSTRIAL YEASTS EVALUATION UNDER DIFFERENT
ALCOHOLIC FERMENTATION CONDITIONS

Author: *Genovefa Peisino*

Adviser: Prof. Dr. Flávio César Almeida Tavares

S U M M A R Y

The present research was carried out as main purpose to evaluate the parameters of alcoholic fermentation: alcohol production, yield, efficiency, cell viability, budding and cell multiplication, using the yeasts M300A (hibrid among 12671 and 12672 of baker's *Saccharomyces cerevisiae*) and Fleischmann under different environmental conditions. The assays were performed in mixtures of sugar cane juice and syrup in different concentrations of sugars, in different temperatures and in mixtures with different concentrations of sorbitol. Productivity of both yeasts were similar but lower ethanol productions of the hibrid M300A was observed compared with Fleischmann above 12,30% of sugars and when the temperature was raised from 30°C to 35°C. Under such temperatures the fermentations were not inhibited completely even at 20,60% of sugars and the ethanol produced. Raising the temperature lower ethanol production were obtained for the

mashes of 16,50% and 20,60% of sugars. At 30°C both yeasts have shown great decrease of viability at 20,60% of sugars. At 35°C the cell viability was smaller than at 30°C and was observed that higher temperatures have reduced significantly the cell multiplication. Yield, efficiency and ethanol production, were reduced at higher osmotic pressures but cell viability have not been affected. At higher sorbitol concentrations the fresh cell weight was decreased. The cell dry weight was smaller at 25,00% and 30,00% of the sugar medium. The higher cell dehydration and smaller cell multiplication of M300A resulted in smaller ethanol production compared to Fleischmann yeast at 15,00%, 20,00% and 25,00% of sorbitol. It can be concluded that the decrease of viability limits the speed of ethanol production under the enhancement of temperature as well as higher ethanol content under more sugar content. The effects of ethanol on fermentation are less severe than on cell viability and multiplication. The effects over cell viability are more severe than on cell multiplication. The conditions of 12,30% of sugars at 30°C permit better sugar utilization and high cell viability for both yeasts. The effects of substrate and product as well as the cell death make difficult to relate cell multiplication to budding. The temperature have a negative effect on ethanol tolerance by both yeasts. The dehydration of cells caused by high

.xviii.

osmotic pressure limits the production of high concentration of ethanol with higher concentration of substrate. Ethanol tolerance is variable and related to the evaluation criteria employed.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil antes do PROÁLC00L, o álcool para uso industrial era quase totalmente obtido pela hidratação catalítica de etileno do petróleo, e o processo de fermentação por leveduras, era usado principalmente para a produção de bebidas alcoólicas. Consequentemente, a maioria das pesquisas era orientada para a seleção de linhagens de leveduras capazes de produzirem bebidas com finas qualidades, e pouco esforço foi direcionado para o melhoramento da eficiência na produção de etanol. Entretanto, a crise mundial de petróleo estimulou muito interesse no uso como combustível de etanol produzido pela fermentação de biomassa. Isto interferiu no padrão normal da produção de etanol, tornando necessária uma maior demanda de etanol produzido por fermentação e, consequentemente, uma mudança de prioridades nas pesquisas.

É fato bem conhecido, que o processo de fermentação é dependente das condições ambiente e das característi

cas celulares do organismo usado. A fim de melhorar a fermentação alcoólica, três fatores devem ser considerados: (1) o problema da concentração de açúcares do ponto de vista da osmolaridade, (2) o problema da concentração de etanol como um produto final inibidor do processo de fermentação, e (3) o problema da duração, o tempo necessário para transformação econômica dos açúcares para etanol (HOLCBERG & MARGALITH, 1981). O aumento da temperatura é um dos modos pelos quais pode-se tornar o processo de fermentação mais rápido. A conversão eficiente de carboidratos para etanol, requer células que sejam tolerantes a altas concentrações de substrato e de etanol e capazes de produzir etanol eficientemente a temperaturas relativamente altas. Durante as fermentações, é essencial que a viabilidade celular permaneça a 100% da viabilidade inicial para assegurar uma velocidade de fermentação adequada, e é desejável que um nível de multiplicação celular ocorra para substituir as células mortas e aquelas perdidas durante os processos de centrifugação e reciclagem das células para o fermentador (NAGODAWITHANA *et alii*, 1974).

Considerando estes fatos, o presente trabalho visa avaliar comparativamente a produção de etanol, rendimento, eficiência, viabilidade e multiplicação celular de leveduras industriais sob diferentes concentrações de açúcares redutores totais, etanol produzido, temperaturas, bem como diferentes concentrações de sorbitol.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Vários são os fatores ambiente que afetam a produção de etanol, crescimento e viabilidade celular durante o processo de fermentação alcoólica. Esta revisão procura se restringir aos efeitos dos fatores que correspondem às variáveis do presente estudo, quais sejam: efeitos do etanol, do substrato e temperatura.

2.1. Efeitos do etanol

Presume-se que a parada de muitas atividades fisiológicas de um microrganismo resulta da ação inibitória de produtos do metabolismo que se acumulam progressivamente. No caso da produção comercial de etanol por fermentação com leveduras, o produto metabólico mais significativo com este respeito é o próprio etanol (TROYER, 1953).

A quantidade máxima de etanol que pode ser produzida no decurso de uma fermentação, varia de acordo com a

levedura usada. Isto se deve, em parte, a uma maior ou menor resistência ao etanol pelas leveduras (GRAY, 1941). Aparentemente, alta ou baixa tolerância não é peculiar a qualquer gênero ou espécie de levedura (GRAY, 1941 e BENÍTEZ *et alii*, 1983). Algumas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* são reconhecidas como alguns dos microrganismos mais tolerantes ao etanol (BEAVEN *et alii*, 1982). De acordo com DAY *et alii*, (1975), em geral, linhagens utilizadas na fabricação de cerveja têm somente tolerância moderada ao etanol, enquanto aquelas empregadas em destilarias têm uma tolerância maior (HARRISON & GRAHAM, 1970). Entretanto, Nojiro e Ouchi*, citados por ROSE & BEAVEN (1981), não encontraram diferenças na tolerância de leveduras de sakê e de destilarias quando comparadas com leveduras de cervejaria e de padaria. Foi observado que a fermentação numa levedura de sakê é mais resistente ao etanol do que numa linhagem de laboratório (BROWN *et alii*, 1981). BAJPAI & MARGARITIS (1982) observaram que o nível de tolerância ao etanol de *Kluyveromyces marxianus* UCD (FST) 55-82 é mais ou menos o mesmo que aquele relatado na literatura para diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. FLOR & HAYASHIDA (1983) isolaram um variante, *Saccharomyces uvarum inulyticus* var. nova, do vinho de arroz fermentado o qual foi considera

*NOJIRO, K.; OUCHI, K. *Journal of the Society of Brewing*, 27:824, 1962.

do hipertolerante a altas concentrações de etanol numa ampla variação de temperatura. Embora a tolerância a níveis altos de etanol varie amplamente entre as diferentes leveduras, linhagens de *Saccharomyces* usadas na fabricação de cerveja são razoavelmente uniformes em suas respostas ao etanol, tolerando concentrações de etanol de 7,00% a 13,00% (v/v) (DAY *et alii*, 1975). Linhagens osmofílicas de *Saccharomyces* não são muito tolerantes ao etanol (DAY *et alii*, 1975). Foi verificado que em meio de crescimento, espécies de *Saccharomyces* usadas na fabricação de cerveja toleram níveis de etanol mais altos do que aqueles normalmente produzidos no processo de fermentação (DAY *et alii*, 1975). Resultados semelhantes foram encontrados por BENÍTEZ *et alii* (1983) com espécies de *Saccharomyces* usadas na fabricação de vinhos. Segundo CASEY *et alii* (1984) o fator limitante da produção de níveis altos de etanol por leveduras utilizadas na fabricação de cerveja é uma deficiência nutricional. Quando uma fonte de nitrogênio, ergosterol e ácido oleico são adicionados ao mosto de até 31,00% de sólidos dissolvidos, *Saccharomyces uvarum* (*carlsbergensis*) produziu cerveja com até 16,20% (v/v) de etanol. A suplementação não aumenta a tolerância fermentativa das leveduras ao etanol mas aumenta o nível de síntese de massa celular acima daquela observada em mosto não suplementado. Portanto, de acordo com os autores, a generalização de que linhagens de

Saccharomyces utilizadas na fabricação de cerveja têm somente tolerância moderada ao etanol comparada com linhagens utilizadas em destilarias não pode ser verdadeira do ponto de vista de produção. Concentrações de etanol de aproximadamente 16,00% (v/v) são consideradas altas mesmo nas destilarias (HARRISON & GRAHAM, 1970).

Embora tenha sido estabelecido a mais de um século que leveduras, quando crescidas sob condições anaeróbicas, convertem uma grande proporção de açúcar suplementado ao meio, para etanol e dióxido de carbono (Pasteur*, citado por BEAVEN *et alii*, 1982), e, apesar da abundância de literatura na área de produção de etanol, pouco se conhece a respeito do local de sua formação na célula de levedura, como também sobre a maneira pela qual ele é excretado, seus efeitos tóxicos sobre as células e os fatores que controlam sua produção e excreção.

Sabe-se que *Saccharomyces cerevisiae* sintetiza dois ou mais isômeros das várias enzimas que catalizam reações na cadeia Embden-Meyerhof-Parnas (FRAENKEL, 1981). Além disso, vários trabalhos indicaram que as enzimas podem ser ligadas à membrana (ROTHSTEIN *et alii*, 1959 e GREEN *et alii*, 1965), embora ainda deve ser demonstrado que elas existem num

*PASTEUR, L. *Studies on Fermentation*. London, Mac Millan, 1879.

complexo multi-enzimático como em *Escherichia coli* (MOWBRAY & MOSES, 1976).

O etanol, diferentemente de muitos outros produtos finais de cadeias catabólicas e anabólicas nas células, é conhecido como capaz de desnaturar proteínas (COHN *et alii*, 1950). Devido ao efeito desnaturante, uma possível explicação da tolerância ao etanol é que ela é manifestada por linhagens que têm capacidade intrínseca para resistir aos efeitos desnaturantes do etanol (ROSE & BEAVEN, 1981). Dados não são disponíveis para suportar ou rejeitar esta hipótese. Entretanto, se esta fosse a base da tolerância ao etanol em leveduras, suportaria a hipótese de que a tolerância ao etanol está sob um complexo controle genético (Ismail & Ali*, citados por ROSE & BEAVEN, 1981) e explicaria a dificuldade de se selecionar para tolerância ao etanol durante subculturas de linhagens contendo concentrações aumentadas de etanol (DAY *et alii*, 1975).

De acordo com BROWN (1976) o efeito do etanol é mais fortemente observado sobre a membrana celular. Foi sugerido que a inibição pelo etanol parece ser tanto um efeito geral de desidratação como inibição específica de algumas enzimas (GRAY & SOVA, 1956 e BROWN, 1976).

Foi demonstrado que, em espécies de *Saccharomy*

*ISMAIL, A.A.; ALI, M.M. *Folia Microbiológica*, Praha, 16:350-354.

ces, o etanol inibe a atividade da hexoquinase (GRAY & SOVA, 1956; AUGUSTIN *et alii*, 1965; BROWN, 1976 e NAVARRO & FINK, 1982), da álcool desidrogenase (GRAY & SOVA, 1956; NAGODAWITHANA & STEINKRAUS, 1976 e BROWN, 1976), da α -glicerofosfato desidrogenase, mas não da fosfofrutoquinase. A inibição das atividades da hexoquinase e α -glicerofosfato desidrogenase foi mostrada ser do tipo não competitiva. Com estas, um complexo enzima-inibidor é formado (NAGODAWITHANA *et alii*, 1977). Foi encontrado ainda, que as duas isozimas da hexoquinase apresentam sensibilidades diferentes ao etanol (NAVARRO & FINK, 1982). Supõe-se, que os efeitos inibitórios do etanol sobre as enzimas de leveduras sejam menos intensos do que com as enzimas de outros microrganismos (BEAVEN *et alii*, 1982).

Quanto ao modo de excreção do etanol pelas células de leveduras, GOMA *et alii* (1981) encontraram que em *Saccharomyces cerevisiae*, o etanol é excretado contra um gradiente de concentração. Por outro lado, os estudos de BEAVEN *et alii* (1982), também com *Saccharomyces cerevisiae*, mostraram que a excreção do etanol ocorre sempre em direção à um gradiente de concentração. Segundo estes autores, as conclusões de GOMA *et alii* (1981) devem ser vistas criticamente devido ao método empregado por eles para calcular as concentrações de etanol intracelulares. Conforme os autores ressaltaram, a passagem do etanol através da membrana plasmática em dire-

ção a um gradiente de concentração poderia ser por difusão livre ou difusão facilitada. Enquanto não há evidências do envolvimento de uma proteína, aceita-se que o movimento do etanol e de outros alcoóis através da membrana plasmática microbiana seja por difusão livre.

Os trabalhos realizados sobre as cinéticas de inibição da produção de etanol e do crescimento celular de espécies de *Saccharomyces* pelo etanol, concordam que a inibição é do tipo não competitiva (AIBA *et alii*, 1968; BAZUA & WILKE, 1977; GHOSE & TYAGI, 1979b e NOVAK *et alii*, 1981). Entretanto, BROWN *et alii* (1981) encontraram um padrão cinético de inibição do crescimento celular mais complexo, e, inibição não competitiva, só foi evidenciada após ter sido feita correção para a viabilidade celular. Assim, segundo os autores, há dois componentes para o efeito do etanol observado sobre o crescimento: uma redução na taxa de crescimento e uma diminuição da viabilidade celular. Observaram também os autores, que as reduções nas taxas de fermentação, crescimento e viabilidade celular são todos fenômenos separados com constantes de inibição distintas. Os valores das constantes de inibição destes três parâmetros, mostram que os efeitos do etanol são mais severos sobre a viabilidade celular.

O grau de redução da multiplicação celular depende do nível de tolerância ao etanol que a levedura apresen

ta. A diminuição na taxa de crescimento pelo etanol, pode resultar amplamente de uma redução na taxa de multiplicação durante a fase exponencial, e eventual eliminação deste período, bem como de um possível aumento em lag (TROYER, 1953). Foi demonstrado que o etanol inibe a síntese de RNA e proteínas (Stephens & Oliver*, citados por BROWN *et alii*, 1981), e pode ser que este efeito contribua para a diminuição na taxa de crescimento, enquanto que a morte da célula resulta da ação mais geral do etanol como desnaturante de proteínas (BROWN *et alii*, 1981 e WANG *et alii*, 1981). A diminuição do crescimento efetuada pelo etanol, resulta não somente em menos células ativas, mas também no acúmulo de ligações fosfato de alta energia. Estes dois efeitos, que resultam na utilização de menos glicose, contribuiriam para a ocorrência do fenômeno de tolerância ao etanol (TROYER, 1953).

As relações cinéticas entre crescimento celular, formação de etanol e concentração do produto têm sido determinadas e há muita controvérsia entre os resultados. Alguns autores verificaram que a taxa de fermentação (RAHN, 1929; HOLZBERG *et alii*, 1967; GHOSE & TYAGI, 1979a e b e CIFTCI *et alii*, 1983) e a taxa de crescimento (HOLZBERG *et alii*, 1967; GHOSE & TYAGI, 1979b e BAJPAI & MARGARITIS, 1982) de leveduras decrescem linearmente com a concen-

*Não publicado.

tração de etanol. No entanto, outros autores, apesar de encontrarem que a taxa de utilização de glicose (GRAY, 1941) e a taxa de crescimento (TROYER, 1953 e BEAVEN *et alii*, 1982) variem inversamente com a concentração de etanol, não observaram uma relação linear direta. Uma relação linear entre taxa de crescimento e concentração de etanol poderia concebivelmente depender de uma variedade de fatores da cultura, incluindo a composição do meio (BEAVEN *et alii*, 1982). Uma dependência linear da taxa de crescimento sobre a concentração de etanol também foi mostrada para *Klebsiella aerogenes* (ZINES & ROGERS, 1970). Por outro lado, AIBA *et alii* (1968) estabeleceram uma relação exponencial entre os parâmetros em quesção. Resultados semelhantes foram obtidos por MOULIN *et alii* (1980) para a taxa de fermentação, e a constante empírica foi diferente quando glicose ou lactose foi usada. Egamberdiev & Lerusalinskii*, citados por ZINES & ROGERS (1971) por sua vez, encontraram que o crescimento decresce de forma hiperbôlica com o aumento da concentração de etanol, enquanto que BAZUA & WILKE (1977) mostraram que as funções são mais complexas. BAJPAI & MARGARITIS (1982), entretanto, observaram que na medida em que a concentração de etanol aumentava, a produção de células, produção de etanol e utilização de açúcar por *Kluy-*

*EGAMBERDIEV, N.B.; IERUSALIMSKII, N.D. *Microbiologiya*, 37:686, 1968.

Saccharomyces marxianus permaneciam quase constantes. Estas discrepâncias têm sido atribuídas ao fato de diferentes linhagens de leveduras e condições experimentais terem sido empregadas, bem como às diferenças na viabilidade celular das populações de leveduras, a qual não foi determinada na maioria dos trabalhos (LEE, S.S. *et alii*, 1981 e WANG *et alii*, 1981).

Uma contribuição para elucidar estes resultados contraditórios foi fornecida pelo estudo dos efeitos do etanol, isopropanol e butanol sobre o sistema de transporte da glicose através da membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae* (LEÃO & VAN UDEN, 1982). Os resultados mostraram que a inibição pelo etanol da fermentação e do crescimento desta levedura deve exibir cinética exponencial, desde que o passo de transporte determine a taxa total de crescimento e de fermentação. Quando os outros passos metabólicos inibidos pelo etanol têm coeficientes de sensibilidade significantes, sua própria cinética de inibição contribuirá para a cinética total que pode então não mais concordar com um modelo simples. A cinética total pode posteriormente ser distorcida pelos efeitos do etanol sobre a morte térmica e sobre as relações temperatura-crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*.

Há uma ampla concordância na literatura de que em espécies de *Saccharomyces* o crescimento celular é inibido a concentrações de etanol mais baixas do que o processo fermen-

tativo. A produção de etanol, assim, se estende por um período após a parada do crescimento celular (TROYER, 1953; HOLZBERG *et alii*, 1967; AIBA *et alii*, 1968; NAVARRO & DURAND, 1978; GHOSE & TYAGI, 1979b; BROWN *et alii*, 1981; WILLIAMS & MUNNECKE, 1981; BEAVEN *et alii*, 1982; CIFTCI *et alii*, 1983 e BENITEZ *et alii*, 1983). As equações cinéticas derivadas por AIBA *et alii* (1968), ao contrário das observações dos demais pesquisadores, mostraram que as células de *Saccharomyces cerevisiae* são capazes de produzir etanol indefinidamente. Contradição às observações acima é encontrada no trabalho de BAZUA & WILKE (1977) que definiram apenas uma concentração de etanol (cerca de 9,30% p/v) na qual as células nem crescem nem produzem etanol. Conforme os autores ressaltaram, há possibilidade de ocorrer adaptação das células ao meio de etanol, e, se glicose não está limitada é possível encontrar as células produzindo etanol mesmo após a parada do crescimento. Segundo GHOSE & TYAGI (1979 b), que definiram duas concentrações de etanol, uma para supressão completa do crescimento (8,70% p/v) e uma para inibição total da produção de etanol (11,40% p/v), as diferenças nos resultados são devidas às condições fisiológicas dos microrganismos e ao meio no qual cresceram e produziram etanol.

Foi demonstrado que o etanol inibe a taxa de fermentação de *Candida pseudotropicalis* mesmo a baixas concentrações (1,60% p/v), e que a presença simultânea de glicose ou

lactose com pequenas quantidades de etanol provoca um efeito sinérgico sobre a taxa de fermentação. Além disso, o etanol é mais inibitório quando lactose é usada, embora esta sozinha apresente efeito inibitório menor que glicose. Foi sugerido, que há possibilidade de que algumas enzimas envolvidas na fermentação da lactose sejam mais sensíveis ao etanol (MOULIN *et alii*, 1980). Foi observado também, que a utilização de xilose pela levedura *Pachysolen tannophilus* é adversamente afetada pelo etanol a quantidades tão baixas quanto 1,90% (p/v) (SLININGER *et alii*, 1982).

De acordo com alguns autores (HOLZBERG *et alii*, 1967; BAZUA & WILKE, 1977 e BROWN *et alii*, 1981), em leveduras, há uma concentração limite de etanol abaixo da qual não ocorre efeitos observáveis sobre o crescimento. Outros pesquisadores (BEAVEN *et alii*, 1982), entretanto, contestam a existência de tal concentração limiar. Esta também não foi observada em *Klebsiella aerogenes* (ZINES & ROGERS, 1970).

Em espécies de *Saccharomyces*, foi observado que o etanol produzido durante uma fermentação tem ação mais inibitória do que o etanol adicionado ao meio de cultivo (NAGODAWITHANA & STEINKRAUS, 1976; NOVAK *et alii*, 1981; CIFTCI *et alii*, 1983 e MOTA *et alii*, 1984). Fato este relacionado ao acúmulo de altas concentrações de etanol dentro das células em decorrência da resistência à sua difusão através da parede

e membrana celulares (GRAY, 1948; NAGODAWITHANA & STEINKRAUS, 1976; NAVARRO & DURAND, 1978; PANCHAL & STEWART, 1980; NOVAK *et alii*, 1981 e CIFTCI *et alii*, 1983). Assim, a resistência de uma linhagem de levedura a uma quantidade de etanol que ela produz, está principalmente associada à facilidade com a qual ela o excreta (NAVARRO & DURAND, 1978). Segundo LOUREIRO & FERREIRA (1983) as membranas celulares são altamente permeáveis ao etanol. A fluidez da membrana ao etanol tem sido relacionada à sua composição lipídica (GRAY, 1948; HAYASHIDA *et alii*, 1974; 1975; 1976; HAYASHIDA & OHTA, 1978; 1980; THOMAS *et alii*, 1978; THOMAS & ROSE, 1979; OHTA & HAYASHIDA, 1983 e JANSSENS *et alii*, 1983).

Nos estágios iniciais da fermentação, o conteúdo de etanol intracelular é significativamente mais alto que o extracelular. Após atingir um máximo, a proporção de etanol intra e extracelular diminui gradualmente (NAVARRO & DURAND, 1978; PANCHAL & STEWART, 1980 e NOVAK *et alii*, 1981), mas a concentração de etanol intracelular é sempre maior que a de etanol extracelular (NAVARRO & DURAND, 1978 e BEAVEN *et alii*, 1982). De acordo com BENÍTEZ *et alii* (1983) existe uma relação linear entre as concentrações de etanol interna e externa. Trabalhando com *Saccharomyces carlsbergensis*, NAVARRO & DURAND, (1978) verificaram que a concentração máxima de etanol intracelular precede a parada do crescimento celular e a diminui

ção da produção de etanol. A inibição de tais atividades foi atribuída por eles essencialmente ao etanol intracelular. Similarmente BENÍTEZ *et alii* (1983) observaram que as células de *Saccharomyces carlsbergensis* param de se dividir quando a concentração de etanol intracelular atinge um valor crítico. Por outro lado, NOVAK *et alii* (1981) observaram uma influência dupla de etanol (intra e extracelular) sobre o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*, e ressaltaram a importância deste efeito duplo do etanol a nível da tecnologia de produção. De acordo com estes autores, uma relação cinética simples entre taxa de crescimento e conteúdo de etanol intracelular não existe, visto que, quando este parâmetro diminui, nem estabiliza nem aumenta a taxa de crescimento. Isto foi atribuído ao efeito irreversível do etanol, isto é, à morte das células, como previamente proposto por BROWN *et alii* (1981). Os autores ressaltaram também, que os diferentes efeitos do etanol intra e extracelular podem ser a causa de algumas das discrepâncias na literatura quanto aos modelos de crescimento propostos, isto é, em alguns estudos o etanol adicionado foi considerado, enquanto em outros considerou-se o etanol produziido.

O etanol intracelular (NAGODAWITHANA *et alii*, 1974; NAGODAWITHANA & STEINKRAUS, 1976 e PANCHAL e STEWART, 1980), como também o etanol extracelular (BAZUA & WILKE, 1977; BROWN *et alii*, 1981; LEE, S.S. *et alii*, 1981 e BEAVEN *et alii*,

1982) são altamente prejudiciais à viabilidade celular. Fermentações rápidas têm sido usadas para produzir concentrações de etanol relativamente altas. (9,50% p/v ou mais) em poucas horas (5-6 h). No entanto, a alta taxa de morte das células é um problema considerado limitante para a aplicação de tais fermentações, em decorrência principalmente das altas concentrações de etanol que são acumuladas intracelularmente (NAGODAWITHANA *et alii*, 1974; NAGODAWITHANA & STEINKRAUS, 1976 e WANG *et alii*, 1981). Excepcionalmente, GHOSE & TYAGI (1979b) aplicando fermentações rápidas com *Saccharomyces cerevisiae* em hidrolizado de celulose observaram que 9,70% (p/v) de etanol foi produzido e a viabilidade mantida acima de 94%.

A avaliação do efeito conjugado do substrato (glicose) e produto (etanol) sobre o crescimento de *Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces bayanus* e *Saccharomyces cerevisiae* mostrou que a inibição pelo etanol varia com a concentração inicial do substrato, sendo que as linhagens de leveduras apresentam comportamentos diferentes (MOTA *et alii*, 1984). Parece claro que a inibição não pode ser dissociada da concentração inicial de substrato. O fenômeno de inibição deve ser estudado de um ponto de vista dinâmico (MOTA *et alii*, 1984). MOTA *et alii* (1984) também verificaram que o valor da biomassa sempre atinge um nível muito semelhante qualquer que seja o nível do substrato inicial. Eles sugeriram que ocorre a produção de um inibidor co-metabólico com o

crescimento celular. Assim, quando a biomassa atinge um certo valor, o crescimento cessa, o que não pode ser explicado pelo etanol produzido. Um estudo sobre o efeito da concentração inicial da biomassa sobre seu próprio crescimento (Strehaiano *et alii**, citados por MOTA *et alii* (1984), sugeriu também que existe um mecanismo de auto-inibição. Segundo MOTA *et alii* (1984), somente os conceitos de tolerância ou inibição pelo etanol não são suficientes. O efeito do acúmulo de etanol intracelular deve ser considerado, mas deve ser levado em conta também, a excreção, durante o crescimento celular, de um forte inibidor.

O fato de que uma levedura exibe uma alta tolerância ao etanol não significa que tal linhagem seria necessariamente o organismo mais eficiente para todos os propósitos industriais; entretanto, o estabelecimento do fato de que as leveduras variam nas suas tolerâncias ao álcool foi um passo no conjunto de critérios pelos quais uma levedura poderia ser selecionada para um processo de fermentação particular. (GRAY, 1945).

*STREHAIANO, P.; MOTA, M.; GOMA, O. *Biotechnology Letters*, 5:135, 1983.

2.2. Efeitos do substrato

A determinação de que diferentes linhagens de leveduras variam nas suas tolerâncias ao açúcar, foi um outro passo no estabelecimento de critérios pelos quais uma levedura pode ser selecionada para um processo de fermentação particular. A determinação da tolerância ao açúcar por leveduras tem se tornado cada vez mais importante, com a necessidade de produção industrial de etanol mais rápida, visto que, muitas indústrias tentam aumentar sua produção total pelo aumento da concentração dos vinhos, que obviamente resulta no aumento da concentração inicial de açúcar (GRAY, 1945).

Uma relação independente entre taxa de fermentação e concentração de açúcar foi encontrada por RAHN (1929). Por outro lado, Delle*, citado por HOLCBERG & MARGALITH (1981), afirmou que a quantidade de álcool produzido a partir de um certo açúcar fermentável diminuiria com o aumento na concentração de substrato. Isto estabeleceria um limite teórico para a fermentação a altas concentrações de açúcar. Mas, foi demonstrado, que o substrato tem efeitos inibitórios menores comparados aos efeitos do produto (Pironti**, citado por NAGODAWITHANA *et alii*, 1974).

*DELLE, P.N. *Odessa Otch Ninodielcheskoi Stantsii Russiakh Vinogr. Vinol.*, 118-160, 1911.

**PIRONTI, F.F. Ithaca, New York, 1971 (Philosophal Doctor Cornell University).

Em altas concentrações de açúcar, verificou-se maior produção de ácido acético (Schanderl*, citado por KUNKEE & AMERINE, 1970), o que pode resultar da inibição da taxa de fermentação pelo açúcar (KUNKEE & AMERINE, 1970).

Quando uma levedura é aerada numa solução tampão contendo glicose, ocorre inibição da glicólise pelo oxigênio, o chamado efeito Pasteur. A taxa de formação de etanol é pequena porque a glicose é oxidada quase completamente para dióxido de carbono e água (Pasteur**, citado por MARKHAM, 1969). No entanto, foi observado, que leveduras em meio contendo glicose consomem oxigênio a taxas muito baixas enquanto a glicose está em alta concentração. A taxa de consumo de oxigênio aumenta somente quando a glicose é quase toda utilizada. O crescimento, entretanto, ocorre como se a levedura estivesse sob condições anaeróbicas (SWANSON & CLIFTON, 1948). Similarmente, levedura de padaria crescendo sob condições de laboratório fermentam 80,00% do açúcar para etanol apesar da aeração vigorosa (LEMOIGNE *et alii*, 1954). Este efeito foi chamado de contra-Pasteur (Slonimski***, citado por MARKHAM, 1969). As

*SCHANDERL, J.M. *In Mikrobiologie des Mostes and Weines*. 2ª edição. Stuttgart, Verlag E. Ulmer, 1959.

**PASTEUR, L. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 52:1260, 1861.

***SLONIMSKI, P.P. *Society Chemistry Industry, Monograph* nº 3:7, 1959.

relações entre taxa de síntese das enzimas respiratórias e taxa de fermentação foram mostradas por Ephrussi *et alii**, citados por MARKHAN (1969), que cresceram levedura num meio sintético contendo 3,00% de glicose. A partir do início do crescimento, a capacidade respiratória caiu a um valor mínimo na fase de crescimento exponencial tardia. A capacidade respiratória então aumentou e atingiu seu valor original um pouco antes do crescimento ter cessado completamente. A capacidade fermentativa variou de uma maneira recíproca. Medidas espectroscópicas mostraram que a quantidade de citocromos caiu à medida que o crescimento se procedeu e aumentou novamente em direção ao final do crescimento. Estes foram mostrados serem devidos às diferenças nas taxas de síntese das enzimas respiratórias e de proteína total. Assim, leveduras crescendo sob condições de aeração num meio com glicose não sintetiza rapidamente suas enzimas respiratórias. A maioria da energia para crescimento vem da glicólise. Em célula fermentando rapidamente a concentrações de açúcar mais altas, um posterior efeito retroinibidor sobre a cadeia glicolítica pode ser esperado devido à inibição pelo produto. Este causaria um decréscimo do nível de energia que poderia resultar numa redução da ati-

*EPHRUSSI, B.; SLONIMSKI, P.P.; YOTSOYANAGI, Y.; TAVLITIZKI, J. *Compt. Rend. Trav. Laboratoires Carlsberg Ser. Physiol.*, 26:87-107, 1956.

vidade metabólica causando a morte da célula (NAGODAWITHANA *et alii*, 1974).

O efeito contra-Pasteur descreve uma condição durante o crescimento. É um aspecto do chamado "*efeito da glicose*", e mais recentemente chamado de repressão catabólica (MAGSANIK, 1961). A concentrações de glicose acima de 3,00%, mecanismos celulares para a formação de ácidos nucleicos e proteínas, por exemplo, são saturados. Consequentemente, a célula torna-se rica em ATP e intermediários como o piruvato. As células, entretanto, não têm necessidade de derivar qualquer energia extra a partir do ciclo do ácido cítrico (TCA) e, para impedir gasto desnecessário de energia, a biossíntese das enzimas respiratórias é reprimida. Outros carboidratos relacionados à glicose, por exemplo ácido glucônico, manitol ou galactose, podem ter efeitos semelhantes. Maltose a 2,00% mostra pouco deste efeito (Görts*, citado por MARKHAM, 1969), mas a concentrações mais altas, pode ser que ela cause repressão catabólica (MARKHAM, 1969).

Em culturas descontínuas, o resultado primário da inibição do crescimento pelo substrato é um aumento da fase lag de crescimento. Entretanto, na ausência de morte do organismo, o substrato eventualmente será metabolizado. Este não

*GORTS, C.P.M. *Antonie van Leeuwenhoek. Journal Microbiology Serology*, 33:451, 1967.

é o caso em culturas contínuas onde altas concentrações de substrato podem resultar num processo de instabilidade com morte das células. (ANDREWS, 1968).

Foi verificado que *Saccharomyces cerevisiae* utiliza menos glicose a concentrações mais altas de açúcar, e que, a concentração de glicose na qual inibição torna-se evidente é aproximadamente a mesma que causa plasmólise das células. Foi inferido então que as inibições pelo açúcar observadas são devidas, pelo menos em parte, ao fenômeno osmótico. No entanto, é possível que açúcares exerçam outros efeitos, que não osmótico, sobre as células de leveduras (GRAY, 1945). É possível aumentar a tolerância ao açúcar pela levedura por um processo de aclimatização envolvendo transferência serial da levedura para meio fresco contendo concentrações de glicose mais altas (20,00%). Foi encontrado, entretanto, que enquanto a tolerância à glicose de tais leveduras aclimatizadas era aumentada, a tolerância ao etanol era diminuída (GRAY, 1946). Esta observação foi inesperada, visto que, previamente GRAY (1945) encontrou que uma levedura que tinha alta tolerância ao açúcar, normalmente exibia alta tolerância ao etanol. BENÍTEZ *et alii* (1983) também observaram que algumas espécies de *Saccharomyces* tolerantes à sacarose apresentaram tolerância ao etanol, mas ressaltaram que isto não implica numa correlação geral entre os dois fenótipos. Mais tarde GRAY (1948) obser-

vou que culturas de *Saccharomyces cerevisiae* aclimatizadas, as quais eram menos tolerantes ao etanol e mais tolerantes ao açúcar do que culturas não aclimatizadas, estocam maiores quantidades de ácidos graxos. Uma adaptação das células de leveduras à altas concentrações de glicose também foi sugerida por WADA *et alii* (1981). Estes autores encontraram que a atividade de produção de etanol, taxa de crescimento e viabilidade celular de espécies de *Saccharomyces* foram reduzidas pelo aumento da concentração de glicose inicial de 10,00% para 25,00%. Entretanto, o efeito inibitório da glicose foi reduzido pelo aumento passo a passo do açúcar no meio. Similarmente NAGODAWITHANA *et alii* (1974) observaram que, em fermentações rápidas com *Saccharomyces cerevisiae* sob condições anaeróbicas, adicionando 25,00% de açúcar (solução de mel) em incrementos de 2,50%, 5,00% ou mesmo 15,00% inicialmente com 10,00% após 1 h, resultou em viabilidades melhoradas comparadas com aquela observada na fermentação iniciada com 25,00% de açúcar tanto a 30°C como a 15°C. Eles sugeriram que as concentrações mais altas de açúcar, inibição pelo substrato pode afetar a taxa de glicólise, da qual as células dependem para seus requerimentos energéticos, restringindo o suprimento de energia para a sobrevivência das células. Esta deficiência energética poderia ultimamente causar a morte das células.

Concentrações de glicose mais altas que 5,00% afetam a taxa de produção de etanol de *Saccharomyces cerevisiae* e

Saccharomyces sakē significativamente, mas esta inibição é menos acentuada comparada àquela causada pelo etanol (CIFTCI *et alii*, 1983). Em concentrações acima de 10,00%, glicose torna-se inibitória à atividade fermentativa destas leveduras (CIFTCI *et alii*, 1983) bem como de *Candida pseudotropicalis* (MOULIN *et alii*, 1980). Assim, se se deseja concentrações finais de etanol mais altas que 6,00% (v/v) é necessário adição de glicose durante a fermentação (CIFTCI *et alii*, 1983). Se a concentração inicial de glicose é 30,00% ou 40,00%, a produtividade específica inicial de etanol de *Saccharomyces cerevisiae* *Saccharomyces sakē* é somente 75,00% ou 50,00% da produtividade específica sem inibição pelo substrato, respectivamente (CIFTCI *et alii*, 1983). No entanto, lactose, mesmo a altas concentrações como 25,00%, não apresenta qualquer efeito inibitório da atividade fermentativa de *Candida pseudotropicalis* (MOULIN *et alii*, 1980). A lactose, sendo um dissacarídeo, em solução, tem metade do poder osmótico da glicose para o mesmo peso/volume. Admitindo que o poder osmótico é responsável pela inibição, deve ser normal encontrar inibição mais forte pela glicose a baixas concentrações do que lactose (MOULIN *et alii*, 1980). Em *Saccharomyces carlsbergensis* um aumento na concentração de glicose até 10,00% resultou num aumento do crescimento e da produtividade de etanol das células imobilizadas. Mas com glicose acima de 10,00% ambos parâmetros diminuíram (WADA *et alii*, 1980). Em *Saccharomyces cerevisiae* concentrações de glicose de

40,00% e 50,00% foram inibitórias para células livres em suspensão as quais mostraram pouca ou nenhuma fermentação. Com 30,00% de glicose houve menor inibição da fermentação, enquanto que, com 20,00% e 10,00%, a fermentação alcoólica procedeu a taxas mais rápidas (HOLCBERG & MARGALITH, 1981). Várias espécies de *Saccharomyces* utilizadas na fabricação de vinhos foram altamente fermentativas em 50,00% de sacarose, sendo que algumas delas utilizaram efetivamente o carboidrato da cultura produzindo concentrações finais de etanol maiores que 14,00% (v/v) (BENÍTEZ *et alii*, 1983). Uma linhagem de laboratório de *Saccharomyces cerevisiae* não cresceu na concentração de 60,00% de sacarose, e com 40,00% deste açúcar, crescimento não exponencial foi observado (BENÍTEZ *et alii*, 1983). Resultados semelhantes foram relatados para glicose quando uma linhagem diferente de *Saccharomyces cerevisiae* foi usada (Strehaiano *et alii**, citados por BENÍTEZ *et alii*, 1983).

Estudos cinéticos da produção de etanol por *Zymomonas mobilis* a altas concentrações de glicose mostraram que a produção de etanol permaneceu quase inalterada pelas concentrações iniciais de glicose até aproximadamente 20,00% e declinou com concentrações acima desta. Cerca de 92,00%, 89,00% e 87,00% dos açúcares foram utilizados com concentrações iniciais

*STREHAIANO, P.; MORENO, M.; GOMA, G. *C.R. Academic Science*, 286:225-228, 1978.

de glicose de 20,00%, 25,00% e 30,00% respectivamente (ROGERS *et alii*, 1979). LEE *et alii* (1979), no entanto, observaram condições estáveis de produção de etanol por *Zymomonas mobilis* com 10,00% de glicose, sendo que, com 15,00% e 20,00%, a glicose não foi completamente metabolizada verificando-se oscilação da fermentação. ROGERS *et alii* (1979) e LEE *et alii* (1979) relataram ainda diminuição na produção do crescimento de *Zymomonas mobilis* com o aumento nas concentrações iniciais de glicose em culturas contínuas e descontínuas. Resultados semelhantes foram relatados por BELAICH *et alii* (1972). Como discutido por STOUTHAMER & BETTEHAUSEN (1973), estas mudanças são provavelmente resultantes das mudanças no consumo de energia para a manutenção das células, ou devido à alteração na permeabilidade celular e influência sobre a atividade funcional da célula pela alta concentração de substrato (EDWARDS, 1970). As taxas de crescimento e produção de células de *Zymomonas mobilis* em meio contendo 25,00% de frutose foram significativamente reduzidas embora outros parâmetros cinéticos tenham sido semelhantes àqueles relatados para fermentações de glicose. Com 10,00% e 15,00% de sacarose as maiores diferenças foram uma redução na produção de etanol e uma concentração de etanol mais baixa (LEE, K.J. *et alii*, 1981). Com *Zymomonas anaerobia* um aumento da concentração de glicose para 5,00% foi acompanhado por um aumento linear na concentração de biomassa. Em maiores concentra

ções a glicose teve efeitos inibitórios sobre o crescimento celular e este efeito foi mais acentuado com 20,00%, 25,00% e 30,00%. Com 35,00% de glicose o crescimento foi baixo e a produção de biomassa muito pobre, enquanto nenhum crescimento foi observado quando o meio continha 40,00% de glicose. A taxa específica de crescimento diminuiu com o aumento de glicose até 30,00%. A concentrações mais baixas que 20,00%, glicose foi toda utilizada, e o coeficiente de produção foi muito alto quando a concentração de glicose variou de 5,00% a 30,00%. Este coeficiente não foi apreciavelmente afetado quando a concentração de glicose foi abaixo de 25,00%. Produtividade volumétrica de etanol aumentou com o aumento do açúcar até 15,00% e com glicose acima de 20,00% nenhum aumento na concentração de etanol foi obtido. (KOSARIC *et alii*, 1982).

Estudos dos efeitos da concentração do açúcar inulina obtido de extrato de *Heliantus tuberosus* sobre a produção de etanol por *Kluyveromyces marxianus* mostraram que os coeficientes de produção de etanol são quase idênticos a concentrações iniciais do açúcar até 25,00%, enquanto que acima desta concentração, o coeficiente começa a declinar. Por outro lado, o crescimento celular diminui acentuadamente com o aumento da concentração inicial do açúcar (MARGARITIS & BAJPAI, 1983). Não consta na literatura dados sobre como a concentração do açúcar inulina afeta a cinética de crescimento e produção de etanol por *Kluyveromyces marxianus* (MARGARITIS & BAJPAI,

1983).

Em hidrolizado de celulose, *Saccharomyces cerevisiae* apresentou taxas específicas de crescimento diminuídas com o aumento da concentração de açúcares redutores totais tanto sob condições aeróbicas como anaeróbicas. O mesmo ocorreu com as taxas máximas de formação de etanol em anaerobiose. Com hidrolizado de celulose, o grau de inibição é mais alto do que com açúcar puro (glicose). Isto pode ser devido à presença de açúcares no hidrolizado que não passam por fermentação tais como: xilose, celobiose e celodextrinas maiores (GHOSE & TYAGI, 1979b). Os efeitos de concentrações variadas de xilose (5,50% a 25,50%) foram avaliadas para as células da levedura *Pachysolen tannophilus*. Foi observado, que a taxa específica de crescimento, taxa específica máxima de produção de etanol e produção total de etanol declinaram à medida em que a concentração de xilose foi aumentada. Entretanto, o valor da taxa específica máxima de consumo de xilose permaneceu relativamente independente da sua concentração inicial. A interferência das concentrações de xilose excedendo 5,00% sobre o crescimento e produção de etanol foi evidente. (SLININGER *et alii*, 1982).

A fermentação de melaço de cana a 30,00% de açúcares redutores totais por células imobilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* pode ser completa dentro de 12 h. Mas a pro-

produtividade máxima foi atingida num período de 2,86 h usando melaço contendo 19,70% de açúcares redutores a 30°C, com uma conversão de açúcar para etanol de 94% do teórico (GHOSE & BANDYOPADYAY, 1980). O teor de sais, gomas, proteínas, etc...do melaço aumentam sua concentração quando a quantidade de água adicionada ao processo é pequena resultando assim em alto teor de matéria seca. Particularmente o conteúdo de sais do melaço ocasiona uma alta pressão osmótica (HARALDSON & BJORLING, 1981). Uma alta concentração destes materiais no líquido promovem alterações no metabolismo da levedura (HARALDSON & ROSEN, 1982). Diferentes linhagens de espécies de *Saccharomyces* e *Schizosaccharomyces pombe* foram testadas em melaço de cana contendo 30,00°, 40,00° e 50,00° Brix. A produtividade de etanol diminuiu com o aumento da concentração de substrato, e as linhagens mostraram grandes diferenças especialmente em melaço a 50,00° Brix. Com esta concentração de substrato um aumento de 10 vezes na produtividades foi atingido pela escolha de uma linhagem de levedura apropriada, a qual foi capaz de fermentar a uma concentração de 40,00% de substância seca. Com 25,00% e 30,00% de matéria seca a produtividade foi cerca de 50% maior (HARALDSON & BJORLING, 1981). Duas das melhores linhagens, uma de *Saccharomyces cerevisiae* e uma de *Schizosaccharomyces pombe*, selecionadas neste estudo, mostraram alta produção de etanol e sustentaram crescimento contínuo a concentrações de substância seca variando até 20,00% (HARALDSON & ROSEN, 1982).

Foi demonstrado que durante a fermentação alcoólica por leveduras, um aumento na concentração de substrato geralmente resulta em aumento da atividade metabólica e, conseqüentemente, num aumento da taxa de respiração (SOLS *et alii*, 1971). Entretanto, a concentrações muito altas de soluto, o efeito de pressão osmótica sobre as células torna-se pronunciado e uma diminuição no metabolismo é observado. Em *Saccharomyces uvarum* (*carlsbergensis*) um aumento na concentração de sacarose até 25,00% aumentou a taxa de respiração, mas um posterior aumento para 40,00% do açúcar reduziu a taxa de respiração em 60,00% comparada com aquela observada a 25,00% de sacarose. Esta redução na taxa de respiração resulta numa redução no metabolismo total e, conseqüentemente, reduz a utilização de substrato, bem como a produção de etanol pelas células de leveduras. Quando esta levedura foi crescida na presença de concentrações variadas de sorbitol, um açúcar não metabolizado pela levedura, foi observado que nos estágios iniciais de fermentação, com o aumento da pressão osmótica, a proporção de etanol intra e extracelular aumentou consideravelmente. Durante o curso da fermentação, entretanto, esta proporção diminuiu rapidamente. Com pressões osmóticas mais baixas (menos sorbitol), um efeito semelhante foi observado, embora o efluxo de etanol tenha sido mais rápido inicialmente, e subseqüentemente mais lento devido a maioria do etanol ter se difundido. No meio sem nenhum sorbitol, as concentrações de et

no^l obtidas foram maiores do que aquelas obtidas com maiores pressões osmóticas; presumivelmente, devido à inibição da utilização de substrato. Embora a produção de etanol fosse inibida em certo grau no meio com alta osmolaridade, mais etanol foi retido intracelularmente por um tempo maior do que no caso das células crescidas em meio com baixa osmolaridade. Esta retenção de etanol dentro das células causou um efeito detrimental sobre a viabilidade celular. Assim, é importante para a indústria de fermentação investigar os efeitos de altas pressões osmóticas sobre linhagens fermentativas, pois a inativação das células em m^ostos, podem ser devidas às concentrações de etanol intracelulares elevadas melhor do que de etanol extracelular ou de deficiência de nutrientes (PANCHAL & STEWART, 1980).

2.3. Efeitos da temperatura

Para se obter produção máxima de etanol, a temperatura é um fator importante de ser considerado devido tanto aos seus efeitos diretos sobre a atividade da levedura, como aos seus efeitos indiretos, tal como a perda de etanol por evaporação (KUNKEE & AMERINE, 1970). A temperatura afeta todos os aspectos de crescimento, metabolismo, viabilidade e fermentabilidade das leveduras (MCCRACKEN & GONG, 1982). Como no caso de muitos outros organismos, todas as espécies de levedu

ras têm uma variação de temperatura para crescimento relativamente limitada (MCCRACKEN & GONG, 1982).

Muitas leveduras fermentam carboidratos numa temperatura que está acima da temperatura máxima para crescimento (MCCRACKEN & GONG, 1982). Leveduras usadas na fabricação de cervejas fermentam açúcares na variação de 0°C a 43°C, embora a temperatura máxima de crescimento para estas seja 37°C (Slator* e Kroewel & Braber**, citados por MCCRACKEN & GONG, 1982). Similarmente, *Candida gelida* P₁₆ cresce mais rapidamente a 15°C mas fermenta glicose melhor a 25°C (SINCLAIR & STOKES, 1965). Por outro lado, leveduras de destilarias têm temperaturas máximas de crescimento de 35°C mas exibem uma taxa de produção máxima de etanol a 25°C (Merrit***, citado por MCCRACKEN & GONG, 1982). *Candida sp* HT₄ é reconhecida como uma levedura termotolerante, devido apresentar bom crescimento numa variação de temperatura entre 30°C e 45°C (MCCRACKEN & GONG, 1982). Desde que as leveduras em geral fermentam carboidratos a temperaturas mais altas do que suas temperaturas máximas de crescimento, não é surpreendente que *Candida sp* HT₄ pode fermentar D-glicose a 50°C mas não pode crescer nesta tem-

*SLATOR, A. *Journal Chemistry Society*, 89:128-142, 1960.

**KROWEL, P.G.; BRABER, L. *Biotechnology Letters*, 1(10):403-408, 1979.

***MERRIT, N.R. *Journal of the Institute of Brewing*, 72:374-383, 1966.

peratura (MCCRACKEN & GONG, 1982). *Saccharomyces uvarum inu-lyticus* var. nova, produziu 21,60%, 20,00%, 18,60% e 9,80% (v/v) de etanol a 15°C, 20°C, 30°C e 40°C, respectivamente quando a fermentação foi feita por adição passo a passo de sacarose ao meio sintético. Este variante apresenta bom crescimento a 40°C (FLOR & HAYASHIDA, 1983). Os benefícios que poderiam ser ganhos pelo uso de leveduras termotolerantes nas fermentações a altas temperaturas são: simplificação de problemas de resfriamento durante as fermentações, taxas mais altas de consumo de açúcar e formação do produto, redução da contaminação por leveduras mesofílicas e bactérias e facilidade de recuperação do etanol.

O aumento da temperatura conduz a um aumento da atividade metabólica e, conseqüentemente, a produção do etanol é mais rápida (NAGODAWITHANA *et alii*, 1974; NAGODAWITHANA & STEINKRAUS, 1976; NAVARRO & DURAND, 1978; WILLIAMS & MUNNECKE, 1981; KOSARIC *et alii*, 1982 e SLININGER *et alii*, 1982). Mas muitos fenômenos são consequência do aumento da atividade metabólica juntamente com a temperatura. Acima de 30°C, o processo de brotamento das leveduras é significativamente afetado e o crescimento cai rapidamente (RICHARDS, 1928a e b). O tempo da fase lag de crescimento no mosto tem sido mostrada ser inversamente proporcional à temperatura, sendo que o coeficiente de proporcionalidade necessitaria ser determinado em

piricamente para cada m $\ddot{o}$ sto (Ough & Amerine*, citados por KUNKEE & AMERINE, 1970). S $\ddot{a}$ o poucas as informa $\tilde{c}$ oes a cerca do efeito da temperatura sobre a taxa de crescimento de levedura no m $\ddot{o}$ sto, embora a partir de estudos metab $\ddot{o}$ licos com leveduras seja esperado que a taxa de crescimento deva, aproximadamente, duplicar para cada aumento de 10 $^{\circ}$ C (KUNKEE & AMERINE, 1970). Ough**, citado por KUNKEE & AMERINE (1970), encontrou um aumento de 4,7 vezes na taxa de crescimento de leveduras entre 10 $^{\circ}$ C e 21 $^{\circ}$ C, mas um aumento na taxa de fermenta $\tilde{c}$ ao de cerca de duas vezes. Foi encontrado que quando a temperatura é alterada, pode ocorrer uma mudan $\tilde{c}$ a nos requerimentos para fatores de crescimento como vitaminas (HAUKELI & LIE, 1977).

A temperaturas de incuba $\tilde{c}$ ao de 32 $^{\circ}$ C e mais altas *Saccharomyces cerevisae* Steinberg(618) n $\ddot{a}$ o atingiu altas concentra $\tilde{c}$ oes de etanol como o fez a temperaturas mais baixas (STEINKRAUS & MORSE, 1966). Num sistema de c $\acute{e}$ lulas de leveduras imobilizadas foi verificado que o aumento da temperatura de 30 $^{\circ}$ C para 39 $^{\circ}$ C resultou em menor crescimento, mas a produtividade de etanol foi aumentada (KROWEL, 1979). No entanto tamb $\acute{e}$ m foi mostrado que a produtividade de etanol de esp $\acute{e}$ cies de *Saccharomyces* e *Schizosaccharomyces pombe*, n $\ddot{a}$ o $\acute{e}$ significativamente afetada pela temperatura numa varia $\tilde{c}$ ao de 32 $^{\circ}$ C a 45 $^{\circ}$ C, e que, a concentra $\tilde{c}$ ao final de etanol ap $\ddot{o}$ s 24 h diminui com o aumento da temperatura (HARALDSON & BJORLING, 1981). Foi observado que a taxa de produ $\tilde{c}$ ao de etanol bem co-

*OUGH, C.S.; AMERINE, M.A. *Bulletin California Agricultural Experimental Station*, 827:1, 1966.

**OUGH, C.S. *Am. J. Enol. Viticult.*, 17:74, 1986.

mo a de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* aumentaram com o aumento da temperatura até 42°C. Nesta temperatura, entre tanto, o crescimento cessou, muito embora a produção de etanol tenha continuado. Com células imobilizadas, houve um aumento direto na produção de etanol até aproximadamente 30°C, e então, começou a cair com posterior aumento da temperatura (WILLIAMS & MUNNECKE, 1981). Com a levedura *Pachysolen tannophilus*, foi verificado que para culturas crescidas, em xilose, em temperaturas até 32°C, as taxas específicas máximas de cres cimento, de produção de etanol e produção total de etanol, aumentaram com o aumento da temperatura. Entretanto, na cultura crescida a 40°C, verificou-se não haver consumo de xilose, e somente duas duplicações da biomassa inicial foram observadas. (SLININGER *et alii*, 1982). Foi verificado, que a produção de biomassa de *Saccharomyces carlsbergensis* é inversamente pro porcional à temperatura (NAVARRO & DURAND, 1978). Com a bactéria *Zymomonas anaerobia* numa variação de temperatura entre 28°C e 36°C, as concentrações máximas de biomassa foram da mesma or dem de magnitude, e, a 38°C, a produção de biomassa declinou rapidamente. A temperaturas até 36°C, a glicose foi quase com pletamente utilizada, enquanto 20,00% da mesma não foi consumida a 38°C. As dinâmicas da biossíntese de etanol como uma fun ção da temperatura seguiu o padrão da produção de biomassa. A taxa de biossíntese de etanol foi aproximadamente a mesma a 34°C, 35°C e 36°C, enquanto a temperaturas mais baixas (32°C

e 28°C) as taxas foram menores à medida que a temperatura diminuiu. Entretanto, cerca do mesmo nível de etanol foi atingido para todas as temperaturas acima (KOSARIC *et alii*, 1982). Foi observado que a taxa de fermentação inicial de *Candida sp* HT₄ aumentou com o aumento da temperatura. Entretanto, a 50°C ocorreu diminuição na taxa de fermentação após uma taxa rápida inicial, devido, provavelmente, ao dano térmico matar as células da levedura resultando na diminuição da densidade de células viáveis (MCCRACKEN & GONG, 1982). A produtividade de etanol de *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-11572 e *Saccharomyces saké* aumenta acentuadamente entre 30°C e 35°C, sendo o aumento menos pronunciado entre 35°C e 42°C do que entre 30°C e 35°C. A produtividade de etanol atingiu um máximo entre 40°C e 42°C, ocorrendo diminuição significativa acima de 45°C. (CIFTCI *et alii*, 1983).

Quando *Saccharomyces cerevisiae* foi usada para fermentar soluções de mel a 25,00° Brix, sob condições anaeróbicas a 30°C, a concentração de etanol atingiu 9,50% (p/v) em 3 h; mas alta mortalidade celular foi observada. Quando a temperatura de fermentação foi diminuída para 15°C, embora tenha sido requerido 6 h para atingir os mesmos 9,50% (p/v) de etanol, melhoramento substancial da viabilidade foi obtido (NAGODAWITHANA *et alii*, 1974 e NAGODAWITHANA & STEINKRAUS, 1976). Com leveduras imobilizadas, KROWEL (1979) também observou que a temperaturas acima de 39.6°C a morte das células torna-se pre

dominante. NAGODAWITHANA *et alii* (1974) ressaltaram que a temperaturas mais altas, em decorrência da atividade metabólica mais alta, os requerimentos energéticos podem ser maiores, e, a energia derivada da glicólise pode não ser suficiente para manter as células vivas. O efeito letal da temperatura não pode ser atribuído exclusivamente ao aquecimento, visto que, Jacob *et alii**, citados por KUNKEE & AMERINE (1970), encontraram que uma temperatura de 55°C por um minuto foi insuficiente para matar leveduras do vinho. Indubitavelmente a presença de inibidores no mosto contribuem para o efeito letal de aquecimento. Alguns enologistas acreditam que substâncias tóxicas são produzidas em altas temperaturas. Vinhos finos, especialmente vinhos brancos, são produzidos a baixas temperaturas. Muitas explicações para isto têm sido fornecidas (Ough & Amerine** e Amerine *et alii****, citados por KUNKEE & AMERINE, 1970). Parte do efeito pode ser devido à quantidade e tipos de produtos secundários formados pelas leveduras a várias temperaturas (KUNKEE & AMERINE, 1970).

*JACOB, F.C.; ARCHER, T.E.; CASTOR, J.G.B. *Am. J. Enol. Vitic*, 15:69-74, 1964.

**OUGH, C.S.; AMERINE, M.A. *Bulletin California Agricultural Experimental Station*, 827:1, 1966.

***AMERINE, M.A.; BERG, H.W.; CRUESS, W.V. *The Technology of Wine Making*. 2ª edição. Connecticut, Westport, Avi. Publ., 1967.

Tem sido demonstrado que com o aumento da temperatura intensificam-se os efeitos inibitórios do etanol. Tem-se verificado haver íntima relação entre temperatura e concentração de etanol adicionado com respeito à inibição da fermentação, do crescimento e do aumento da morte celular. Por exemplo, GRAY (1941) verificou que o aumento da temperatura é acompanhado por uma diminuição da tolerância ao etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. Reproduzindo as condições empregadas por GRAY (1941), TROYER (1953) encontrou que o aumento da temperatura de 30°C para 35°C resultou na formação de menos células mesmo na ausência de etanol; mas, na presença deste, a inibição foi mais forte. De acordo com Van Uden & Duarte*, citados por CASEY *et alii* (1984) o etanol diminui as temperaturas ótima e máxima para crescimento. A aparente eficácia do etanol a temperaturas acima da ótima (28°C) pode ser explicada parcialmente pelas taxas de multiplicação diminuídas que ocorre somente como um resultado do aumento da temperatura, e talvez parcialmente por uma mudança no equilíbrio de reação crítica envolvendo o etanol (TROYER, 1953). De acordo com Schanderl**, citado por HO (1980), na ausência de eta-

*VAN UDEN, N.; DUARTE, H. *Zeitschrift fuer Allgemeine Mikrobiologie*, 21:743-750, 1981.

**SCHANDERL, J.M. *In Mikrobiologie des Mostes and Weines*. 2.^a edição. Stuttgart, Verlag. E. Ulmer, 1959.

nol, 15,00% das células sobrevivem aquecendo por um minuto a 50°C, enquanto a 6,00% e 15,00% (p/v) de etanol, respectivamente, somente 0,28% e 0,05% das células sobrevivem. A mesma relação tem sido verificada entre temperatura e etanol produzido. Muller-Thurgau, citado por GRAY (1941), encontrou que a fermentação de uma linhagem de levedura parou a 36°C, 27°C, 18°C e 9°C quando o conteúdo de etanol era, respectivamente, 3,80%, 7,50%, 8,80% e 9,50% (p/v). Trabalhando com *Saccharomyces carlsbergensis*, NAVARRO & DURAND (1978) verificaram que o crescimento celular cessa a 10°C, 20°C e 30°C quando o conteúdo de etanol era, respectivamente, 3,50%, 2,50% e 1,30% (p/v). Estudando o efeito da temperatura sobre a cinética de produção de etanol por leveduras numa gama de 25°C a 43°C, LEE *et alii* (1980) encontraram que até 37°C os efeitos inibitórios de etanol sobre o crescimento e produção de etanol não foram afetados pela temperatura. Porém, acima desta, a inibição aumentou significativamente. Na tentativa de explicar os efeitos inibitórios mais intensos do etanol produzido a temperaturas mais altas, alguns autores analisaram o conteúdo de etanol intracelular a várias temperaturas. NAGODAWITHANA & STEINKRAUS (1976) encontraram que usando $8,00 \times 10^8$ células/ml de *Saccharomyces cerevisiae* para fermentar soluções de mel com 25,00° Brix a 30°C, a concentração de etanol intracelular atingiu aproximadamente 2×10^{11} moléculas/célula (12,20% p/v) nos pri-

meios 30 minutos de fermentação. Após 3 h de fermentação o conteúdo de etanol intracelular foi de 9,50% (p/v), e a taxa de morte das células durante este período foi essencialmente logarítmica. Na temperatura de 15°C, a concentração de etanol intracelular atingiu um nível de aproximadamente 4×10^{10} moléculas/célula. A concentração de 9,50% (p/v) de etanol extracelular foi atingida em 6 h, e a viabilidade celular foi mantida alta. NAVARRO & DURAND (1978) por sua vez, verificaram que em *Saccharomyces carlsbergensis* o acúmulo de etanol intracelular passa por um máximo correspondente à 10,00%, 17,00% e 30,00% (p/v) nas fermentações conduzidas a 10°C, 20°C e 30°C, respectivamente. Ao mesmo tempo, as concentrações de etanol extracelular foram de 3,50%, 2,50% e 1,30% (p/v). As concentrações máximas de etanol intracelular precederam a parada do crescimento celular e a diminuição da taxa de fermentação. Assim, em temperaturas mais altas, a taxa de produção de etanol é mais rápida que a taxa de sua excreção, verificando-se altas concentrações de etanol intracelularmente que contribuem para os efeitos inibitórios mais acentuados do etanol a altas temperaturas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material biológico

Foram utilizadas duas leveduras que atualmente vêm sendo empregadas nas destilarias de álcool brasileiras. A Fleischmann, é um fermento de panificação que acredita-se seja a mais usada para a fermentação alcoólica no Brasil. A linhagem M300A é um híbrido entre as leveduras IZ 671 e IZ 672 (ambas *Saccharomyces cerevisiae*) obtido no Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brasil.

3.2. Meios de cultivo

3.2.1. Meio completo para leveduras - meio de composi
ção não definida (MORTIMER & HAWTHORNE, 1969),
usado para o preparo dos inóculos de multipli-
cação.

Extrato de leveduras	10,00 g
Peptona.	20,00 g
Glicose.	20,00 g
Ágar (quando sólido)	20,00 g
Água destilada até	1000,00 ml

O pH foi ajustado para 6,00 com NaOH 10,00% ou
HCl 1,00 N. O meio foi autoclavado a 1,00 atm de pressão por
15 minutos.

3.2.2. Meios de multiplicação

Para a produção dos inóculos dos testes de fer
mentação foi utilizado melaço de cana a 2,00% de açúcares re-
dutores totais (ART) com 10 ml de solução de sais (Ítem 3.3.1.)
por litro de meio.

O pH foi ajustado para 6,00 com NaOH 10,00% ou
H₂SO₄ concentrado. O meio foi autoclavado a 0,50 atm de pres
são por 30 minutos.

Este mesmo meio mais concentrado (30,00% de ART),
foi utilizado para alimentação das células durante o processo

de multiplicação.

3.2.3. Meios de fermentação

Para os testes de fermentação foram utilizados os seguintes meios:

- Misturas de melaço e xarope de cana diluídas para conter 12,00%, 16,00% e 20,00% de açúcares redutores totais com 10 ml de solução de sais por litro de meio. A quantidade de melaço nos três meios foi suficiente para fornecer 5,00% do total em açúcares redutores totais.

O pH foi ajustado para 4,30 com NaOH 10,00% ou H_2SO_4 concentrado. Os meios foram autoclavados a 0,50 atm de pressão por 30 minutos.

Após preparados e autoclavados os meios continham 12,30% (14,60° Brix), 16,50% (19,00° Brix) e 20,60% (23,10° Brix) de açúcares redutores totais.

- Misturas de melaço e xarope de cana diluídas para conter 11,00% de açúcares redutores totais com 10 ml de solução de sais por litro de meio sem e com sorbitol nas concentrações de 15,00%, 20,00%, 25,00% e 30,00%. Após preparados e autoclavados os meios apresentaram 13,40°, 25,80°, 29,80°, 33,30° e 37,00° Brix respectivamente.

O pH foi ajustado para 4,30% com NaOH a 10,00% ou H_2SO_4 concentrado. Os meios foram autoclavados a 0,50 atm de pressão por 30 minutos.

3.3. Soluções e reagentes

3.3.1. Solução de sais para os meios de multiplicação e fermentação

Sulfato de amônio.	50,00 g
Fosfato monobásico de potássio	20,00 g
Sulfato de magnésio.	10,00 g
Sulfato de zinco	1,00 g
Sulfato de manganês.	1,00 g
Água destilada até	1000,00 ml

3.3.2. Solução de sais Ringer(LEE, S.S. *et alii*,1981), solução usada para diluição das amostras

Cloreto de sódio	9,00 g
Cloreto de potássio.	0,42 g
Cloreto de cálcio (6 H_2O).	0,48 g
Carbonato de sódio	0,20 g
Água destilada até	1000,00 ml

A solução foi esterilizada por autoclavagem a 1,00 atm de pressão por 15 minutos.

3.3.3. Solução corante (LEE, S.S. *et alii*, 1981). Solução usada para determinação da viabilidade celular

Cloreto de sódio	9,00 g
Cloreto de potássio.	0,42 g
Cloreto de cálcio (6 H ₂ O).	0,48 g
Carbonato de sódio	0,20 g
Glicose.	10,00 g
Azul de metileno	0,25 g
Água destilada até	1000,00 ml

Nesta solução, as células mortas tomam coloração azul, enquanto as células vivas permanecem não coradas.

3.3.4. Reativo de Somogyi (AMORIM *et alii*, 1982)

Foram dissolvidas 28,00 g de fosfato de sódio dibásico e 40,00 g de tartarato duplo de sódio e potássio em 700,00 ml de água destilada seguindo-se a adição de 100,00 ml de hidróxido de sódio 1N. Foram gotejadas 80,00 ml de sulfato de cobre a 10,00% sob agitação constante. Acrescentou-se 180,00 g de sulfato de sódio e o volume foi completado para um litro. Foi deixado em repouso, filtrado e conservado em recipiente escuro à temperatura ambiente.

3.3.5. Reativo de Nelson (AMORIM *et alii*, 1982)

Foram dissolvidas 25,00 g de molibdato de amônio em 450,00 ml de água destilada. Cuidadosamente adicionou-se 25,00 ml de ácido sulfúrico gota a gota com agitação constante. Foram acrescentadas 3,00 g de arseniato de sódio dissolvidas em 25,00 ml de água. Foi mantido a 35°C no escuro por 48 h.

3.4. Determinação de açúcares redutores totais no m^osto - Segundo método de Somogyi e Nelson, adaptado por AMORIM *et alii* (1982)

Transferiu-se 5,00 ml do m^osto para balão volumétrico de 250 ml e o volume foi completado com água destilada. Após agitação, foram adicionadas 0,20 g de oxalato de sódio e a mistura foi novamente agitada. A esta foram acrescentadas 0,50 a 1,00 g de Celite ou Kieselgur. Após agitação por 3 minutos a mistura foi filtrada em papel de filtro desprezando-se os primeiros 20,00 - 25,00 ml.

Transferiu-se 5,00 ml do filtrado para balão volumétrico de 200 ml, e 10,00 ml de ácido clorídrico 0,75 N foram adicionados gota a gota com agitação constante. Foi deixado em banho-maria a 60°C por 30 minutos. Após esfriamento até a temperatura ambiente, foram adicionados 10,00 ml de hidróxido de sódio 0,75 N e o volume foi completado com água destilada.

.48.

Tubos de ensaio foram numerados de 1 a 6 e em cada tubo foi adicionado:

Tubos 1 e 2: 1,00 ml de água destilada (prova em branco).

Tubos 3 e 4: 1,00 ml de padrão de açúcar invertido.

Tubos 5 e 6: 1,00 ml da solução obtida pelo processo anterior.

A cada tubo foi adicionado 1,00 ml de Reativo de Somogyi (ítem 3.3.4.), e os tubos foram agitados e aquecidos por 15 minutos em água fervente. Após terem esfriados, foram adicionados a cada tubo 1,00 ml de Reativo de Nelson (ítem 3.3.5.) e 7,00 ml de água destilada. Os tubos foram agitados e deixados 15 minutos em repouso à temperatura ambiente. Seguiu-se então a leitura em colorímetro Klett-Sumerson com filtro nº 54 (verde - 535 nm).

As percentagens de ART (g/100 ml) foram calculadas como se segue:

$$\% \text{ ART} = 10. \frac{(\text{Absorbância da amostra} - \text{absorbância do branco})}{(\text{Absorbância do padrão} - \text{absorbância do branco})}$$

3.5. Preparo dos inóculos de multiplicação

Duas alças de células, crescidas em meio completo sólido para leveduras por 48 h a 30°C, foram transferi

das para um erlenmeyer de 250 ml contendo 50,00 ml do mesmo meio líquido. O crescimento foi feito sob agitação por 12 h à temperatura ambiente.

3.6. Preparo dos inóculos dos testes de fermentação

Cada inóculo (50,00 ml), como preparado no item 3.5., foi transferido para um erlenmeyer de 2000 ml contendo 750,00 ml de meio de multiplicação (item 3.2.2.). A multiplicação foi feita sob aeração por 24 h em banho-maria a 30°C. O arejamento foi fornecido por um compressor de ar. O ar foi esterilizado pela passagem em uma solução de dicromato de potássio a 2,00% e depois lavado pela passagem em água destilada esterilizada.

Em períodos de 4 horas as células foram alimentadas pela adição de 75,00 ml de meio de meio contendo 30,00% de açúcares redutores totais (item 3.2.2.).

3.7. Montagem e condução dos ensaios de fermentação

Após multiplicadas (item 3.6.), as células foram coletadas por centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos em tubos de 100 ml, nos quais foram conduzidas as fermentações. O inóculo foi padronizado com 2,50 g de células de peso úmido

em 47,50 ml de mosto de fermentação correspondendo a um volume total de 50,00 ml e uma concentração de células de cerca de $2,90 \times 10^8$ células.

Os ensaios para avaliar caracteres fermentativos sob diferentes concentrações de açúcares e temperaturas foram conduzidos utilizando-se mostos com aproximadamente 12,00%, 16,00% e 20,00% de açúcares redutores totais (Ítem 3.2.3.). Foram montados dois blocos de tubos, cada um com três repetições para cada mosto e cada linhagem, sendo um incubado a 30°C e outro a 35°C. Foram conduzidas dez fermentações com reciclagem de células.

Os ensaios para avaliar a tolerância à pressão osmótica foram conduzidos utilizando-se mostos com 11,00% de açúcares redutores totais e diferentes concentrações de sorbitol (Ítem 3.2.3.). Montou-se um bloco de tubos, com três repetições para cada mosto e cada linhagem. Foram conduzidas oito fermentações com reciclagem de células a 30°C.

Para todos experimentos o tempo de cada fermentação foi de cerca de 9 horas. Após cada fermentação as células foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos e ressuspensas em mosto novo.

3.8. Destilação do vinho (AMORIM *et alii*, 1982)

Foi feita destilação de 25,00 ml do vinho com arraste por vapor em destilador Kjeldhal adaptado e foram coletados 50,00 ml de amostra. Este destilado contém, portanto, a quantidade de etanol da amostra diluída 1:1 com água.

3.9. Determinação do teor alcoólico do destilado (AMORIM *et alii*, 1982)

O teor alcoólico do destilado foi determinado em densímetro AP PAAR DMA 46. Os valores de densidade foram transformados para concentração de etanol (v/v) através da Tabela já preparada com este propósito.

3.10. Determinação de açúcares redutores no vinho (AMORIM *et alii*, 1982)

Foram transferidos 50,00 ml do vinho para balão volumétrico de 500 ml e o volume foi completado com água destilada. Após agitação, foram adicionadas 0,20 g de oxalato de sódio seguido de nova agitação. A seguir 0,50 a 1,00 g de Celite ou Kieselgur foram acrescentados à mistura, a qual foi agitada por 3 minutos e filtrada em papel de filtro desprezando-se os primeiros 20,00 - 25,00 ml.

Transferiu-se 50,00 ml do filtrado para balão volumétrico de 100 ml, e o volume completado com água destilada seguido da agitação. A solução obtida foi diluída de acordo com o Brix no vinho obedecendo-se o seguinte:

Brix	Diluição
0,00 - 0,50	não diluído
0,50 - 5,00	10/100
5,00 - 15,00	1/100

Tubos de ensaio foram numerados de 1 a 6 e em cada tubo foi adicionado:

Tubos 1 e 2: 1,00 ml de água destilada (prova em branco).

Tubos 3 e 4: 1,00 ml de padrão de açúcar invertido.

Tubos 5 e 6: 1,00 ml do diluído obtido no processo.

A cada tubo foi adicionado 1,00 ml de Reativo de Somogyi (Ítem 3.3.4.), e os tubos foram agitados e aquecidos por 15 minutos em água fervente. Após terem esfriados, foi adicionado a cada tubo 1,00 ml de Reativo de Nelson (Ítem 3.3.5.) e 7,00 ml de água destilada. Os tubos foram agitados e deixados 15 minutos em repouso à temperatura ambiente.

A leitura foi feita em colorímetro Klett-Sumerson com filtro nº 54 (verde - 535 nm).

As percentagens de AR (g/100 ml) foram calculadas obedecendo-se a fórmula seguinte:

$$\% \text{ AR} = \text{Fator} \cdot \frac{(\text{Absorbância da amostra} - \text{Absorbância do branco})}{(\text{Absorbância do padrão} - \text{Absorbância do branco})}$$

O fator variou de acordo com a diluição da solução obtida inicialmente conforme se segue:

Diluição	Fator
Não diluído	0,10
10/100	1,00
1/100	10,00

3.11. Cálculos dos rendimentos

Em função do valor teórico de etanol possível de ser obtido por conversão total do açúcar, foram calculados os rendimentos obtidos obedecendo-se a seguinte fórmula:

$$R = \frac{\% \text{ de álcool obtida (ml/100 ml)}}{\% \text{ de álcool esperada (ml/100 ml)}} \times 100$$

A percentagem de álcool esperada foi calculada considerando-se que 1,00 g de açúcares redutores totais suficientes para produzir 0,647 ml de álcool (AMORIM *et alii*, 1982).

3.12. Cálculos da eficiência

Obedeceu-se a seguinte fórmula para o cálculo da eficiência:

$$E (\%) = \frac{\text{álcool obtido (ml/100 ml)}}{(\text{ART inicial} - \text{ART final}) \times 0.647} \times 100$$

(g/100 ml)

3.13. Viabilidade

Procedeu-se a contagem de células viáveis no início da primeira fermentação e alternando-se fermentações sucessivas. Após ressuspensão das células, uma amostra de 0,10 ml foi retirada de cada repetição e diluída em 10,00 ml de solução de sais Ringer (Ítem 3.3.2.). Uma gota do material diluído e uma de solução corante (Ítem 3.3.3.) foram colocadas em lâmina de vidro. Após homogeneizado, o material foi coberto com lamínula e as contagens feitas em microscópio WILD M 20 (Heerburg) com aumento de 400 x. Foram contadas cerca de 500 células por repetição, e os resultados foram expressos em per-

centagens de células vivas, as quais foram calculadas como se segue:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{\text{Nº de células vivas (total de 3 repetições)}}{\text{Nº total de células (total de 3 repetições)}} \times 100$$

3.14. Brotamento

Procedeu-se a contagem do número total de brotos (brotos vivos e mortos) e do número de brotos vivos, independente do tamanho dos mesmos, no início da primeira fermentação e alternando-se fermentações sucessivas. As percentagens foram calculadas como se segue:

$$\text{Brotamento (\%)} = \frac{\text{Nº total de brotos (total de 3 repetições)}}{\text{Nº total de células (total de 3 repetições)}} \times 100$$

$$\text{Brotos vivos (\%)} = \frac{\text{Nº de brotos vivos (total de 3 repetições)}}{\text{Nº total de células (total de 3 repetições)}} \times 100$$

3.15. Multiplicação celular

Foram feitas duas contagens por repetição dos números de células por mililitro, em câmara de Neubauer, no início da primeira e no final da última fermentação. Foram obtidos os valores médios dos números de células por mililitro iniciais e finais, a partir dos quais, foram determinadas as

variações ocorridas nos mesmos observando-se o seguinte cálculo:

$$\text{Variações no n}^\circ \text{ cel/ml/ (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ cel/ml final} - \text{N}^\circ \text{ cel/ml inicial}}{\text{N}^\circ \text{ cel/ml inicial}} \times 100$$

3.16. Peso úmido de células

As variações ocorridas nos pesos úmidos de células foram verificadas pelas diferenças entre os pesos úmidos finais, após a última fermentação, e os pesos úmidos iniciais. Antes das células serem pesadas as mesmas foram lavadas duas vezes com água destilada estéril e centrifugadas quatro vezes, após a última lavagem, a 2000 rpm por 10 minutos.

3.17. Peso seco de células

As variações ocorridas nos pesos secos de células foram verificadas pelas diferenças entre os pesos secos finais, após a última fermentação, e os pesos secos iniciais.

Para obtenção dos pesos secos iniciais foram preparados três tubos com 2,50 g de células de peso úmido, inóculo padronizado, de cada linhagem isoladamente. Antes das células serem colocadas para secar, as mesmas foram lavadas duas vezes em água destilada estéril e centrifugadas qua-

tro vezes, após a última lavagem, a 2000 rpm por 10 minutos. A secagem das células foi feita em estufa a 50°C. Estas foram consideradas totalmente secas quando atingiram pesos constantes.

3.18. Procedimento estatístico

Os ensaios de fermentação foram planejados segundo o delineamento estatístico inteiramente casualizado com três repetições. Os ensaios para avaliar caracteres fermentativos sob diferentes concentrações de açúcares e temperaturas contaram com 12 tratamentos em esquema fatorial 2 x 3 x 2 e aqueles para avaliar a tolerância à pressão osmótica com 10 tratamentos em esquema fatorial 2 x 5.

A análise dos resultados referentes aos números de células por mililitro, pesos úmidos e secos de células constou de uma análise de variância com um critério de classificação (VIEIRA, 1981).

Para fins de comparação entre os diferentes tratamentos procedeu-se a comparação de médias pelo teste de Tukey (SNEDECOR & COHRAN, 1973).

Para comparar as médias de linhagens, referentes aos números de células por mililitro e pesos úmidos e secos de células,

aplicou-se o teste t de Student para variâncias iguais (VIEIRA, 1981). O mesmo teste foi aplicado para comparar temperaturas, referentes aos números de células por mililitro.

Para estimar a precisão dos experimentos, calculou-se os coeficientes de variação segundo SNEDECOR & COCHRAN (1973).

Para efeito das análises os valores obtidos foram transformados conforme regras estatísticas (SNEDECOR & COCHRAN, 1973) como se segue:

ENSAIOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCARES

Teor alcoólico - %	para $\sqrt{\%}$
Rendimento - %	para arco-seno $\sqrt{\%}$
Eficiência - %	para arco-seno $\sqrt{\%}$
Viabilidade - %	para arco-seno $\sqrt{\%}$
Brotamento - %	para arco-seno $\sqrt{\%}$
Nº cel/ml -	$\sqrt{x + 0.5}$
Peso úmido -	_____
Peso seco -	_____
Açúcar consumido - %	para arco-seno $\sqrt{\%}$

ENSAIOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SORBITOL

%	para $\sqrt{\% + 0.5}$
%	para arco-seno $\sqrt{\%}$
%	para arco-seno $\sqrt{\%}$
%	para arco-seno $\sqrt{\%}$

	valor real + 3
	valor real + 3
%	para arco-seno $\sqrt{\%}$

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação de caracteres fermentativos sob diferentes concentrações de açúcares e temperaturas

A fim de avaliar as características importantes para a fermentação como produção de etanol, rendimento, eficiência, viabilidade, brotamento e multiplicação celular para as leveduras M300A e Fleischmann no processo de fermentação alcoólica, foram conduzidos ensaios utilizando-se misturas de melaço e xarope de cana diluídas para conter aproximadamente 12,00%, 16,00% e 20,00% de açúcares redutores totais. Com cada um destes móstos foram conduzidas dez fermentações com reuso de células tanto a 30°C como a 35°C e os diferentes tratamentos foram comparados através do teste de Tukey ou teste t de Student.

4.1.1. Produção de etanol e rendimento

O teor alcoólico foi determinado para todas

fermentações e os resultados estão apresentados na Tabela 1. Os valores constantes na Tabela 2 referem-se aos rendimentos fermentativos obtidos. As significâncias encontradas quando das comparações entre concentrações de açúcares, temperaturas e leveduras são mostrados nas Tabelas 8, 9 e 10, respectivamente. Nestas Tabelas pode-se verificar, que embora tenha ocorrido aumento significativo nas quantidades de etanol produzidas com o aumento da concentração de açúcares, este aumento não foi proporcional na temperatura de 35°C , o que pode ser inferido a partir do fato dos rendimentos médios obtidos terem sido semelhantes nas três concentrações de açúcares a 30°C , enquanto que a 35°C ocorreu uma queda acentuada dos mesmos com o aumento da concentração de açúcares redutores totais. Observa-se também, que nas fermentações com 12,30% de açúcares a produção de etanol não foi afetada pela temperatura, no entanto, naquelas com 16,50% e 20,60% a produção foi maior a 30°C . As duas leveduras produziram quantidades de etanol semelhantes a 30°C , mas a 35°C , o fermento Fleischmann foi superior à M300A nas duas concentrações mais altas de açúcares redutores totais.

4.1.2. Eficiência

Os resultados apresentados na Tabela 3 correspondem aos valores de eficiência calculados para cinco fermenten

Tabela 1 - Produção de etanol (% v/v) apresentada por leveduras industriais em misturas de melaço e xarope de cana.

Tratamentos		Concentração inicial de ART(g/100 ml)	F e r m e n t a ç õ e s										C.V.* = 1,65%	Média
Tempera- tura	Levedura		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X		
30°C	M300A (híbrido)	12,30	6,86	7,18	6,70	7,04	7,14	7,14	7,14	6,86	7,04	6,86		7,00
		16,50	8,42	9,74	9,74	9,68	9,97	9,93	9,58	9,44	9,48	9,39		9,54
		20,60	9,49	11,16	11,26	11,72	12,53	12,84	12,22	12,12	12,02	11,92		11,73
	Fleischmann	12,30	6,70	7,14	6,90	6,95	7,09	6,90	7,04	7,04	6,86	6,71		6,94
		16,50	8,86	9,74	9,74	9,68	9,82	9,44	9,44	9,44	9,44	9,44		9,50
		20,60	9,24	10,92	11,41	11,92	12,53	12,28	11,97	12,12	12,02	12,17		11,66
35°C	M300A (híbrido)	12,30	6,86	7,04	7,14	7,14	7,37	7,00	6,90	6,95	6,90	7,04		7,04
		16,50	9,24	8,71	8,42	9,00	8,46	8,66	8,04	8,52	7,70	9,04		8,58
		20,60	10,80	8,56	9,09	9,30	8,90	8,76	8,32	8,90	7,74	9,44		8,99
	Fleischmann	12,30	6,75	6,85	7,00	7,14	6,95	6,86	6,86	6,86	6,86	6,86		6,90
		16,50	9,14	8,86	8,80	9,44	8,66	9,04	8,42	9,04	8,71	9,19		8,93
		20,60	10,27	9,68	9,49	10,17	9,58	10,46	9,54	10,22	9,58	10,46		9,95

*Coeficiente de variação. Cada valor corresponde à média de 3 repetições.

Tabela 2 - Rendimentos (%) obtidos com leveduras industriais em misturas de melaço e xarope de cana.

Tratamentos		Concentração inicial de ART (g/100 ml)	F e r m e n t a ç õ e s										C.V.* = 2,98%	Média
Tempera- tura	Levedura		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X		
30°C	M300A (híbrido)	12,30	86,20	90,30	84,19	88,54	89,72	89,72	89,72	86,20	88,54	86,20		87,93
		16,50	78,88	95,25	91,25	90,75	93,43	93,06	89,81	88,44	88,87	88,00		89,33
		20,60	71,24	83,79	84,54	87,94	94,05	96,40	91,75	90,95	90,20	89,45		88,03
	Fleischmann	12,30	84,19	89,72	86,78	87,37	89,13	86,78	88,54	88,54	86,20	84,36		87,16
		16,50	83,01	91,25	91,25	90,75	92,06	88,44	88,44	88,44	88,44	88,44		89,05
		20,60	69,35	81,94	85,64	89,45	94,05	92,15	89,82	91,00	90,20	91,35		87,49
35°C	M300A (híbrido)	12,30	86,20	88,54	89,72	89,72	92,65	87,96	86,78	87,37	86,78	88,54		88,43
		16,50	86,63	81,63	78,88	84,38	79,31	81,19	75,32	79,82	72,14	84,75		80,41
		20,60	81,09	64,28	68,23	69,79	66,83	65,78	62,48	66,83	58,13	70,83		67,43
	Fleischmann	12,30	84,86	86,11	87,96	89,72	87,37	86,20	86,20	86,20	86,20	86,20		86,70
		16,50	85,63	83,01	82,51	88,44	81,13	84,75	78,88	84,75	81,63	86,13		83,69
		20,60	77,09	72,69	71,23	76,34	71,94	78,49	71,59	76,69	71,94	78,49		74,65

*Coeficiente de variação. Cada valor corresponde à média de 3 repetições.

Tabela 3 - Eficiência (%) apresentada por leveduras industriais em cinco, de uma série de dez, fermentações conduzidas em misturas de melaço e xarope de cana.

Tratamentos		Concentração inicial de ART (g/100 ml)	Fermentações					C.V.* = 0,87%	Média
Temperatura	Levedura		II	IV	VI	VIII	X		
30°C	M300A (híbrido)	12,30	90,36	88,75	89,94	86,20	86,40		88,33
		16,50	91,35	90,87	93,15	88,46	88,30		90,43
		20,60	84,80	88,84	96,93	91,15	89,76		90,30
	Fleischmann	12,30	89,72	87,60	86,98	88,80	84,53		87,53
		16,50	91,25	90,99	88,57	88,59	88,63		89,61
		20,60	82,55	90,27	92,34	91,18	91,64		89,60
35°C	M300A (híbrido)	12,30	89,00	89,80	88,01	88,13	88,83		88,75
		16,50	94,23	94,22	88,89	88,36	87,44		90,63
		20,60	95,56	96,29	94,81	93,33	94,45		94,89
	Fleischmann	12,30	95,86	89,95	86,32	86,41	86,37		88,98
		16,50	89,71	94,84	88,41	87,84	87,77		89,71
		20,60	92,91	95,53	94,32	90,25	95,90		93,78

*Coeficiente de variação. Cada valor corresponde à média de 3 repetições.

tações alternadas, dentre as dez realizadas para cada tratamento, e nas Tabelas 8, 9 e 10 constam, respectivamente, as significâncias observadas quando se comparou concentrações de açúcares, temperaturas e leveduras. Observa-se que a 30°C a eficiência de conversão de açúcares em etanol apresentada tanto pela levedura M300A como pela Fleischmann com 16,50% de açúcares foi maior que aquela observada com 12,30%. A 35°C, entretanto, ambas leveduras foram mais eficientes quando o mosto de fermentação continha 20,60% de açúcares redutores totais. Além disso, verifica-se, que nas fermentações conduzidas com a maior concentração de açúcares, as duas leveduras apresentaram eficiências notavelmente maiores quando a temperatura de fermentação foi de 35°C e que não ocorreram efeitos de leveduras nem nas fermentações conduzidas a 30°C nem naquelas conduzidas a 35°C.

4.1.3. Viabilidade celular

A viabilidade das células durante o processo de fermentação foi acompanhada no início da primeira e no final de cinco fermentações, alternadas, das dez que foram conduzidas com cada tratamento. Os resultados estão apresentados na Tabela 4 e as significâncias observadas na comparação de concentrações de açúcares, temperaturas e leveduras são mostradas, respectivamente, nas Tabelas 8, 9 e 10, nas quais se

verifica, que ocorreu uma queda acentuada da viabilidade celular da levedura M300A nas fermentações conduzidas com 16,50% e 20,60% de açúcares a 30°C. Assim, as médias de células vivas das dez fermentações, nas referidas concentrações de açúcares, foram acentuadamente menores que aquela das fermentações com a concentração de açúcares mais baixa. Quando ao fermento Fleischmann, este manteve viabilidade mais alta na menor concentração de açúcares em relação àquela mantida nas fermentações com mosto a 20,60% de açúcares redutores totais. A 35°C, a viabilidade da linhagem M300A diminuiu igualmente nas três concentrações de açúcares, enquanto que, a da levedura Fleischmann caiu mais nas fermentações conduzidas com 16,50% do que com 12,30% de açúcares redutores totais. Pode-se constatar ainda, que a viabilidade de ambas leveduras foi significativamente afetada pela temperatura nas três concentrações de açúcares redutores, havendo maior mortalidade das células a 35°C. Comparando-se leveduras, a Fleischmann manteve viabilidade acentuadamente mais alta que a M300A em todos tratamentos.

4.1.4. Brotamento

Objetivando avaliar a formação de brotos e sua viabilidade, procedeu-se a contagem de brotos no início da primeira e no final de cinco fermentações alternadas, dentre as

Tabela 4 - Viabilidade celular (%) apresentada por leveduras industriais após cinco, de uma série de dez, fermentações conduzidas em misturas de melaço e xarope de cana.

Tratamentos		Concentração inicial de ART (g/100 ml)	Viabili- dade inicial	Fermentações					C.V.* = 5,00%	Média
Tempera- tura	Levedura			II	IV	VI	VIII	X		
30°C	M300A (híbrido)	12,30	99,42	97,57	97,35	92,90	84,29	82,80		92,39
		16,50	98,41	97,30	92,39	78,29	72,65	65,71		84,12
		20,60	98,23	94,13	84,09	73,53	57,02	70,17		79,53
	Fleischmann	12,30	98,58	96,60	97,64	96,86	94,83	95,57		96,68
		16,50	98,76	98,69	96,98	93,50	82,62	83,22		92,29
		20,60	98,09	97,91	95,19	89,96	74,79	78,30		89,04
35°C	M300A (híbrido)	12,30	99,47	84,92	67,88	48,40	41,25	31,63		62,26
		16,50	99,59	76,33	60,63	45,44	32,90	22,37		56,21
		20,60	98,41	73,97	67,55	39,75	37,04	28,71		57,57
	Fleischmann	12,30	99,81	93,48	78,23	60,46	58,51	37,98		71,41
		16,50	99,48	87,57	59,91	50,41	51,91	33,59		63,81
		20,60	98,00	87,33	74,87	63,35	54,17	36,97		69,11

*Coeficiente de variação. Cada valor corresponde à média de 3 repetições.

dez que foram conduzidas com cada tratamento. Os resultados apresentados na Tabela 5 referem-se à brotamento total onde brotos vivos e mortos foram considerados. Na Tabela 6 são mostrados os resultados referentes a brotos vivos e nas Tabelas 8, 9 e 10 constam as significâncias verificadas quando se comparou concentrações de açúcares, temperaturas e leveduras respectivamente. Nota-se, que o aumento da concentração de açúcares, a 30°C, não afetou a formação de brotos pela levedura M300A. O fermento Fleischmann, no entanto, apresentou maior percentagem média de brotamento no mosto com 16,50% de açúcares do que com 12,30%. Quando se compara as Tabelas 5 e 6 verifica-se a ocorrência de morte de brotos de ambas leveduras. Entretanto, as percentagens médias de brotos vivos mantidos pelas mesmas foram semelhantes nas três concentrações de açúcares redutores totais. Na temperatura de 35°C, a linhagem M300A apresentou maior percentagem média de brotamento, bem como de brotos vivos nas fermentações conduzidas com a menor concentração de açúcares. A levedura Fleischmann por sua vez, teve menor brotamento na concentração mais alta de açúcares e a viabilidade dos brotos foi menor em relação à observada no meio contendo 12,30% de açúcares redutores totais. Observa-se também, que o aumento da temperatura de 30°C para 35°C afetou negativamente o brotamento de ambas leveduras. Do mesmo modo, as percentagens de brotos vivos foram marcadamente me

nores a 35°C. Tanto a 30°C como a 35°C, a linhagem M300A apresentou maiores percentagens de brotamento do que o fermento Fleischmann. Quanto à viabilidade dos brotos, a levedura M300A a manteve mais alta do que a Fleischmann nas fermentações conduzidas com 12,30% e 20,60% de açúcares redutores totais.

4.1.5. Multiplicação celular

Os números médios de células por mililitro com os quais foram iniciadas as fermentações e aqueles atingidos após dez fermentações com reuso de células estão apresentados na Tabela 7. Desta constam também as variações ocorridas nos mesmos. Nas Tabelas 8, 9 e 10 são mostradas as comparações entre concentrações de açúcares, temperaturas e leveduras, respectivamente. Comparando-se os valores correspondentes às variações nos números de células por mililitro a 30°C, verifica-se que o fermento Fleischmann apresentou maior número na concentração de açúcares de 16,50% do que de 20,60%. Para a M300A os números foram estatisticamente semelhantes nas três concentrações de açúcares. Também não foram observadas diferenças significativas entre os números de células das três concentrações de açúcares redutores totais a 35°C. Pode ser notado ainda, que a temperatura de fermentação teve influência significativa sobre a multiplicação celular das duas leveduras, a qual foi acentuadamente maior a 30°C e que na tempera-

Tabela 5 - Brotamento (%) apresentado por leveduras industriais em cinco, de uma série de dez, fermentações conduzidas em misturas de melaço e xarope de cana.

Tratamentos		Concentração inicial de ART (g/100 ml)	Brotamento inicial	Fermentações					C.V.* = 5,03%	Média
Temperatura	Levedura			II	IV	VI	VIII	X		
30°C	M300A (híbrido)	12,30	50,24	72,40	57,43	65,64	70,61	72,56		64,81
		16,50	48,21	71,91	69,89	70,28	70,26	68,88		66,57
		20,60	51,54	69,59	73,37	71,88	69,53	78,87		69,13
	Fleischmann	12,30	35,57	56,73	63,04	63,89	71,79	33,00		54,00
		16,50	33,23	57,42	62,29	79,19	73,93	45,59		58,61
		20,60	31,59	48,78	66,94	72,10	62,71	46,95		55,01
35°C	M300A (híbrido)	12,30	50,86	56,29	52,72	51,52	66,50	70,31		58,03
		16,50	48,50	51,22	47,54	56,77	53,68	54,46		52,03
		20,60	50,47	55,63	47,11	48,64	54,10	57,13		52,18
	Fleischmann	12,30	30,74	32,90	50,14	57,31	44,61	63,32		46,50
		16,50	34,01	26,52	47,76	55,99	47,65	62,17		45,68
		20,60	35,50	17,80	32,15	42,21	40,80	57,19		37,61

*Coeficiente de variação. Cada valor corresponde à média de 3 repetições.

Tabela 6 - Viabilidade dos brotos (%) apresentada por leveduras industriais em cinco, de uma série de dez, fermentações conduzidas em misturas de melaço e xarope de cana.

Tratamentos		Concentração inicial de ART (g/100 ml)	Brota-mento inicial	Fermentações					C.V.* = 6,75%	Média
Tempera-tura	Levedura			II	IV	VI	VIII	X		
30°C	M300A (híbrido)	12,30	50,24	71,66	56,11	64,79	65,51	67,87		62,70
		16,50	48,04	71,41	68,40	62,42	60,26	54,67		60,87
		20,60	50,84	66,56	69,87	61,87	47,92	61,22		59,71
	Fleischmann	12,30	35,39	55,62	62,42	63,08	70,78	31,31		53,10
		16,50	32,70	56,78	61,73	77,17	70,34	40,22		56,49
		20,60	31,41	48,33	65,25	68,85	55,83	40,85		51,75
35°C	M300A (híbrido)	12,30	50,66	55,02	48,45	37,68	35,77	29,13		42,78
		16,50	48,30	46,12	39,15	35,64	23,53	19,90		35,44
		20,60	49,94	52,34	39,88	27,44	24,19	21,15		35,82
	Fleischmann	12,30	30,74	30,46	47,11	46,54	28,09	31,70		35,77
		16,50	33,83	23,90	35,76	34,07	23,68	31,09		30,39
		20,60	35,09	16,48	27,22	28,84	22,34	30,58		26,76

*Coeficiente de variação. Cada valor corresponde à média de 3 repetições.

Tabela 7 - Variações nos números de células por mililitro de leveduras industriais após dez fermentações conduzidas em misturas de melaço e xarope de cana.

Temperatura	Levedura	Concentração inicial de ART (g/100 ml)	Nº células/ml inicial ($\times 10^8$)	Nº células/ml final ($\times 10^8$)	Variações nos nºs células/ml ($\times 10^8$)	Variações nos nºs células/ml (%)	Coeficiente de variação (%)
30°C	M300A (híbrido)	12,30	2,85	6,25	3,40	119,30	9,90
		16,50	2,88	6,85	3,97	137,85	
		20,60	2,95	5,29	2,34	79,32	
	Fleischmann	12,30	2,89	5,65	2,76	95,50	3,96
		16,50	2,93	6,74	3,81	130,03	
		20,60	2,99	6,05	3,06	102,34	
35°C	M300A (híbrido)	12,30	2,83	3,05	0,22	7,77	38,08
		16,50	2,87	3,04	0,17	5,92	
		20,60	2,87	3,61	0,74	25,78	
	Fleischmann	12,30	3,03	4,51	1,48	48,84	8,19
		16,50	3,05	4,53	1,48	48,52	
		20,60	2,89	4,64	1,75	60,55	

Os valores referentes aos nºs de células/ml iniciais e finais correspondem às médias de 3 repetições.

Tabela 8 - Significâncias das diferenças observadas entre concentrações de açúcares dentro de levedura e temperatura.

Temperatura	Levedura	Concentração inicial de ART (g/100 ml)			Parâmetros avaliados							
		12.3	16.5	20.6	Teor alcoólico	Rendimento	Eficiência	Viabilidade celular	Brota-mento	Viabilidade de brotos	Variações nos n°s células/ml	Consumo de açúcar
30°C	M300A (híbrido)	X	X		**	NS	*	**	NS	NS	NS	NS
		X		X	**	NS	NS	**	NS	NS	NS	NS
			X	X	**	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	Fleischmann	X	X		**	NS	*	NS	*	NS	*	NS
		X		X	**	NS	NS	**	NS	NS	NS	NS
			X	X	**	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
35°C	M300A (híbrido)	X	X		**	**	NS	NS	**	**	NS	**
		X		X	**	**	**	NS	*	**	NS	**
			X	X	**	**	**	NS	NS	NS	NS	**
	Fleischmann	X	X		**	**	NS	**	NS	NS	NS	**
		X		X	**	**	**	NS	**	**	NS	**
			X	X	**	**	**	NS	**	NS	NS	**

XX - Tratamentos comparados.

NS - Não significativo.

** - Significativo a nível de 1% de probabilidade.

* - Significativo a nível de 5% de probabilidade.

Tabela 9 - Significância das diferenças observadas entre temperaturas dentro de concentração de açúcares e de levedura.

Levedura	Concentração inicial de ART (g/100 ml)	Parâmetros avaliados							
		Teor alcoólico	Rendimento	Eficiência	Viabilidade celular	Brota-mento	Viabilidade de brotos	Variações nos nºs células/ml	Consumo de açúcar
M300A (híbrido)	12,30	NS	NS	NS	**	**	**	**	NS
	16,50	**	**	NS	**	**	**	**	**
	20,60	**	**	**	**	**	**	*	**
Fleischmann	12,30	NS	NS	NS	**	**	**	*	*
	16,50	**	**	NS	**	**	**	**	**
	20,60	**	**	**	**	**	**	**	**

NS = Não significativo.

** = Significativo a nível de 1% de probabilidade.

* = Significativo a nível de 5% de probabilidade.

Tabela 10 - Significância das diferenças observadas entre leveduras dentro de concentração de açúcares e de temperatura.

Temperatura	Concentração inicial de 'ART (g/100 ml)	Parâmetros avaliados							
		Teor alcoólico	Rendimento	Eficiência	Viabilidade celular	Brota mento	Viabilidade de brotos	Variações nos nºs células/ml	Consumo de açúcar
30°C	12,30	NS	NS	NS	*	**	**	NS	NS
	16,50	NS	NS	NS	**	**	NS	NS	NS
	20,60	NS	NS	NS	**	**	**	NS	NS
35°C	12,30	NS	NS	NS	**	**	**	*	NS
	16,50	**	**	NS	**	**	NS	*	NS
	20,60	**	**	NS	**	**	**	*	**

NS = Não significativo.

** = Significativo a nível de 1% de probabilidade.

* = Significativo a nível de 5% de probabilidade.

tura de 35°C, o fermento Fleischmann aumentou mais seu número de células do que a M300A.

4.2. Avaliação de caracteres fermentativos sob diferentes concentrações de sorbitol - Tolerância à pressão osmótica

Com o objetivo de avaliar parâmetros importantes de serem considerados no processo de fermentação alcoólica sob diferentes pressões osmóticas, as leveduras M300A e Fleischmann foram ensaiadas em misturas de melaço e xarope de cana diluídas a 11,00% de açúcares redutores totais acrescidas de sorbitol a diferentes concentrações. Foram conduzidas oito fermentações com reciclagem de células e os diferentes tratamentos foram comparados através do teste de Tukey ou teste t de Student.

4.2.1. Produção de etanol e rendimento

As quantidades de etanol produzidas pelas leveduras M300A e Fleischmann em todas as fermentações conduzidas constam da Tabela 11. Os respectivos rendimentos são mostrados na Tabela 12 e nas Tabelas 17 e 18 estão apresentados as significâncias encontradas nas comparações entre concentrações de sorbitol e leveduras respectivamente. Nestas pode-se notar, que a produção de etanol apresentada pelas leveduras

Tabela 11 - Produção de etanol (% v/v) apresentada por leveduras industriais em misturas de melaço e xarope de cana a 11,00% de açúcares redutores totais.

Tratamentos		F e r m e n t a ç õ e s								C.V.* = 2,70%	Média
Levedura	Concentração de sorbitol (%)	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII		
M300A (híbrido)	Controle	5,53	6,33	6,05	5,72	6,09	6,51	6,09	6,57	6,11	
	15,00	4,53	5,08	5,72	4,95	5,72	5,39	5,12	5,81	5,29	
	20,00	5,03	5,03	5,21	4,53	5,12	5,21	5,03	4,94	5,01	
	25,00	4,48	5,03	5,59	4,11	4,43	4,71	6,28	4,34	4,87	
	30,00	3,33	4,06	4,15	4,20	4,29	4,25	4,39	4,15	4,10	
Fleischmann	Controle	5,22	6,75	6,51	6,56	6,71	6,56	6,42	6,61	6,42	
	15,00	4,71	5,77	6,05	6,23	6,19	6,28	6,42	6,37	6,00	
	20,00	4,93	5,35	5,49	5,86	5,72	6,14	6,33	6,14	5,74	
	25,00	3,70	4,82	4,76	5,49	5,53	5,86	6,19	6,23	5,32	
	30,00	2,88	2,97	3,24	4,01	4,90	4,06	4,76	5,16	4,00	

*Coeficiente de variação. Cada valor corresponde à média de 3 repetições.

Tabela 12 - Rendimentos (%) obtidos com leveduras industriais em mistura de melaço e xarope de cana a 11,00% de açúcares redutores totais.

Tratamentos		F e r m e n t a ç õ e s								C.V.* = 5,18%	Média
Levedura	Concentração de sorbitol (%)	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII		
M300A (híbrido)	Controle	77,75	88,89	84,96	80,37	85,61	91,52	85,61	92,27	85,87	
	15,00	63,60	71,38	80,37	69,51	80,37	75,78	71,94	81,68	74,33	
	20,00	70,63	70,63	73,25	63,60	71,94	73,25	70,72	69,41	70,43	
	25,00	62,95	70,63	78,50	57,70	62,29	66,22	88,24	60,98	68,44	
	30,00	46,83	57,05	58,36	59,01	60,32	59,67	61,64	58,36	57,65	
Fleischmann	Controle	73,35	94,89	91,52	92,17	94,23	92,17	90,21	92,83	90,17	
	15,00	66,13	81,02	84,96	87,58	86,93	88,24	90,21	89,55	84,33	
	20,00	69,32	71,12	77,09	82,34	80,37	86,27	88,89	86,27	80,21	
	25,00	51,99	68,19	66,88	77,09	77,75	82,34	86,93	87,58	74,84	
	30,00	40,47	41,69	45,52	56,39	68,85	57,05	66,88	72,50	56,17	

*Coeficiente de variação. Cada valor corresponde à média de 3 repetições.

ensaiadas foi acentuadamente maior nas fermentações controle do que naquelas com móstos acrescidos de sorbitol. Verifica-se ainda, que ambas leveduras produziram quantidades semelhantes de etanol nas fermentações com 15,00% e 20,00% de sorbitol. A linhagem M300A também não mostrou diferenças significativas entre a produção de etanol nas fermentações com 20,00% e 25,00% de sorbitol. Comparando-se leveduras, observa-se que, exceto nas fermentações controle e nas que foram conduzidas com 30% de sorbitol, o fermento Fleischmann apresentou produção de etanol significativamente mais alta que a linhagem M300A.

4.2.2. Eficiência

A eficiência com que as leveduras M300A e Fleischmann converteram os açúcares em etanol estão apresentados na Tabela 13. As comparações entre concentrações de sorbitol e leveduras constam, respectivamente, nas Tabelas 17 e 18. Pode-se observar que ambas leveduras foram marcadamente menos eficientes quando as fermentações foram conduzidas com móstos acrescidos de sorbitol. Verifica-se também, que a linhagem M300A converteu maior quantidade de açúcares em etanol nas fermentações com 15,00% de sorbitol do que com 30,00% do mesmo açúcar. O fermento Fleischmann por sua vez, mostrou-se mais eficiente nas fermentações com 15,00% do que com 25,00% e 30,00% de sor

Tabela 13 - Eficiência (%) apresentada por leveduras industriais em misturas de melaço e xarope de cana a 11,00% de açúcares redutores totais.

Tratamentos		F e r m e n t a ç õ e s								Média
Levedura	Concentração de sorbitol (%)	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	
M300A (híbrido)	Controle	82,03	91,36	89,00	82,19	88,13	92,93	88,64	94,02	88,54
	15,00	71,83	72,26	84,44	71,96	82,94	78,21	76,93	83,90	77,81
	20,00	78,87	72,02	76,37	64,90	74,03	75,29	74,65	70,82	73,37
	25,00	73,68	72,81	82,26	59,64	64,12	73,11	92,14	62,85	72,58
	30,00	69,28	74,31	72,08	67,70	70,52	84,36	70,65	64,40	71,66
Fleischmann	Controle	79,02	96,11	93,21	93,54	98,75	97,03	92,65	95,94	93,28
	15,00	73,00	89,01	89,29	90,69	89,58	90,96	91,97	90,67	88,15
	20,00	75,46	82,58	82,63	84,58	81,84	86,61	89,08	86,27	83,63
	25,00	55,85	81,36	74,63	79,60	83,76	85,23	89,54	89,47	79,93
	30,00	56,60	71,64	65,56	71,28	95,92	74,87	77,90	79,41	74,15

*Coeficiente de variação. Cada valor corresponde à média de 3 repetições.

bitol, sendo o mesmo observado nas fermentações com 20,00% de sorbitol em relação às aquelas com 30,00% do referido açúcar. Ao se comparar leveduras, nota-se que o fermento Fleischmann, exceto nas fermentações com mosto acrescido de 30,00% de sorbitol, superou acentuadamente em eficiência a levedura M300A.

4.2.3. Viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada no início da primeira e no final de quatro fermentações alternadas, dentre as oito que foram conduzidas com cada tratamento. Os resultados são mostrados na Tabela 14 e os contrastes entre as médias são apresentados nas Tabelas 17 e 18 para concentrações de sorbitol e leveduras, respectivamente. Pode ser observado, que a viabilidade das células de ambas leveduras praticamente não se alterou até o final da oitava fermentação e que a mesma foi mantida aproximadamente no mesmo nível em todos os tratamentos. Tanto nas fermentações controles como naquelas conduzidas com mostos acrescidos de sorbitol as duas leveduras mantiveram percentagens de células vivas semelhantes.

Tabela 14 - Viabilidade celular (%) apresentada por leveduras industriais em quatro, de uma série de oito, fermentações conduzidas em misturas de melaço e xarope de cana a 11,00% de açúcares redutores totais.

Tratamentos		F e r m e n t a ç õ e s					Média
Levedura	Concentração de sorbitol (%)	Inicial	II	IV	VI	VIII	
M300A (híbrido)	Controle	98,82	98,72	98,42	98,26	98,19	98,48
	15,00	98,90	98,60	98,40	97,37	99,16	98,49
	20,00	99,07	98,92	98,28	98,71	99,05	98,81
	25,00	98,79	98,71	98,83	97,84	98,95	98,62
	30,00	99,49	98,91	98,29	97,85	97,56	98,42
Fleischmann	Controle	99,39	99,17	98,53	97,42	97,22	98,35
	15,00	99,47	99,13	98,29	98,80	98,49	98,84
	20,00	98,97	98,70	97,93	98,05	98,96	98,52
	25,00	99,27	99,02	98,33	97,93	98,94	98,70
	30,00	99,34	99,04	98,73	97,42	98,09	98,52

*Coeficiente de variação. Cada valor corresponde à média de 3 repetições.

4.2.4. Peso celular

A determinação dos pesos úmidos e secos de células foi feita, para todos os tratamentos, antes da primeira e após a oitava fermentação. As variações observadas nos mesmos constam das Tabelas 15 e 16, respectivamente. As significâncias observadas quando se comparou concentrações de sorbitol e leveduras estão apresentadas, respectivamente, nas Tabelas 17 e 18. Verifica-se que até com 25,00% de sorbitol ocorreu um aumento nos pesos úmidos de células das leveduras M300A e Fleischmann. Tais aumentos porém, foram menores na medida em que a concentração de sorbitol foi aumentada. Com 30,00% do referido açúcar, ao contrário, ocorreu diminuição dos pesos. Comparando-se leveduras, observa-se que o fermento Fleischmann apresentou maiores aumentos nos pesos úmidos do que a levedura M300A nas fermentações controles e naquelas com 15,00%, 20,00% e 25,00% de sorbitol. Na maior concentração do açúcar, o peso úmido de células do primeiro diminuiu menos que o da segunda. Quanto ao peso seco de células, nota-se que o da levedura M300A aumentou igualmente nas fermentações controles e naquelas conduzidas com móstos acrescidos de 15,00% e 20,00% de sorbitol. O aumento da concentração de sorbitol para 25,00% e 30,00% decorreu em menores aumentos dos pesos secos de células. Quanto ao peso seco de células do fermento Fleischmann, ocorreu um aumento marcadamente maior nas fermentações conduzidas com

.83.

15,00% de sorbitol. Nas fermentações controle e naquelas conduzidas com 20,00% de sorbitol, entretanto, os aumentos foram se melhantes. Quando se aumentou a concentração de sorbitol para 25,00% e 30,00%, menores aumentos nos pesos secos foram observados. Em todos tratamentos ocorreu um aumento maior nos pesos secos do fermento Fleischmann do que da M300A.

Tabela 15 - Variações nos pesos (g) úmidos de células de leveduras industriais após 8 fermentações conduzidas em misturas de melaço e xarope de cana a 11,00% de açúcares redutores totais.

Concentração de sorbitol (%)	M300A (híbrido)	Fleischmann
Controle	2,52	3,58
15,00	1,44	2,45
20,00	0,92	1,63
25,00	0,13	0,87
30,00	- 0,83	- 0,23
C.V.*	3,84%	1,98%

*C.V. = Coeficiente de variação. Cada valor corresponde à média de 3 repetições.

Tabela 16 - Variações nos pesos (g) secos de células de leveduras industriais após 8 fermentações conduzidas em misturas de melaço e xarope de cana a 11,00% de açúcares redutores totais.

Concentração de sorbitol (%)	M300A (híbrido)	Fleischmann
Controle	0,86	1,07
15,00	0,94	1,23
20,00	0,85	1,08
25,00	0,61	0,88
30,00	0,26	0,53
C.V.*	1,68%	0,87%

*C.V. = Coeficiente de variação. Cada valor corresponde à média de 3 repetições.

Tabela 17 - Significâncias das diferenças observadas entre concentrações de sorbitol dentro de leveduras.

Levedura	Concentração de sorbitol (%)					Parâmetros avaliados						
	Con- trô- le	15,00	20,00	25,00	30,00	Teor al- cólico	Rendi- mento	Eficiên- cia	Viabilidade celular	Variações peso úmido	Variações peso seco	Consumo de açú- car
M300A (híbrido)	X	X				**	**	**	NS	**	NS	**
	X		X			**	**	**	NS	**	NS	NS
	X			X		**	**	**	NS	**	**	**
	X				X	**	**	**	NS	**	**	**
		X	X			NS	NS	NS	NS	**	NS	*
		X		X		**	*	NS	NS	**	**	*
		X			X	**	**	*	NS	**	**	**
			X	X		NS	NS	NS	NS	**	**	**
			X		X	**	**	NS	NS	**	**	**
				X	X	**	**	NS	NS	**	**	**
Fleischmann	X	X				**	**	**	NS	**	**	*
	X		X			**	**	**	NS	**	NS	*
	X			X		**	**	**	NS	**	**	**
	X				X	**	**	**	NS	**	**	**
		X	X			NS	NS	NS	NS	**	**	**
		X		X		**	**	**	NS	**	**	**
		X			X	**	**	**	NS	**	**	**
			X	X		**	*	NS	NS	**	**	**
			X		X	**	**	**	NS	**	**	**
				X	X	**	**	NS	NS	**	**	**

XX = Tratamentos comparados; NS = Não significativo; * = Significativo a nível de 5% de probabilidade;
 ** = Significativo a nível de 1% de probabilidade.

Tabela 18 - Significâncias das diferenças observadas entre leveduras dentro de concentração de sorbitol.

Concentração de sorbitol (%)	Parâmetros avaliados						
	Teor alcoólico	Rendimento	Eficiência	Viabilidade celular	Variações peso úmido	Variações peso seco	Consumo de açúcar
Controle	NS	**	**	NS	**	**	NS
15,00	**	**	**	NS	**	**	NS
20,00	**	**	**	NS	**	**	NS
25,00	**	**	**	NS	**	**	NS
30,00	NS	NS	NS	NS	**	**	NS

NS = Não significativo.

** = Significativo a nível de 1% de probabilidade.

Tabela 19 - Açúcar consumido (%) por leveduras industriais em cinco, de uma série de dez, fermentações conduzidas em misturas de melaço e xarope de cana com reciclagem de células.

Tratamentos		Concentração inicial de ART (g/100 ml)	Fermentações					C.V.* = 3,04%	Média
Tempera- tura	Levedura		II	IV	VI	VIII	X		
30°C	M300A (híbrido)	12,30	99,94	98,78	99,75	100,00	99,77	99,65	
		16,50	99,88	99,85	99,89	99,96	99,65	99,85	
		20,60	98,79	98,98	99,44	99,77	99,64	99,32	
	Fleischmann	12,30	100,00	99,74	99,78	99,71	99,79	99,80	
		16,50	99,98	99,73	99,84	99,81	99,77	99,83	
		20,60	99,25	99,07	99,77	99,79	99,66	99,51	
35°C	M300A (híbrido)	12,30	99,48	99,90	99,94	99,14	99,68	99,63	
		16,50	86,68	89,54	91,32	90,32	96,95	90,96	
		20,60	67,28	72,50	69,38	71,61	75,01	71,16	
	Fleischmann	12,30	89,84	99,74	99,83	99,76	99,80	97,79	
		16,50	92,51	93,24	95,84	96,47	98,12	95,24	
		20,60	78,21	79,90	83,22	84,96	81,84	81,63	

Cada valor corresponde à média de 3 repetições.

*Coeficiente de variação.

Tabela 20 - Açúcar consumido (%) por leveduras industriais em misturas de melaço e xarope de cana a 11,00% de açúcares redutores totais.

Tratamentos		Fermentações								C.V.* = 7,76%	Média
Levedura	Concentração de sorbitol (%)	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII		
M300A (híbrido)	Controle	94,79	97,37	95,45	97,79	97,15	98,45	96,58	98,12	96,96	
	15,00	88,51	98,79	95,24	96,57	96,94	96,94	93,51	97,33	95,48	
	20,00	89,58	98,00	95,85	98,00	97,24	97,33	94,73	98,03	96,09	
	25,00	85,39	97,00	95,45	96,76	97,15	90,78	95,79	97,03	94,42	
	30,00	67,61	76,76	81,00	87,18	85,58	70,94	87,27	90,64	80,87	
Fleischmann	Controle	92,79	98,73	98,18	98,58	95,42	95,03	97,36	96,79	96,61	
	15,00	90,61	91,03	95,15	96,58	97,03	97,12	98,06	98,79	95,55	
	20,00	91,76	91,00	93,33	97,39	98,21	99,61	99,79	100,00	96,39	
	25,00	93,09	83,82	89,70	96,88	92,91	96,64	97,15	97,91	93,51	
	30,00	71,30	58,21	69,48	79,09	71,79	76,48	85,88	91,33	75,44	

Cada valor corresponde à média de 3 repetições.

*Coeficiente de variação.

5. DISCUSSÃO

5.1. Avaliação de caracteres fermentativos sob diferentes concentrações de açúcares e temperaturas

5.1.1. Produção de etanol

Conforme Delle*, citado por HOLCBERG & MARGALITH (1981), afirmou, a quantidade de álcool produzida a partir de um certo açúcar fermentável diminuiria com o aumento da concentração de substrato. Isto estabeleceria um limite teórico para a fermentação a altas concentrações de açúcar. Esta limitação se deve aos efeitos inibitórios do substrato (GHOSE & TYAGI, 1979b; MOULIN *et alii*, 1980; PANCHAL & STEWART, 1980; WADA *et alii*, 1980; 1981; HARALDSON & BJORLING, 1981 e HOLCBERG e MARGALITH, 1981) e/ou do etanol produzido (RAHN, 1929 e NAVARRO & DURAND, 1978) sobre a taxa de fermentação.

*DELLE, P.N. *Odessa Otch Ninodielcheskoi Stantsii Russiakh. Vinogr. Vinol.*, 118-160, 1911.

Entretanto, a inibição pelo substrato é relativamente menor comparada à inibição pelo produto (Pironti*, citado por NAGODAWITHANA *et alii*, 1974). RAHN (1929) encontrou que nas primeiras quatro horas de fermentação a quantidade de açúcar fermentado em soluções contendo 5,00%, 10,00% e 20,00% de glicose foi a mesma nas três concentrações de açúcar, o que sugeriu uma independência da taxa de fermentação sobre o substrato. No entanto, a taxa de fermentação não permaneceu constante durante todo o experimento, diminuindo a medida que o etanol foi se acumulando no meio. Conforme a metodologia empregada no presente trabalho, não é possível tirar qualquer conclusão a respeito da ocorrência ou não de redução na taxa de fermentação pelo aumento da concentração de açúcares redutores e/ou do etanol produzido. No entanto, se isto ocorreu, a redução foi em um grau tal que o tempo de fermentação adotado (cerca de 9 horas) foi suficiente para que os rendimentos médios apresentados pelas duas leveduras avaliadas fossem semelhantes nas três concentrações de açúcares redutores totais a 30°C (Tabelas 2 e 8).

O processo de fermentação é dependente dos fatores ambiente e das características celulares do organismo utilizado (WILLIAMS & MUNNECKE, 1981). Diferenças quanto ao

*PIRONTI, F.F. Ithaca, New York, 1971. (Philosophal Doctor Cornell University).

potencial fermentativo de diferentes leveduras são devidas, em parte, às diferenças na habilidade para tolerar ao etanol produzido (GRAY, 1941) ou ao substrato (GRAY, 1945). Como pode ser visto nas Tabelas 1, 2, 3 e 10, nas fermentações conduzidas a 30°C as leveduras M300A e Fleischmann mostraram-se igualmente produtivas. Também não pode ser descartada a possibilidade de que a taxa de fermentação de uma ou outra levedura tenha sido mais fortemente inibida, se o foi, e que o tempo de fermentação tenha sido suficiente para que a produção média de etanol fosse semelhante para as duas leveduras nas três concentrações de açúcares ensaiadas. De qualquer modo, pode-se afirmar que, a 30°C, a atividade fermentativa de ambas leveduras não foi completamente inibida pelo aumento da concentração de açúcares até 20,60% e até que o etanol extracelular produzido atingisse pelo menos uma concentração de cerca de 11,70% (v/v). Analisando fermentações isoladas (Tabelas 1 e 2) este valor pode ser estendido para 12.84% (v/v) (96,40% de rendimento) e 12.53% (v/v) (94,05% de rendimento) para as leveduras M300A e Fleischmann respectivamente. Assim, tendo-se o rendimento como critério para avaliar a tolerância ao açúcar e ao etanol produzido, as leveduras aqui estudadas toleram ainda 20,60% de açúcares e correspondentes concentrações de etanol, considerando-se que nestas, os rendimentos foram semelhantes àqueles obtidos com a menor concentração de

açúcares e de etanol. Na literatura, os níveis de etanol que inibem a fermentação são variados, verificando-se que as diferenças estão relacionadas ao microrganismo utilizado, às condições sob as quais o experimento é conduzido e à própria maneira de se estudar os resultados (BAZUA & WILKE, 1977 e GHOSE & TYAGI, 1979b). Do mesmo modo, relatam-se diferentes concentrações de etanol as quais representam o melhor balanço entre recuperação econômica de etanol e inibição. Por exemplo, Greenshields*, citado por HARALDSON & BJORLING (1981), relata 8,00% a 9,00% (v/v), Righelato**, citado por BROWN *et alii* (1981), menciona 9,00% (p/v), HOLCBERG & MARGALITH (1981) citam 6,00% a 10,00% (v/v) e WANG *et alii* (1981) relatam 10,00% a 12,00% (p/v). Novamente as diferenças são devidas à linhagem de levedura e às condições empregadas.

Os rendimentos fermentativos obtidos a 30°C no presente estudo (Tabela 2), são comparáveis ao relatado por HARALDSON & ROSEN (1982) que utilizaram melaço de cana como substrato e a concentração de açúcares mantida a 1,00% no fermentador. Os valores obtidos estão coerentes também com a variação de resultados citada na literatura mesmo para substratos ideais como soluções de glicose diluídas (CYSEVSKI & WILKE,

*GREENSHIELDS, R.N. *Ethanol*. Octagon Group, Weizman Centenary Meeting, 1974.

**RIGHELATO, R.C. *Philos. Trans. R. Soc., London, Ser B* 290:303-312, 1980.

1976; RAMLINGAM & FINN, 1977; MARGARITIS & WILKE, 1978; LEE & ROGERS, 1979 e GHOSE & BANDYOPADHYAY, 1980). Para fermentações industriais valores como 73,00% foi relatado (ROSE, 1976).

O efeito negativo da temperatura sobre a M300A e Fleischmann verificado nas fermentações com as maiores concentrações de açúcares (Tabelas 1, 2 e 9), pode ser explicado em função das observações de NAVARRO & DURAND (1978). Estes autores verificaram que o aumento da temperatura promove o aumento da atividade metabólica e consequentemente o etanol é produzido mais rapidamente. No entanto, a excreção do mesmo não é tão rápida quanto a sua formação, de modo que, maiores concentrações de etanol são acumulados dentro das células. O etanol acumulado intracelularmente ocasiona maior inibição do que o etanol excretado. Resultados comparáveis foram encontrados por NAGODAWITHANA & STEINKRAUS (1976) e NOVAK *et alii* (1981). Segundo Nagatini *et alii**, citados por NAGODAWITHANA & STEINKRAUS (1976), a diminuição na produção de etanol está diretamente relacionada com a diminuição do número de células viáveis. Como mostrado nas Tabelas 4 e 8, as percentagens de células vivas a 35°C foram acentuadamente menores do que a 30°C. Pode-se inferir, portanto, que a menor produção de etanol nas duas maiores concentrações de açúcares a 35°C tenha

*NAGATINI, M.; KUBD, Y.; SUGANIA, A.S. *Journal Fermentation Technology*, 47:723-728, 1969.

sido devido, pelo menos em parte, ao menor número de células viáveis. Mas, não pode ser descartada a possibilidade de que a atividade fermentativa tenha sido inibida pela ação do produto final sobre a cadeia glicolítica (NAGODAWITHANA *et alii*, 1974), em um grau maior pelo maior conteúdo de etanol que possivelmente se acumulou intracelularmente a 35°C.

Visto que a produção de etanol nas fermentações conduzidas com 16,50% de açúcares foi significativamente afetada pela temperatura, seria esperado que a quantidade de etanol produzida com 20,60% de açúcares não ultrapassasse aquela produzida com 16,50%. Observa-se (Tabela 19) que a produção de etanol com esta concentração de açúcares não foi limitada pela disponibilidade de substrato, o que permite considerar duas explicações plausíveis para este fato. Primeiro, a menor produção de etanol pode ter sido consequência da menor viabilidade observada nas fermentações conduzidas com 16,50% de açúcares, se bem que as diferenças entre as percentagens médias de células viáveis foram estatisticamente semelhantes para as duas concentrações de açúcares em questão (Tabelas 4 e 8). Segundo, a formação de etanol com 20,60% de açúcares pode ter sido mais rápida do que com 16,50% em decorrência de uma atividade metabólica mais alta. Conforme mostraram PANCHAL & STEWART (1980), o aumento na concentração de sacarose até 25,00% aumenta o metabolismo e, conseqüentemente, a produção de etanol

pelas células das leveduras. Também é possível que ambos fatores tenham contribuído para os resultados observados.

Embora a viabilidade celular no tratamento com 12,30% de açúcares a 35°C tenha sido significativamente menor que a observada a 30°C, não afetou a produção de etanol que foi semelhante nas duas situações (Tabelas 1, 2 e 9).

A menor produção de etanol apresentada pela levedura M300A nas duas maiores concentrações de açúcares a 35°C em relação à Fleischmann (Tabelas 1, 2 e 10) pode ser explicada pela menor viabilidade da primeira (Tabelas 4 e 10). Observe-se que na primeira fermentação, nestas concentrações de açúcares, a levedura M300A produziu maiores quantidades de etanol que a Fleischmann quando a viabilidade de ambas leveduras era equivalente. A partir da primeira fermentação, a queda da viabilidade da M300A foi muito mais acentuada do que a da Fleischmann.

Considerando-se que ocorreu aumento significativo nas quantidades de etanol produzidas com o aumento da concentração de açúcares (Tabelas 1 e 8), pode-se dizer que a 35°C a atividade fermentativa das linhagens M300A e Fleischmann não foi completamente inibida mesmo com 20,60% de açúcares e até que o etanol extracelular produzido atingisse uma concentração média de pelo menos 8,99% e 9,95% (v/v) respectivamente. Analisando fermentações isoladas (Tabela 1) es

tes valores podem ser estendidos para 10,80% e 10,46% (v/v) respectivamente para as leveduras M300A e Fleischmann.

Observando-se que, a 35°C, o aumento da concentração de açúcares de 12,30% para 16,50% ocasionou rendimentos médios significativamente menores (Tabelas 2 e 8), e que, com 12,30% de açúcares os rendimentos obtidos a 35°C foram semelhantes aos obtidos a 30°C (Tabelas 2 e 9), pode-se considerar que na temperatura mais alta a linhagem M300A tolera uma concentração de açúcares entre 12,30% e 16,50% e uma concentração de etanol produzido entre 7,04% e 8,58% (v/v). Similarmente, o fermento Fleischmann tolera a mesma variação de açúcares que a M300A e uma concentração de etanol entre 6,90% e 8,93% (v/v). Os valores poderiam ser mais exatos se concentrações de açúcares intermediárias tivessem sido utilizadas.

As percentagens de açúcares consumidos e convertidos em etanol (Tabela 3) na realidade estão subestimadas devido ao etanol produzido e retido no interior das células não ter sido medido (PANCHAL & STEWART, 1980). Segundo PANCHAL & STEWART (1980) e HARALDSON & ROSEN (1982) é possível que parte dos açúcares consumidos durante as fermentações sejam utilizados para a produção de biomassa e síntese de compostos de carbono como proteínas, lipídeos e polissacarídeos junto com numerosos outros produtos metabólicos secundários como glicerol, ésteres, aldeídos e cetonas. É interessante obser

var no entanto (Tabelas 3, 7, 8, 9 e 10), que a levedura M300A a 30°C, embora tenha apresentado menor eficiência com 12,30% do que com 16,50% de açúcares, apresentou crescimento celular semelhante nos três tratamentos. A 35°C também, as quantidades de açúcares consumidos e não detectados como transformados em etanol pelas duas leveduras foram menores com 20,60% de açúcares, enquanto que não ocorreram diferenças acentuadas no crescimento celular observado nas diferentes concentrações de açúcares. Situações semelhantes são observadas quando se compara temperaturas e linhagens. Apesar de ambas leveduras terem apresentado maior aumento no número de células/ml a 30°C do que a 35°C nas duas menores concentrações de açúcares, as percentagens médias referentes à eficiência foram semelhantes nas duas temperaturas. O fermento Fleischmann, a 35°C, apresentou maior crescimento que a M300A; entretanto, as duas leveduras foram igualmente eficientes. A partir destes resultados não é possível relacionar as percentagens de açúcares consumidos e não detectados como transformados em etanol com a produção de biomassa. Observa-se, entretanto, que houve uma combinação de efeitos de concentração de açúcares e temperatura. A partir disto é possível supor que com 20,60% de açúcares a pressão osmótica é maior dificultando em maior grau a difusão do etanol de dentro para fora das células, o que está de acordo com PANCHAL & STEWART (1980) e BEAVEN *et alii* (1982), e que, na temperatura de 35°C, a produção de eta-

no é mais rápida do que a 30°C, fato este observado por NAGODAWITHANA *et alii*, 1974; NAGODAWITHANA & STEINKRAUS, 1976; NAVARRO & DURAND, 1978; WILLIAMS & MUNECKE, 1981; KOSARIC *et alii*, 1982 e SLININGER *et alii*, 1982. Estes dois efeitos combinados contribuíram para uma concentração de etanol intracelular mais alta, além de sua retenção nas células por um período de tempo maior. A alta concentração de etanol assim formada poderia ter efeitos inibitórios na utilização de açúcares para produção de outros metabólitos. A formação de concentrações mais altas de etanol dentro das células decorrente de uma maior concentração de açúcares não explica por si só os resultados em questão, pois a 30°C não foram detectadas diferenças significativas entre as percentagens médias referentes à eficiência obtidas com 20,60% e 12,30% de açúcares (Tabelas 3 e 8). A partir dos resultados relativos à eficiência, pode-se dizer que as leveduras M300A e Fleischmann toleram 20,60% de açúcares e as concentrações de etanol formadas com a mesma.

5.1.2. Viabilidade

No que concerne à viabilidade das células de leveduras no processo de fermentação alcoólica podemos considerar diferentes situações. Conforme NAGODAWITHANA *et alii*

(1974), o alto conteúdo de açúcar pode afetar a taxa de glicólise restringindo o suprimento de energia para a sobrevivência das células. De acordo com as observações de PANCHAL & STEWART (1980), o aumento da pressão osmótica pode promover a retenção de maiores quantidades de etanol dentro das células por dificultar a difusão do mesmo para o meio externo. Esta retenção de etanol dentro das células tem um efeito detrimental sobre a viabilidade celular. A ação do produto final (etanol) sobre a cadeia glicolítica causa uma redução do nível de energia, a qual resulta em menor atividade metabólica, causando a morte da célula (NAGODAWITHANA *et alii*, 1974). Segundo BROWN *et alii* (1981), a morte da célula resulta da ação mais geral do etanol como desnaturante de proteína. Finalmente, quantidades aumentadas de etanol presente no meio também diminuem a viabilidade celular, embora seja menos prejudicial que o etanol intracelular (NAGODAWITHANA & STEINKRAUS, 1976). Verificou-se neste estudo que, a 30°C, a linhagem M300A manteve viabilidade acentuadamente mais alta na menor concentração de açúcares e o fermento Fleischmann também a manteve mais alta com 12,30% de açúcares em relação àquela mantida com 20,60% (Tabelas 4 e 8). Parece ser possível não considerar que a taxa de glicólise tenha sido afetada por alto conteúdo de açúcares e/ou de etanol intracelular causando diminuição no nível de energia com consequente morte das células, pois, se este tivesse sido o caso, provavelmente os rendimen-

tos médios obtidos nas fermentações conduzidas com 20,60% de açúcares teriam sido significativamente mais baixos do que nas menores concentrações. É esperado que uma diminuição na taxa de glicólise decorra numa diminuição da produção de etanol. Assim, há razões para aceitar que a menor viabilidade das leveduras em estudo com 20,60% de açúcares tenha sido devida à maior quantidade de etanol extracelular produzido e/ou maior quantidade de etanol ter sido formada intracelularmente, decorrente da maior pressão osmótica, as quais tiveram efeito desnaturante sobre as proteínas causando a morte das células.

A viabilidade significativamente menor a 35°C do que a 30°C (Tabelas 4 e 9) pode ser relacionada a um acúmulo de maiores quantidades de etanol dentro das células, em decorrência de uma atividade metabólica mais rápida (NAGODAWITHANA & STEINKRAUS, 1976), o qual pode ter tido efeito desnaturante (BROWN *et alii*, 1981) e, ou, reduzido a taxa de glicólise causando uma redução no nível de energia e, conseqüentemente, morte da célula (NAGODAWITHANA *et alii*, 1974). É possível relacionar os resultados também com o fato de que, em decorrência de uma atividade metabólica mais rápida, os requerimentos energéticos podem ter sido maiores e a energia derivada da glicólise pode não ter sido suficiente para manter as células vivas. Ainda, o crescimento celular, menor que a 30°C, pode não ter sido suficiente para refletir numa viabilidade

mais alta (NAGODAWITHANA *et alii*, 1974).

Relacionando os resultados observados com o etanol extracelular produzido e, de acordo com as significâncias encontradas quando da comparação de médias (Tabela 8), a 30°C, a quantidade de etanol produzida com 16,50% de açúcares (9,50% v/v) já é suficiente para aumentar acentuadamente a mortalidade das células da levedura M300A em relação à observada com a quantidade de etanol produzida com 12,30% (7,00% v/v). Para o fermento Fleischmann, aumento significativo na mortalidade das células ocorreu quando a quantidade de etanol aumentou de 6,94% (v/v - 12,30% de ART) para 11,66% (v/v - 20,60% de ART). A 35°C, a quantidade de etanol produzida com 12,30% de açúcares (7,04% v/v) pela M300A é tão prejudicial quanto às produzidas com as duas maiores concentrações de açúcares redutores totais. A levedura Fleischmann, no entanto, foi mais sensível à quantidade de etanol produzida com 16,50% de açúcares (8,93% v/v) em relação à produzida com 12,30% (6,94% v/v). Seria esperado, que a percentagem média de células viáveis nas fermentações conduzidas com 20,60% de açúcares fosse também significativamente menor em relação à observada com 12,30%. Só é possível relacionar este fato ao maior crescimento celular observado com 20,60% de açúcares redutores, o que compensou as células mortas, se bem que, estatisticamente a variação ocorrida no número de células nesta concentração de açúcares

foi semelhante às aquelas observadas com 12,30% e 16,50%.

As células da levedura M300A foram mais sensíveis que as da Fleischmann mesmo à quantidade de etanol produzida com 12,30% de açúcares (7,00% v/v). A resistência de uma levedura à uma quantidade de etanol que ela produz está principalmente associada à facilidade com a qual ela o excreta (NAVARRO & DURAND, 1978). Uma possível explicação da tolerância ao etanol é que ela é manifestada por aquelas linhagens que têm capacidade intrínseca para resistir aos efeitos desnatantes do etanol (ROSE & BEAVEN, 1981).

Como discutido previamente no item 5.1.1. e está mostrado nas Tabelas 2, 3, 8 e 9, os rendimentos e as eficiências a 30°C não foram afetados pela concentração de açúcares nem pelo etanol produzido. Na concentração de 12,30% de açúcares os rendimentos não foram afetados pela temperatura, enquanto que as eficiências foram maiores a 35°C do que a 30°C quando o mosto de fermentação continha 20,60% de açúcares. Comparando estes resultados com os discutidos acima, pode ser verificado que o efeito do etanol sobre a viabilidade é mais severo do que sobre a fermentação. Estes resultados vêm de encontro aos de BROWN *et alii* (1981) que encontraram constantes de inibição distintas para os efeitos do etanol sobre a fermentação e sobre a viabilidade celular. De acordo com estes autores, este fato tem importantes implica

ções para o isolamento de linhagens tolerantes ao etanol. Mu tantes com viabilidade melhorada na presença de etanol podem ser selecionados por simples teste de placa, desde que, em al_{tas} concentrações de etanol o efeito é de tudo ou nada. Entre tanto, tal técnica não pode ser usada para isolar mutantes que tenham taxas de fermentação mais rápidas em altas concentrações de etanol, desde que, neste caso, o efeito é gradativo.

Os resultados obtidos mostram que, dentre os conjuntos de condições experimentados, cerca de 12,30% de açúcares redutores totais a 30°C, correspondem às condições nas quais há melhor utilização de açúcares e a viabilidade é mantida acima de 80% para a levedura M300A e de 90% para a Fleischmann. Este resultado particularmente se compara com a observação de Greenshields*, citado por HARALDSON & BJORLING (1981), de que em fermentações descontínuas, 12,00% de açúcares redutores totais representa o melhor balanço entre recuperação econômica de etanol e inibição.

5.1.3. Multiplicação celular

É fato bem conhecido que as leveduras necessi-

*GREENSHIELDS, R.N. *Ethanol*. Octagon Croup, Weizman Centenary Meeting, 1974.

tam de oxigênio para crescimento satisfatório (Pasteur*, citado por MARKHAM, 1969). MARKHAM (1969) mostrou que o oxigênio durante o processo de fermentação atua como um fator de crescimento e não como acceptor terminal de elétrons da cadeia respiratória. No entanto, BROWN (1914) e COWLAND & MAULE (1966) verificaram que o crescimento de leveduras numa fermentação pode ocorrer sob condições totalmente anaeróbicas, embora em menor grau do que na presença de ar. Foi sugerido (COWLAND & MAULE, 1966 e MARKHAM, 1969), que diferentes linhagens de leveduras podem variar nas suas capacidades para crescerem anaerobicamente, isto é, apresentam requerimentos para oxigênio diferentes. Além disso, a composição do mosto é importante particularmente considerando aqueles fatores de crescimento que podem somente ser sintetizados aerobicamente (Suomalainen *et alii***, citados por COWLAND & MAULE, 1966); a sua ausência conduziria à parada do crescimento sob condições anaeróbicas.

Neste trabalho as células de leveduras utilizadas para fermentação foram previamente multiplicadas sob intensa aeração. BROWN (1914) sugeriu que leveduras têm capacidade para reter o efeito do oxigênio dentro das células e

*PASTEUR, L. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 52:1260, 1861.

**SUOMALAINEN, H.; NURMINEN, T.; VIHHERVAARA, K.; OURA, E.
Journal of the Institute of Brewing, 227, 1965.

usá-lo anaerobicamente mais tarde. Fundamentados nesta observação, é razoável considerar aqui também a possibilidade de que durante o processo de multiplicação das células fatores de crescimento que são podem ser sintetizados aerobicamente, e que são importantes para o crescimento anaeróbico (Stier *et alii** e Andreassen & Stier**, citados por MARKHAM, 1969), tenham sido formados, estocados e utilizados posteriormente pelas células durante as fermentações anaeróbicas. HAUKELE & LIE (1971) verificaram que o crescimento foi muito maior quando fermentações anaeróbicas foram conduzidas com inóculo preparado aerobicamente do que anaerobicamente. Os autores relacionaram estes resultados com a produção de fatores de crescimento anaeróbico durante a preparação do inóculo aerado.

O crescimento de leveduras pode ser negativamente afetado pelo aumento da concentração de açúcares tanto sob condições aeróbicas como anaeróbicas (GHOSE & TYAGI, 1979b). Do mesmo modo, o aumento da concentração de etanol adicionado ao meio de cultivo (TROYER, 1953; HOLZBERG *et alii*, 1967; AIBA *et alii*, 1968; BAZUA & WILKE, 1977; GHOSE & TYAGI, 1979b; BROWN *et alii*, 1981 e NOVAK *et alii*, 1981) como de etanol produzido

*STIER, T.J.S.; SCALF, R.E.; BROCKMAN, M.C. *Journal Bacteriology*, 59:45, 1950.

**ANDREASEN, A.A.; STIER, T.J.B. *Journal Cellular Comp. Physiol.*, 41:23, 1953.

(NAVARRO & DURAND, 1978 e NOVAK *et alii*, 1981) implicam numa diminuição do crescimento celular. De acordo com alguns autores (HOLZBERG *et alii*, 1967; BAZUA & WILKE, 1977 e BROWN *et alii*, 1981), em leveduras, há uma concentração limite de etanol abaixo da qual não ocorre efeitos observáveis sobre o crescimento. Outros (BEAVEN *et alii*, 1982), entretanto, contestam a existência de tal concentração limiar. Como pode ser visto nas Tabelas 7 e 8, a 30°C, não ocorreu diminuição do crescimento com o aumento da concentração de açúcares e de etanol produzido. Situação semelhante foi observada quanto às percentagens de brotamento e de brotos vivos (Tabelas 5, 6 e 8). Estes resultados não permitem concluir que o crescimento das leveduras aqui estudadas não tenha sido inibido em um certo grau pelas concentrações de açúcares utilizadas e/ou quantidades de etanol produzidas a partir das mesmas. Esta conclusão seria possível se concentrações mais baixas de açúcares, e de etanol, tivessem sido utilizadas. Pode-se afirmar apenas que 12,30%, 16,50% e 20,60% de açúcares redutores totais e as respectivas quantidades de etanol produzidas a 30°C não foram suficientes para inibir completamente o crescimento das leveduras, e que, os efeitos das mesmas, se ocorreram, em termos de grau de inibição, foram semelhantes. A concentração de etanol na qual o crescimento é completamente inibido varia de acordo com a linhagem de levedura utilizada, com as condições fisiológicas do microrganismo e com as condições ambientes sob

as quais eles são crescidos (GHOSE & TYAGI, 1979b e BAZUA & WILKE, 1977).

Foi verificado, que o brotamento, a viabilidade dos brotos e o crescimento celular foram negativamente afetados pelo aumento da temperatura (Tabelas 5, 6, 7 e 9). RICHARDS (1928a e b) mostrou que acima de 30°C o processo de brotamento é criticamente afetado e o crescimento cai rapidamente. Assim, o aparente aumento da eficácia do etanol na temperatura mais alta, pode ser explicada, parcialmente pelas taxas de multiplicação diminuídas que ocorrem somente como um resultado do aumento da temperatura, e, talvez parcialmente, pelo maior conteúdo de etanol intracelular acumulado na maior temperatura (NAVARRO & DURAND, 1978 e NOVAK *et alii*, 1981). De acordo com LOUREIRO & VAN UDEN (1982), o etanol diminui a temperatura máxima de crescimento. TROYER (1953) verificou que o número de células por mililitro formadas a 35°C foi significativamente menor que a 30°C mesmo na ausência de etanol; mas na presença deste, a diminuição foi muito mais acentuada. BROWN *et alii* (1981) observaram que a ação do etanol sobre o crescimento é muito complexa por ocasionar redução na taxa de crescimento e diminuição da viabilidade celular. Como já discutido no ítem 5.1.2. e de acordo com o contraste entre as médias (Tabela 9), a viabilidade das duas leveduras foram marcadamente menores a 35°C . Os resultados obtidos podem ser

relacionados com as observações dos referidos autores. As menores percentagens de brotos vivos, a 35°C, parecem ser devidas à maior inibição do brotamento e à maior mortalidade dos brotos já formados. Observe-se (Tabelas 5 e 6) que as percentagens de brotos vivos foram menores que as de brotamento.

Na temperatura de 35°C a levedura M300A apre-sentou maiores percentagens de brotamento e de brotos vivos nas fermentações conduzidas com 12,30% de açúcares (Tabelas 5, 6 e 8), evidenciando que a quantidade de etanol produzida a partir de 16,50% já foi suficiente para inibir significativa-mente a formação de brotos e causar morte dos mesmos. Entre-tanto, não foram detectadas diferenças significativas entre as variações ocorridas quanto aos números de células por mililitro para as três concentrações de açúcares (Tabelas 7 e 8). Nem sempre as células em brotamento eram viáveis, o que deve ter impedido que os brotos em formação, embora vivos, dessem origem à novas células. Estes resultados não mostram, portan-to, qualquer relação entre percentagens de brotamento, de bro-tos vivos e crescimento celular. No entanto, uma relação direta pode ser feita entre crescimento e viabilidade celular, visto que as percentagens médias da última também foram semelhantes nas três concentrações de açúcares redutores (Tabelas 4 e 8). Por outro lado, a 30°C, é possível relacionar positiva-mente o aumento no número de células por mililitro com percen

tagens de brotamento e de brotos vivos, pois para os três parâmetros não foram observadas diferenças significativas entre as médias obtidas nas três concentrações de açúcares (Tabelas 5, 6, 7 e 8). No entanto, os aumentos nos números de células não podem ser relacionados com a viabilidade celular, uma vez que esta foi acentuadamente maior com 12,30% de açúcares (Tabelas 4, 7 e 8). Isto significa que a queda da viabilidade nas duas maiores concentrações de açúcares não foram suficientes para refletir em crescimento menor do que com 12,30%. Para o fermento Fleischmann só foi possível estabelecer relação positiva entre os aumentos nos números de células por mililitro e percentagens de brotamento a 30°C (Tabelas 5, 7 e 8).

Embora a linhagem M300A tenha apresentado maiores percentagens de brotamento e de brotos vivos que o fermento Fleischmann a 35°C, este resiste a maiores concentrações de etanol, visto que, o seu brotamento e viabilidade dos brotos só foram significativamente afetados pela quantidade de etanol produzida com 20,60% de açúcares (Tabelas 5, 6 e 8).

Comparando-se leveduras a 30°C, novamente não foi encontrada qualquer relação entre crescimento e percentagens de brotamento, de brotos vivos e viabilidade celular, pois, a levedura M300A apresentou menor viabilidade e maiores percentagens de brotamento e de brotos vivos do que o fermento

to Fleischmann, enquanto que não foram detectadas diferenças significativas entre os aumentos nos números de células por mililitro observados para as duas leveduras (Tabelas 4, 5, 6, 7 e 10). A 35°C também não foi possível relacionar crescimento com percentagens de brotamento e de brotos vivos, visto que a linhagem M300A aumentou menos seu número de células por mililitro, embora tenha apresentado maiores percentagens de brotamento e de brotos vivos que o fermento Fleischmann (Tabelas 5, 6, 7 e 10). Por outro lado, uma relação positiva pode ser observada entre crescimento e viabilidade celular (Tabelas 4, 7 e 10).

As maiores percentagens de brotamento e de brotos vivos apresentados pela levedura M300A a 30°C em relação à Fleischmann, pode ser decorrente de uma capacidade da primeira de formar maior número de brotos por célula e de um ciclo celular mais lento. A levedura Fleischmann, embora formasse menor número de brotos por célula, se multiplicava mais rapidamente. Desse modo, pode ter havido compensações e os aumentos nos números de células por mililitro das duas leveduras serem semelhantes. É possível também, que maiores percentagens de brotamento e de brotos vivos observadas para a linhagem M300A tenham sido decorrentes de um acúmulo de brotos como consequência da formação dos mesmos seguida de morte das células. Veja que a viabilidade da M300A foi acentuada-

mente menor que a do fermento Fleischmann (Tabelas 4 e 10).

No entanto, as diferenças na viabilidade das duas leveduras não foram suficientes para refletirem em diferenças no crescimento. Os resultados a 35°C também podem ser relacionados a estes dois fatores; porém, a maior queda da viabilidade da levedura M300A refletiu num crescimento menor que o da Fleischmann.

ZAGO (1982) verificou uma correlação positiva entre a quantidade de matéria seca produzida e percentagem de brotamento tanto para a levedura M300A como para a Fleischmann. Com os resultados obtidos neste trabalho nem sempre foi possível relacionar crescimento e brotamento celular; provavelmente devido aos efeitos do etanol sobre a formação de brotos e a viabilidade celular, bem como à metodologia empregada para contagem de brotos.

Pode ser verificado a partir dos resultados obtidos neste estudo, que, a 30°C, cerca de 20,60% de açúcares e 11,70% (v/v) de etanol produzido não são suficientes para inibir completamente o crescimento das leveduras M300A e Fleischmann, ou melhor, comparando com o crescimento ocorrido com 12,30% de açúcares, cerca de 7,00% (v/v) de etanol, a concentração de açúcares e de etanol acima referidas não exercem maiores efeitos sobre o crescimento. A 35°C, entretanto, 12,30% de açúcares e/ou as quantidades de etanol produzidas a partir da mes

ma (7,00% - v/v), são suficientes para diminuir significativamente o crescimento de ambas leveduras quando comparado com os resultados observados a 30°C.

Comparando estes resultados com aqueles obtidos para viabilidade celular a 30°C e 35°C, discutidos no item 5.1.2., verifica-se que o efeito do etanol sobre a viabilidade de também é mais severo do que sobre o crescimento. Novamente, os resultados vêm de encontro com os de BROWN *et alii* (1981) que encontraram uma constante de inibição para o crescimento diferente daquela para viabilidade celular, sendo que, o efeito do etanol sobre o primeiro é menos severo do que sobre a segunda.

Durante a fermentação, é desejável que algum crescimento ocorra para substituir as células mortas, bem como aquelas perdidas durante os processos de centrifugação e de reciclagem das células para o fermentador (NAGODAWITHANA *et alii*, 1974). Sob as condições experimentais empregadas neste trabalho, o crescimento de ambas leveduras não foi suficiente para manter a viabilidade celular após dez fermentações.

5.2. Avaliação de caracteres fermentativos sob diferentes concentrações de sorbitol - Tolerância à pressão osmótica

5.2.1. Produção de etanol

PANCHAL & STEWART (1980) verificaram que *Saccharomyces uvarum* (carlsbergensis) produziu mais etanol no meio sem sorbitol do que em meios acrescidos com o referido açúcar. Os resultados foram relacionados à uma parcial inibição da produção de etanol, bem como à retenção de mais etanol intracelularmente por um tempo maior nos meios com alta osmolaridade. Nos experimentos aqui conduzidos, maiores concentrações de etanol intracelular podem ter sido formadas com o aumento da pressão osmótica. No entanto, não é possível relacionar a obtenção de menores quantidades de etanol, com o aumento da pressão osmótica (Tabelas 11 e 17), à retroinibição da cadeia glicolítica pelo etanol (NAGODAWITHANA *et alii*, 1974), pois, como inferido neste trabalho (item 5.1.2.) e como mostrado por BROWN *et alii* (1981), o efeito do etanol sobre a taxa de fermentação é menos severo do que sobre a viabilidade celular. Observe-se (Tabelas 14 e 17) que esta foi mantida nas mesmas percentagens em todos tratamentos, inclusive semelhantes à viabilidade inicial.

Foi verificado por GRAY (1945), que *Saccharomyces cerevisiae* utiliza menos glicose a concentrações mais al

tas do açúcar, e que, a concentração de glicose na qual a inibição torna-se evidente é aproximadamente a mesma que causa plasmólise das células. O autor inferiu então, que as inibições pelo açúcar observadas, são devidas, pelo menos em parte, ao fenômeno osmótico. Segundo ele, as células seriam incapazes de funcionarem normalmente se parcial ou totalmente plasmolisadas. GRAY reconheceu no entanto que é possível que açúcares exerçam outros efeitos que não o osmótico sobre as células. Durante a fermentação alcoólica por leveduras, um aumento na concentração de substrato geralmente resulta em maior atividade metabólica (SOLS *et alii*, 1971 e PANCHAL & STEWART, 1980). Entretanto, a concentrações muito altas de soluto, o efeito da pressão osmótica torna-se pronunciado e uma diminuição na taxa de respiração é observada. Esta redução na taxa de respiração promove diminuição no metabolismo total e, conseqüentemente, reduz a utilização do substrato bem como a produção de etanol pelas células de leveduras (PANCHAL & STEWART, 1980). Como pode ser visto na Tabela 20 as quantidades totais de açúcares consumidos foram praticamente semelhantes nas fermentações controle e naquelas conduzidas com m^ôstos contendo 15,00%, 20,00% e 25,00% de sorbitol. Portanto, a obtenção de menores quantidades de etanol com o aumento da concentração de sorbitol até 25,00% não pode ser relacionada à diminuição da atividade metabólica das células, embora alguma desidratação das mesmas tenha ocorrido (compare as Tabelas 15 e

16). Também não é possível relacionar estes resultados com menores quantidades de matéria seca (Tabelas 16 e 17) visto que, logo na primeira fermentação, a qual foi iniciada com quantidades iguais de células (matéria seca), ocorreram diferenças acentuadas nas quantidades de etanol obtidas com o aumento da concentração de sorbitol. A partir destes fatos, parece que o aumento da pressão osmótica causou a retenção de maiores quantidades de etanol dentro das células, e, consequentemente, menos etanol foi recuperado. Visto que o aumento ocorrido nos pesos secos não foi maior com o aumento da concentração de sorbitol (Tabelas 16 e 17), não é possível relacionar utilização de mais açúcar para produção de biomassa nas concentrações mais altas de sorbitol. É possível, porém, que parte do açúcar tenha sido utilizado para a produção de metabólitos secundários como glicerol, ésteres, aldeídos e cetonas (PANCHAL & STEWART, 1980 e HARALDSON e ROSÉN, 1982).

A partir do fato das concentrações de etanol obtidas com as leveduras M300A e Fleischmann nas fermentações conduzidas com 15,00% e 20,00% de sorbitol terem sido semelhantes (Tabelas 11 e 17), pode-se supor ter ocorrido a retenção de quantidades aproximadamente iguais de etanol intracelularmente. O mesmo pode ser inferido para a semelhança observada entre as concentrações de etanol obtidas com a linhagem M300A nas fermentações conduzidas com 20,00% e 25,00% de sorbitol. As me

nores quantidades de etanol obtidas nas fermentações com 30,00% de sorbitol em relação às demais (Tabelas 11 e 17), podem ter sido devidas, à maior retenção de etanol intracelularmente e à menor produção do mesmo, decorrente de uma atividade metabólica mais baixa, como consequência da desidratação mais acentuada das células (Tabelas 15 e 17). Observe-se (Tabela 20) que o consumo de açúcar na referida concentração de sorbitol foi acentuadamente menor do que nas fermentações controle e demais concentrações de sorbitol.

Tomando-se a produção média de etanol, rendimento ou eficiência como critérios para avaliação da tolerância à pressão osmótica, 11,00% de açúcares mais 15,00% de sorbitol (cerca de 25,80° Brix) já exerce efeitos significativos sobre as células das leveduras M300A e Fleischmann, sendo que, exceto a 30,00% de sorbitol, a primeira é mais sensível que a segunda (Tabelas 11 e 18). A obtenção de menores quantidades de etanol com a levedura M300A do que com a Fleischmann nas fermentações conduzidas com 15,00%, 20,00% e 25,00% de sorbitol não pode ser relacionada à uma atividade metabólica mais baixa da primeira, nem às menores quantidades de células (peso seco), visto que as duas leveduras consumiram quantidades semelhantes de açúcares redutores (Tabelas 18 e 20). Assim, pode ser inferido que a maior sensibilidade à pressão osmótica da linhagem M300A é reflexo de uma maior resistência à difusão do etanol de den

tro para fora das células (NAVARRO & DURAND, 1978).

A ocorrência de diferenças significativas entre as percentagens referentes à eficiência observadas nas fermentações controles e aquelas conduzidas com sorbitol (Tabela 17) evidencia que a partir de quantidades aproximadamente iguais de açúcares que foram consumidos, menores quantidades de etanol foram obtidas. Quanto às semelhanças nas eficiências apresentadas pela levedura M300A com 20,00% e 30,00%, e 25,00% e 30,00% de sorbitol e pelo fermento Fleischmann com 25,00% e 30,00% de sorbitol são devidas a que, na maior concentração, além de menores quantidades de etanol terem sido obtidas, menores quantidades de açúcares foram consumidas resultando numa aproximação das eficiências. A semelhança entre as percentagens de açúcares consumidos e transformados em etanol apresentadas pela levedura M300A com 15,00% e 25,00% de sorbitol e pelo fermento Fleischmann com 20,00% e 25,00% de sorbitol sugeriria que com 25,00%, além de menores quantidades de etanol terem sido obtidas, menores quantidades de açúcares foram consumidas. No entanto, como pode ser visto nas Tabelas 17 e 20, as quantidades de açúcares consumidas nas três concentrações de sorbitol referidas foram praticamente semelhantes.

5.2.2. Viabilidade

Os resultados obtidos neste estudo (Tabelas 14 e 17) permitem supor que a concentração de 11,00% de açúcares e as quantidades de etanol produzidas com esta, apesar do maior acúmulo de etanol intracelular que possa ter ocorrido em função do aumento da concentração de sorbitol (PANCHAL & STEWART, 1980), não foram suficientes para afetar a cadeia glicolítica e causar morte das células das leveduras M300A e Fleischmann (NAGODAWITHANA *et alii*, 1974). Do mesmo modo, a pressão osmótica exercida por até 11,00% de açúcares mais 30,00% de sorbitol (cerca de 37,00° Brix), apesar de ter causado desidratação das células (Tabela 15), não afetou a atividade metabólica (GRAY, 1945), pelo menos em níveis que causassem a morte celular. Considerando-se, portanto, a viabilidade celular como critério para avaliação da tolerância à pressão osmótica, as leveduras M300A e Fleischmann são igualmente tolerantes (Tabelas 14 e 18) e resistem mesmo à pressão exercida por 11,00% de açúcares redutores mais 30,00% de sorbitol (cerca de 37,00° Brix).

5.2.3. Peso celular

Trabalhando com *Saccharomyces carlsbergensis*, NAVARRO & DURAND (1978) atribuíram a parada do crescimento celular essencialmente ao etanol intracelular. BROWN *et alii*

(1981) demonstraram que o efeito do etanol sobre o crescimento é menos severo do que sobre a viabilidade celular. Considerando estas observações, os menores aumentos nos pesos de células secas apresentadas pelas leveduras M300A e Fleischmann nas fermentações conduzidas com 25,00% e 30,00% de sorbitol (Tabelas 16 e 17) não podem ser atribuídos à inibição do crescimento pelas maiores concentrações de etanol intracelular pois, as mesmas, não foram suficientes para provocar a morte das células.

Em espécies de *Saccharomyces* um aumento na concentração de glicose até 10,00% resultou num aumento do crescimento (HOLCBERG & MARGALITH, 1981), enquanto que, a concentrações acima desta, o crescimento foi reduzido (HOLCBERG & MARGALITH, 1981 e WADA *et alii*, 1981). Resultados semelhantes foram obtidos com bactérias *Zymomonas mobilis* (ROGERS *et alii*, 1979) e *Zymomonas anaerobia* (KOSARIC *et alii*, 1982). O crescimento da última foi baixo e a produção de biomassa muito pobre a 35,00% de glicose, enquanto que nenhum crescimento foi observado quando o meio continha 40,00% de glicose. O grau de inibição do crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* foi mais alto com hidrolizado de celulose do que com açúcar puro (glicose). Isto pode ter sido devido à presença de açúcares no hidrolizado que não passam por fermentação tais como xilose, celobiose e celodextrinas de alto peso (GHOSE & TYAGI, 1979b). Com *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* em cul

tivo contínuo, o crescimento foi sustentado a concentrações de matéria seca variando até 20,00% (HARALDSON & ROSEN, 1982). Segundo ANDREWS (1968), em culturas descontínuas, o resultado primário da inibição do crescimento pelo substrato é um aumento da fase lag. Entretanto, na ausência de morte do organismo, o substrato eventualmente pode ser metabolizado. Como pode ser visto nas Tabelas 15, 16 e 17, tanto a levedura M300A como a Fleischmann, apresentaram aumentos semelhantes nos pesos secos nas fermentações controle e com 15,00% e 20,00% de sorbitol. No entanto, os aumentos ocorridos nos pesos úmidos foram significativamente menores na medida em que a concentração de sorbitol foi aumentada, chegando inclusive, a 30,00% de sorbitol, ser verificado sua diminuição. Estes resultados evidenciam a ocorrência de desidratação das células. Os menores aumentos nos pesos úmidos observados com 25,00% e 30,00% de sorbitol podem ser atribuídos ao menor crescimento ocorrido nestes tratamentos e à desidratação das células. É possível relacionar os menores aumentos nos pesos secos observados nas duas maiores concentrações de sorbitol, à maior desidratação das células, que, embora pudessem continuar a metabolizar, tinham seu processo de divisão afetado.

As diferenças observadas entre os pesos úmidos das leveduras M300A e Fleischmann são reflexos dos menores aumentos nos pesos secos da primeira (Tabelas 15, 16 e 18). Considerando-se as variações nos pesos secos para avaliar a tole

rância à pressão osmótica, as leveduras M300A e Fleischmann resistem uma pressão exercida por até 11,00% de açúcares redutores mais 20,00% de sorbitol (cerca de 29,80^o Brix), sendo que, a linhagem M300A é mais sensível do que o fermento Fleischmann. No entanto, se as variações nos pesos úmidos são utilizados como critério, junto com as variações nos pesos secos, ambas leveduras são sensíveis mesmo a 11,00% de açúcares redutores mais 15,00% de sorbitol (cerca de 25,80^o Brix), visto que, a desidratação das células já foi significativamente maior neste tratamento em relação ao controle.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem apresentar as seguintes conclusões:

- As leveduras M300A e Fleischmann apresentam produtividade semelhante. No entanto a produção total de etanol pela primeira torna-se menor devido, principalmente, à maior queda da viabilidade;

- A alta taxa de morte das células limita tornar a produção de etanol mais rápida pelo aumento da temperatura, bem como a obtenção de altas concentrações de etanol pelo aumento da concentração de açúcares:

- Os efeitos do etanol sobre a fermentação são menos severos do que sobre a multiplicação e viabilidade celular, e, os efeitos sobre a última, são mais severos do que sobre a multiplicação celular;

- A concentração de 12,30% de açúcares a 30°C

correspondem às melhores condições sob as quais há melhor utilização de açúcares e a viabilidade celular é mantida acima de 80% para a levedura M300A e de 90% para a Fleischmann;

- Nem sempre é possível relacionar multiplicação celular com percentagens de brotamento, possivelmente devido aos efeitos do substrato e do etanol sobre estes parâmetros, à viabilidade celular e/ou ao método empregado para a contagem dos brotos;

- O aumento da temperatura é acompanhada por uma diminuição da tolerância ao etanol;

- A desidratação das células ocasionadas por alta pressão osmótica limita a obtenção de altas concentrações de etanol pelo aumento da concentração de substrato;

- Há variação de resposta quanto à tolerância ao etanol conforme o critério de avaliação considerado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIBA, S.; SHODA, M.; NAGATANI, M. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, X(6):845-864, 1968.

AMORIN, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; ZAGO, E.A. *Novos Métodos Analíticos para Controle da Fermentação Alcoólica*. Ciência e Tecnologia, Seleção e Uso de Microrganismos. São Paulo, Informação Técnico Científica SBM, Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1982. 58 p. (Série Manuais Técnicos Científicos).

ANDREWS, J.F. A mathematical model for continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. *Biotechnology and Bioengineering*, X(6):707-723, 1968.

AUGUSTIN, H.W.; KOPPERSCHLÄGER, G.; STEFFEN, H.; HOFFMANN, E. Hexokinase als begrenzender faktor des anaeroben glucoseverbrauches von *Saccharomyces carlsbergensis* NCYC 74. *Biochimica et Biophysica Acta*, 110:437-439, 1965.

- BAJPAI, P. & MARGARITIS, A. Ethanol inhibition kinetics of *Kluyveromyces marxianus* grown on Jerusalem Artichoke juice. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(6):1325-1329, 1982.
- BAZUA, C.D. & MILKE, C.R. Ethanol effects on the kinetics of a continuous fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, (73):105-118, 1977.
- BEAVEN, M.J.; CHARPENTIER, C.; ROSE, A.H. Production and tolerance of ethanol in relation to phospholipid fatty-acyl composition in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 431. *The Journal of General Microbiology*, 128 (Parte 7):1447-1455, 1982.
- BELAICH, J.P.; BELAICH, A.; SIMONPIETRI, P. Uncoupling in bacterial growth. Effect of pantothenate starvation on growth of *Zymomonas mobilis*. *Journal General Microbiology*, 70:179-185, 1972.
- BENÍTEZ, T.; DEL CASTILLO, L.; AGUILERA, A.; CONDE, J.; CERDÁ-OLMEDO, E. Selection of wine yeasts for growth and fermentation in the presence of ethanol and sucrose. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(5):1429-1436, 1983.

BROWN, H.T. Some studies on yeast. *Annals of Botany*, 28(60): 197-226, 1914.

BROWN, A.D. Microbial water stress. *Bacteriology Review*, 40:803-846, 1976.

BROWN, S.W.; OLIVER, S.G. HARRISON, D.E.F.; RIGHELATO, R.C. Ethanol inhibition of yeast growth and fermentation: differences in the magnitude and complexity of the effect. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 11(3):151-155, 1981.

CASEY, G.P.; MAGNUS, C.A.; INGLEDEW, W.M. High-gravity brewing: Effects of nutrition on yeast composition, fermentative ability, and alcohol production. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(3):639-646, 1984.

CIFTCI, T.; CONSTANTINIDES, A.; WANG, S.S. Optimization of conditions and cell feeding procedures for alcohol fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, XXV:2007-2023, 1983.

COHN, E.J.; GURD, F.R.N.; SURGENOR, D.M.; BARNES, B.A.; BROWN, R.K.; DEROUAEX, G.; GILLESPIE, J.M.; KAHNT, F.W.; LEVER, W.F.; LIU, C.H.; MITTELMAN, D.; MOUTON, R.F.; SCHMID, K.; UROMA, E. A system for the separation of the components of human blood: quantitative procedures for the separation of the protein components of human plasma. *Journal of the American Chemical Society*, 72:465-474, 1950.

- COWLAND, T.W.; MAULE, D.R. Some effects of aeration on the growth and metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in continuous culture. *Journal of the Institute of Brewing*, 72(5):480-488, 1966.
- CYSEWSKI, G.R. & WILKE, C.R. Utilization of cellulosic materials through enzymatic hydrolysis. I. Fermentation of hydrolysate to ethanol and single-cell protein. *Biotechnology and Bioengineering*, 18:1297-1313, 1976.
- CYSEWSKI, G.R. & WILKE, C.R. Rapid ethanol fermentation using vacuum and cell recycle. *Biotechnology and Bioengineering*, XIX(8):1125-1143, 1977.
- DAY, A.; ANDERSON, E.; MARTIN, P.A. Ethanol tolerance of brewing yeasts. In European Breweries Convention - Proceedings of the 15th Congress. Amsterdam, Elsevier Scientific Publishing Co, 1975. 377-391.
- EDWARDS, H.V. The influence of high substrate concentration on microbial kinetics. *Biotechnology and Bioengineering*, 12:679-712, 1970.
- FLOR, P.Q. & HAYASHIDA, S. *Saccharomyces uvarum inulyticus* var. nov., a new high concentration ethanol tolerant yeast from rice wine. *European Journal Applied Microbiology Biotechnology*, 18:148-152, 1983.

- FRAENKEL, D.G. The biochemical genetics of glycolysis in microbes. In HOLLAENDER, A.; RABSON, P.; ROGERS, P.; SAN-PIETRO, A.; VALENTINE, R.; WOLFE, R. *Trends in the Biology of Fermentations for Fuels and Chemicals*. London, Plenum Press, 1981. 201-215.
- GHOSE, T.K. & TYAGI, R.D. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. I. Batch versus continuous systems. *Biotechnology and Bioengineering*, XXI(8):1387-1400, 1979a.
- GHOSE, T.K. & TYAGI, R.D. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. II. Product and substrate inhibition and optimization of fermentor design. *Biotechnology and Bioengineering*, XXI(8):1401-1420, 1979b.
- GHOSE, T.K. & BANDYOPADHYAY, K.K. Rapid ethanol fermentation in immobilized yeast cell reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, XXII(7):1489-1496, 1980.
- GOMA, G.; MORENO, M.; STREHAIANO, P. Mechanism of inhibition during alcohol fermentation in strict anaerobiosis. In GHOSE, T.K. *Proceedings of the Symposium on Bioconversion and Bioengineering*. New Delhi: Indian, Institute of Technology, 1981. 97-112.
- GRAY, W.D. Studies on the alcohol tolerance of yeasts. *Journal of Bacteriology*, 42:561-574, 1941.
- GRAY, W.D. The sugar tolerance of four strains of distillers yeast. *Journal of Bacteriology*, 49:445-452, 1945.

GRAY, W.D. The acclimatization of yeast to high concentrations of glucose: Subsequent effect upon alcohol tolerance.

Journal of Bacteriology, 52:703-709, 1946.

GRAY, W.D. Further studies on the alcohol tolerance of yeast: Its relationship to cell storage products. *Journal of Bacteriology*, 55:53-59, 1948.

GRAY, W.D. & SOVA, C. Relationship of molecular size and structure to alcohol inhibition of glucose utilization by yeast. *Journal of Bacteriology*, 72:349-356, 1956.

GREEN, D.E.; MURER, E.; HULTIN, K.O.; RICHARDSON, S.H.; SALMON, B.; BRIERLEY, G.P.; BAUM, H. Association of integrated metabolic pathways with membranes. I. Glycolytic enzymes of the red blood corpuscle and yeast: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 122:635-647, 1965.

HARALDSON, A. & BJÖRLING, T. Yeast strains for concentrated substrates. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 13:34-38, 1981.

HARALDSON, A. & ROSEN, C.G. Studies on continuous ethanol fermentation of sugar cane molasses. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 14:220-224, 1982.

HARRISON, J.J. & GRAHAM, J.C. Yeasts in distillery practice. In ROSE, A.H. & HARRISON, J.S. *The Yeast*. New York, Academic Press, 1970. Vol. 3, 283-348.

- HAUKELI, A.D. & LIE, S. Experimental conditions affecting yeast growth. *Journal of the Institute of Brewing*, 77(3): 253-258, 1971.
- HAYASHIDA, S.; FENG, D.D.; HONG, M. Function of the high concentration alcohol-producing factor. *Agricultural Biological Chemistry*, 38(10):2001-2006, 1974.
- HAYASHIDA, S.; FENG, D.D.; HONGO, M. Physiological properties of yeast cells grown in the proteolipid-supplemented media. *Agricultural Biological Chemistry*, 35(5):1025-1031, 1975.
- HAYASHIDA, S.; FENG, D.D.; OHTA, K.; CHAITTOMVONG, S.; HONGO, M. Composition and role of *Aspergillus oryzae* - proteolipid as a high concentration alcohol-producing factor. *Agricultural Biological Chemistry*, 40(1):73-78, 1976.
- HAYASHIDA, S.; OHTA, K. Cell structure of yeast grown anaerobically in *Aspergillus oryzae* - proteolipid-supplemented media. *Agricultural Biological Chemistry*, 42(6):1139-1145, 1978.
- HAYASHIDA, S.; OHTA, K. Effects of phosphatidylcholine or ergosterol oleate on physiological properties of *Saccharomyces sake*. *Agricultural Biological Chemistry*, 44(11): 2561-2567, 1980.

- HO, N.W.Y. Yeast alcohol tolerance and recombinant DNA for improved alcohol production process. In TSAO, G.T. *Annual Reports on Fermentation Process*. Academic Press, 1980. Vol. 4, 235-266.
- HOLCBERG, I.B. & MARGALITH, P. Alcoholic fermentation by immobilized yeast at high sugar concentrations. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 13(3): 133-140, 1981.
- HOLZBERG, I.; FINN, R.K.; STEINKRAUS, K.H. A kinetic study of the alcoholic fermentation of grape juice. *Biotechnology and Bioengineering*, IX:413-427. 1967.
- JANSSENS, J.H.; BURRIS, N.; WOODWARD, A.; BAILEY R.B. Lipid-enhanced ethanol production by *Kluyveromyces fragilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 45,(2):598-602, 1983.
- KOSARIC, N.; KONG, S.L.; DUVNJAK, Z. Fuel alcohol biosynthesis by *Zymomonas anaerobia*: Optimization studies. *Biotechnology and Bioengineering*, XXIV (3):691-701, 1982.
- KROWEL, P.G. Production of ethanol by immobilized yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, 45(4):646, 1979.
- KUNKEE, R.E. & AMERINE, M.A. Yeasts in wine making. In ROSE, A.H. & HARRISON, J.S. *The Yeast*. New York, Academic Press, 1970. Vol. 3, 26-38.

- LEÃO, C. & VAN UDEN, N. Effects of ethanol and other alkanols on the glucose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, XXIV:2601-2604, 1982.
- LEE, K.J.; TRIBE, D.E.; ROGERS, P.L. Ethanol production by *Zymomonas mobilis* in continuous culture at high glucose concentrations. *Biotechnology Letters*, 1(10):421-426, 1979. Apud *Microbiology Abstract*, 15(7):22, 1980 (Resumo).
- LEE, K.J. & ROGERS, P.L. Kinetics of alcohol fermentation at high yeast levels. *Biotechnology and Bioengineering*, XXI (8):1477-1482, 1979.
- LEE, J.H.; WILLI MSON, D.; ROGERS, P.L. The effect of temperature on the kinetics of ethanol production by *Saccharomyces uvarum*. *Biotechnology Letters*, 2(4):141-146, 1980. Apud *Microbiology Abstract*, 15(10):24, 1980 (Resumo).
- LEE, S.S.; ROBINSON, F.M.; WANG, H.Y. Rapid determination of yeast viability. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, (11):641-649, 1981.
- LEE, K.J.; SKOTNICKI, M.L.; TRIBE, D.E.; ROGERS, P.L. The kinetics of ethanol production by *Zymomonas mobilis* on fructose and sucrose media. *Biotechnology Letters*, 3(5): 207-212, 1981. Apud *Microbiology Abstract*, 16(11):20, 1981.

- LEMOIGNE, M.; AUBERT, J.P.; MILLET, M. La production d'alcool e le rendement de croissance de la levure de boulangerie cultivée en aérobiose. *Annales de L'Institute Pasteur*, 87(4):427-439, 1954.
- LOUREIRO, V. & VAN UDEN. N. Effects of ethanol on the maximum temperature for growth of *Saccharomyces cerevisiae*. A model. *Biotechnology and Bioengineering*, XXIV: 1881-1884, 1982.
- LOUREIRO, V. & FERREIRA, H.G. On the intracellular accumulation of ethanol in yeast. *Biotechnology and Bioengineering*, XXV: 2263-2269, 1983.
- MAGASANIK, B. Catabolic repression. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 26:249-256, 1961.
- MARGARITIS, A. & WILKE, C.R. The rotor fermentor. II Application to ethanol fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 20:727-753, 1978.
- MARGARITIS, A. & BAJPAI, P. Effect of sugar concentration in Jerusalem Artichoke extract on *Kluyveromyces marxianus* growth and ethanol production. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(2):723-725, 1983.
- MARKHAM, E. The role of oxygen in brewery fermentation. *Wallerstein Laboratories Communications*, XXXII (107):5-14, 1969.

- MCCRACKEN, L.D. & GONG, C.S. Fermentation of cellulose and hemicellulose carbohydrates by thermotolerant yeast. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, (12):91-102, 1982.
- MORTIMER, R.H. & HAWTHORNE, D.C. Yeast genetics. In ROSE, A.H. & HARRISON, J.S. *The yeast*. New York, Academic Press, 1969. 508.
- MOTÁ, M.; STREHAINO, P.; GOMA, G. Studies on conjugate effects of substrate (glucose) and product (ethanol) on cell growth kinetics during fermentation of different yeast strains. *Journal of the Institute of Brewing*, 90: 359-362, 1984.
- MOULIN, G.; BOZE, H.; GALZY, P. Inhibition of alcoholic fermentation by substrate and ethanol. *Biotechnology and Bioengineering*, XXII (11):2375-2381, 1980.
- MOWSRAY, J. & MOSES, V. The tentative identification in *Escherichia coli* of a multienzyme complex with glycolytic activity. *European Journal of Biochemistry*, 66:25-36, 1976.
- NAGODAWITHANA, T.W.; CASTELLANO, C.; STEINKRAUS, K.H. Effect of dissolved oxygen, temperature, initial cell count and sugar concentration on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in rapid fermentation. *Applied Microbiology*, 28(3):383-391, 1974.

- NAGODAWITHANA, T.W.; STEINKRAUS, K.H. Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in "rapid fermentation". *Applied and Environmental Microbiology*, 31(2): 158-162, 1976.
- NAGODAWITHANA, T.W.; WITT, J.T. e CUTAIA, A.J. Study of the fee-back effect of ethanol on selected enzymes of the glycolytic pathway. *Journal of the American Society of Brewing Chemistry*, 35:179-183. 1977.
- NAVARRO, J.M. & DURAND, G. Fermentation alcoolique influence de la température sur l'accumulation d'alcool dans les cellules de levure. *Annales de Microbiologie*, 129 B(2):215-224, 1978.
- NAVARRO, J.M. & FINK, J.D. *Saccharomyces uvarum* hexokinase behavior during alcoholic fermentation. *Cell and Molecular Biology*, 28(1):85-89, 1982.
- NOVAK, M.; STREHAIANO, P.; MORENO, M.; GOMA, G. Alcoholic fermentation: On the inhibitory effect of ethanol. *Biotechnology and Bioengineering*, XXIII (1):201-211, 1981.
- OHTA, K. & HAYASHIDA, S. Role of tween 80 and monoolein in a lipid-sterol-protein complex which enhances ethanol tolerance of saké yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(4):821-825, 1983.

- PANCHAL, C.J. & STEWART, G.G. The effect of osmotic pressure on the production and excretion of ethanol and glycerol by brewing yeast strain. *Journal of the Institute of Brewing*, 86:207-210, 1980.
- RAHN, O. The decreasing rate of fermentation. *Journal of Bacteriology*, 18:207-226, 1929.
- RAMLINGAM, E. & FINK, R.N. The vacuform process. A new approach to fermentation alcohol. *Biotechnology and Bioengineering*, 19:383-589, 1977.
- RICHARDS, O.W. Rate of multiplication of yeast at different temperatures. *Journal of Physiology and Chemistry*, 32:1865-1871, 1928a.
- RICHARDS, O.W. The growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. I. The growth curve, its mathematical analysis, and the effect of temperature on yeast growth. *Annals of Botany*, 42:271-283, 1928b.
- ROGERS, P.L.; LEE, K.J.; TRIBE, D.E. Kinetics of alcohol production by *Pseudomonas mobilis* at high sugar concentrations. *Biotechnology Letters*, 1(4):165-170, 1979. Apud *Microbiology Abstract*, 14(10):14, 1979.
- ROSE, D. Yeasts for molasses alcohol. *Process Biochemistry*, 12(36):10-12, 1976.
- ROSE, A.H. & BEAVEN, M.J. End-product tolerance and ethanol. In HOLLADENDER, A.; RABSON, R.; ROGERS, P.; SAN-PIETRO, A.; VALENTINE, R.; WOLFE, R. *Trends in the Biology of Fermentations for Fuels and Chemicals*. London, Plenum Press, 1981. vol.18, 513-531.

- ROTHSTEIN, A.; JENNINGS, D.H.; DEMIS, C.; BRUCE, M. The relationship of fermentation to cell structure in yeast. *Biochemical Journal*, 71:99-106, 1959.
- SINCLAIR, N.A. & STOKES, J.L. Obligately psychrophilic yeasts from the polar regions. *Canadian Journal Microbiology*, 11::259-269, 1965.
- SLININGER, P.J.; BOTHAST, R.J.; VAN CAUWENBERGE, J.E.; KURTZMAN, C.P. Conversion of d-xylose to ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnology and Bioengineering*, XXIV (2):371-384, 1982.
- SNEDECOR, G.M. & COCHRAN, W.G. *Statistics Methods*. 6^a edição, Iowa, The Iowa State University Press, 1973. 593p.
- SOLS, A.; GANCEDO, C.; DELAFUENTE, G. Energy-yielding metabolism in yeasts. In ROSE, A.H. & HARRISON, J.S. *The Yeast*. London, Academic Press, 1971. Vol. 2, 271-307.
- STEINKRAUS, K.H. & MORSE, R.A. Factors influencing the fermentation of honey and mead production. *Journal Apicultural Research*, 5:17-26, 1966.
- STOUTHAMER, A.H. & BETTENHAUSEN, C. Utilization of energy for growth and maintenance of continuous and batch cultures of microorganisms. *Biochimica and Biophysica Acta*, 301:53-70, 1973.

- SWANSON, W.H. & CLIFTON, C.E. Growth and assimilation in cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 56:115-124, 1948.
- THOMAS, D.S.; HOSSACK, J.A.; ROSE, A.H. Plasma-membrane lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*, 117:239-245, 1978.
- THOMAS, D.S. & ROSE, A.H. Inhibitory effect of ethanol on growth and solute accumulation by *Saccharomyces cerevisiae* as affected by plasma-membrane lipid composition. *Archives of Microbiology*, 122:49-55, 1979.
- TROYER, J.R. A relation between cell multiplication and alcohol tolerance in yeasts. *Micologia*, 45(1):20-39, 1953.
- VIEIRA, S. *Introdução à Bioestatística*. Rio de Janeiro, Editora Campos Ltda, 1981. 294p.
- WADA, M.; KATO, J.; CHIBATA, I. Continuous production of ethanol using immobilized growing yeast cells. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 10(4):275-287, 1980.
- WADA, M.; KATO, J.; CHIBATA, I. Continuous production of ethanol in high concentration using immobilized growing yeast cells. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 11(2):67-71, 1981.

- WANG, H.Y.; ROBINSON, F.M.; LEE, S.S. Enhanced alcohol production through on-line extraction. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, (11):555-565, 1981.
- WILLIAMS, D. & MUNNECKE, D.H. The production of ethanol by immobilized yeast cells. *Biotechnology and Bioengineering*, XXIII (8):1813-1825, 1981.
- ZAGO, E.A. Efeito da concentração de N, P, Mg, Mn e Zn na multiplicação de leveduras industriais. Piracicaba, 1982. 125p. (Doutor - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/Universidade de São Paulo).
- ZINES, D.O. & ROGERS, P.L. The effect of ethanol on continuous culture stability. *Biotechnology and Bioengineering*, XII (4):561-575, 1970.
- ZINES, D.O. & ROGERS, P.L. A chemostat at study of ethanol inhibition. *Biotechnology and Bioengineering*, XIII(2):293-308, 1971.