

**FATORES QUE AFETAM A FORMAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS
BEM COMO OUTROS PARÂMETROS DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA**

DENISE MARIA GÂNDARA ALVES
Engenheira Agrônoma

Orientador: Prof. Dr. LUIZ CARLOS BASSO

**Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Mestre em
Ciências, Área de Concentração: Fisiologia e
Bioquímica de Plantas.**

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Janeiro - 1994

À minha mãe

Maria Júlia P. F. Gândara Alves

(in memoriam)

Dedico

Ao meu orientador

Luiz Carlos Basso

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Expresso a minha profunda gratidão às pessoas e instituições que contribuíram para concretização deste trabalho, nomeadamente:

- . À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP, pela formação acadêmica;**
- . Ao Departamento de Química da ESALQ/USP, pelo acolhimento, desde a Iniciação Científica;**
- . Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Basso, pelo aprendizado propiciado durante os anos de convivência;**
- . Ao Prof. Dr. Luiz Eduardo Gutierrez pelo incentivo e amizade;**
- . Ao Prof. Dr. Henrique Viana de Amorim, pelo apoio e incentivo entusiasta;**
- . À equipe técnica do setor de Bioquímica, de ontem e de hoje: Admir, Claudinei, Cometa, Cristina, Fafá, Regina, Suzana (*in memoriam*), Vera, Silvânia, na pessoa de Claudemir Domingos Bernardino;**
- . Aos colegas, coordenadores e professores do Curso de Fisiologia e Bioquímica de Plantas;**
- . À CAPES e FERMENTEC S/C LTDA. pelo auxílio financeiro concedido;**
- . À Nadir H. Voltarelli, pela simpatia e digitação do exemplar original e à Sueli, Luciana e Raquel da FERMENTEC, pelo apoio;**
- . À minha família, por tudo.**

SUMÁRIO

| | Página |
|--|---------------|
| LISTA DE FIGURAS | ix |
| LISTA DE TABELAS | xxi |
| RESUMO | xxxv |
| SUMMARY | xxxvii |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 3 |
| 2.1. Metabolismo de carboidratos na levedura | 3 |
| 2.1.1. Degradação do substrato e formação de alguns produtos da fermentação | 4 |
| 2.1.1.1. Etanol..... | 5 |
| 2.1.1.2. Glicerol..... | 8 |
| 2.1.1.3. Ácidos orgânicos..... | 10 |
| 2.1.1.3.1. Ácido succínico | 10 |
| 2.1.1.3.2. Ácido acético | 16 |
| 2.1.2. Trealose e seu significado para a célula | 19 |
| 2.2. Alguns fatores que afetam a fermentação alcoólica | 23 |
| 2.2.1. Nitrogênio | 23 |
| 2.2.2. Potássio | 28 |
| 2.2.3. Sulfito..... | 31 |
| 2.2.4. Concentração de substrato..... | 37 |
| 2.2.5. pH | 41 |
| 2.2.6. Temperatura | 44 |
| 2.2.7. Diferentes leveduras e concentrações de inóculo..... | 47 |
| 2.2.8. Contaminação bacteriana | 51 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 56 |
| 3.1. Ensaios de fermentação com ciclos de leveduras | 56 |
| 3.1.1. Leveduras | 56 |
| 3.1.2. Meios fermentativos | 56 |

| | |
|---|-----------|
| 3.1.2.1. Meios semi-sintéticos | 56 |
| 3.1.2.2. Meios de melaço..... | 57 |
| 3.1.3. Condução dos experimentos..... | 58 |
| 3.1.3.1. Efeito de diferentes fontes nitrogenadas | 59 |
| 3.1.3.2. Efeito do potássio (KCl) em meio semi-sintético | 59 |
| 3.1.3.3. Efeito do potássio (K ₂ SO ₄) em meio de melaço. | 60 |
| 3.1.3.4. Efeito do sulfito | 60 |
| 3.1.3.5. Efeito de concentrações de substrato | 61 |
| 3.1.3.6. Efeito de diferentes valores de pH | 61 |
| 3.1.3.7. Efeito da temperatura | 62 |
| 3.1.3.8. Efeito de concentrações de inóculo | 62 |
| 3.1.3.9. Efeito de diferentes leveduras | 63 |
| 3.1.1.10. Efeito da contaminação bacteriana..... | 63 |
| 3.1.4. Análises microbiológicas | 65 |
| 3.1.4.1. Viabilidade celular..... | 65 |
| 3.1.4.2. Contaminação bacteriana | 65 |
| 3.1.5. Análises nos meios fermentativos | 65 |
| 3.1.5.1. Açúcares redutores totais (ART) | 65 |
| 3.1.6. Análise nos vinhos delevurados | 66 |
| 3.1.6.1. Açúcares redutores residuais (AR) | 66 |
| 3.1.6.2. Glicerol..... | 66 |
| 3.1.6.3. Etanol e eficiência fermentativa..... | 66 |
| 3.1.6.4. Ácidos orgânicos | 67 |
| 3.1.7. Análise na levedura | 68 |
| 3.1.7.1. Trealose | 68 |
| 3.2. Ensaio de cinética da fermentação | 68 |
| 3.3. Análises estatísticas..... | 69 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 70 |
| 4.1. Otimização dos parâmetros da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência | 70 |
| 4.2. Formação de alguns produtos no transcorrer da fermentação alcoólica | 77 |
| 4.2.1. Etanol..... | 77 |

| | |
|---|-----|
| 4.2.2. Ácidos orgânicos e trealose | 77 |
| 4.3. Alguns fatores que afetam a fermentação alcoólica | 83 |
| 4.3.1. Efeito de diferentes fontes nitrogenadas | 83 |
| 4.3.2. Efeito do potássio..... | 91 |
| 4.3.3. Efeito do sulfito | 102 |
| 4.3.4. Efeito de diferentes concentrações de substrato | 108 |
| 4.3.5. Efeito de diferentes valores de pH | 115 |
| 4.3.6. Efeito de diferentes temperaturas | 122 |
| 4.3.7. Efeito de diferentes concentrações de inóculo | 128 |
| 4.3.8. Efeito de diferentes leveduras | 134 |
| 4.3.9. Efeito da contaminação bacteriana | 140 |
| 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 147 |
| 5.1. Formação de alguns produtos no transcorrer da fermentação alcoólica | 147 |
| 5.2. Eficiência fermentativa..... | 148 |
| 5.3. Relações estequiométricas entre o glicerol e o ácido succínico | 148 |
| 5.4. Ácidos láctico e acético..... | 151 |
| 5.5. Trealose | 151 |
| 6. CONCLUSÕES | 154 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 157 |
| APÊNDICE | 200 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|---|---------------|
| 1. Formação de etanol, glicerol, acetato e trealose, a partir da glicólise anaeróbica, ressaltando as reações de oxidorredução. | 7 |
| 2. Vias biossintéticas do succinato: (a) redutiva e (b) oxidativa, ressaltando as reações de oxidorredução..... | 13 |
| 3. Perfil cromatográfico dos padrões 2mM dos ácidos orgânicos quantificados, com os respectivos tempos de retenção em minutos. Ácido succínico (13,41), ácido láctico (14,11) e ácido acético (17,01) | 71 |
| 4. Perfil cromatográfico dos ácidos orgânicos presentes no meio semi-sintético, com os respectivos tempos de retenção em minutos. Ácido sulfúrico (6,08), ácido cítrico (7,91), ácidos isocítrico e alfa-cetoglutárico (8,76), não identificado (9,79), ácidos pirúvico, málico e glioxílico (10,76), ácido succínico (13,53), ácido láctico (14,26), ácidos fumárico e fórmico (15,53), ácido acético (17,08) e o tempo 20,94 minutos correspondeu ao etanol..... | 73 |
| 5. Perfil cromatográfico dos ácidos orgânicos presentes no vinho proveniente de meio semi-sintético, com os respectivos tempos de retenção em minutos. Ácido cítrico (7,85), ácidos isocítricos e alfa- | |

- cetoglutárico (8,56), ácidos pirúvico e málico e glioxílico (de 10,26 a 10,76), não identificados (11,70 e 12,65), ácido succínico (13,40), ácido láctico (14,23), e ácido acético (17,00) 74
6. Perfil cromatográfico dos ácidos orgânicos presentes no meio de melaço com os respectivos tempos de retenção em minutos. Não identificado (9,79), ácidos trans-aconítico, pirúvico e málico (de 10,44 a 10,74), ácido succínico (13,30), ácido láctico (14,10), ácido fumárico (14,92), ácido fórmico (15,49), ácido acético (17,00) e o tempo 20,82 correspondeu ao etanol..... 75
7. Perfil cromatográfico dos ácidos orgânicos presentes no vinho proveniente do meio de melaço com os respectivos tempos de retenção em minutos. Não identificado (9,52), ácido trans-aconítico (10,31), ácidos pirúvico e málico (11,57), não identificado (12,51), ácido succínico (13,37), ácido láctico (14,11), ácido fumárico (14,84), ácido fórmico (15,44) e ácido acético (16,97) 76
8. Formação de etanol (% V/V) e consumo de substrato (% P/V) no transcorrer da fermentação de meio semi-sintético com 14% ART%. Dados correspondentes média de duas repetições 79
9. Formação dos ácidos succínico, láctico e acético (mg/l) no transcorrer da fermentação de meio semi-sintético com 14% ART. Dados correspondentes média de duas repetições 80

- 10. Mobilização da trealose (% MS) e queda do pH externo no transcorrer da fermentação de meio semi-sintético com 14% ART. Dados correspondentes média de duas repetições 82**
- 11. Efeito de diferentes fontes nitrogenadas (testemunha, sulfato de amônio, uréia, citrato de amônio) em meio semi-sintético, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: (a) Eficiência fermentativa; (b) Formação de glicerol (g/100g Etanol); (c) Peso de fermento (g) 84**
- 12. Efeito de diferentes fontes nitrogenadas (testemunha, sulfato de amônio, uréia, citrato de amônio) em meio semi-sintético, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: (a) Viabilidade celular (%); (b) Teor de trealose na célula (% M.S.) antes de iniciar a fermentação e ao final do último ciclo; (c) Contaminação bacteriana (n° de bactérias $\times 10^{-6}$ /ml vinho)..... 86**
- 13. Efeito de diferentes fontes nitrogenadas (testemunha, sulfato de amônio, uréia, citrato de amônio) em meio semi-sintético, e três dos cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros (a) Formação de ácido succínico (mg/l vinho); (b) Formação de ácido láctico (mg/l vinho); (c) Formação de ácido acético (mg/l vinho) 88**
- 14. Efeito de diferentes fontes nitrogenadas (testemunha, sulfato de amônio, uréia, citrato de amônio) em meio semi-sintético, ao longo**

| | |
|---|-----------|
| de cinco ciclos fermentativos, sobre os valores do pH do vinho. .. | 90 |
| 15. Efeito de diferentes concentrações de potássio (390, 1170, 4290 e 8190 mgK/l) na forma de KCl em meio semi-sintético, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: (a) Eficiência fermentativa; (b) Formação de glicerol(g/100g Etanol); (c) Peso de fermento (g). | 92 |
| 16. Efeito de diferentes concentrações de potássio (390, 1170, 4290 e 8190 mgK/l) na forma de KCl em meio semi-sintético, ao longo de cinco ciclos fermentativos sobre os seguintes parâmetros: (a) Viabilidade celular (%); (b) Teor de trealose na célula (% M.S.) antes de iniciar a fermentação e ao final do último ciclo;(c) Contaminação bacteriana (nº de bactérias x 10⁻⁶/ml vinho)..... | 93 |
| 17. Efeito de diferentes concentrações de potássio (390, 1170, 4290 e 8190 mgK/l) na forma de KCl em meio semi-sintético, em três dos cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: (a)Formação de ácido succínico (mg/l vinho); (b) Formação de ácido láctico (mg/l vinho);(c) Formação de ácido acético (mg/l vinho)..... | 94 |
| 18. Efeito de diferentes concentrações de potássio (390, 1170, 4290 e 8190 mgK/l) na forma de KCl em meio semi-sintético, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os valores de pH do vinho | 95 |

- 19. Efeito de diferentes concentrações de potássio (2000; 4000 e 8000 mgK/l) na forma K_2SO_4 em meio de melaço, ao longo de seis ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: (a) Eficiência fermentativa; (b) Formação de glicerol (g/100g Etanol); (c) Peso do fermento (g)..... 96**
- 20. Efeito de diferentes concentrações de potássio (2000; 4000 e 8000 mgK/l) na forma K_2SO_4 em meio de melaço, ao longo de seis ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: (a) Viabilidade celular (%); (b) Teor de trealose na célula (% M.S.) antes de iniciar a fermentação e ao final o último ciclo; (c) Contaminação bacteriana (n° de bactérias $\times 10^{-6}$ /ml vinho)..... 97**
- 21. Efeito de diferentes concentrações de potássio (2000 e 8000 mgK/l) na forma K_2SO_4 em meio de melaço, em dois dos seis ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: (a) Formação de ácido succínico (mg/l vinho); (b) Formação de ácido láctico (mg/l vinho); (c) Formação de ácido acético (mg/l vinho)..... 98**
- 22. Efeito de diferentes concentrações de potássio (2000; 4000 e 8000 mgK/l) na forma K_2SO_4 em meio de melaço, ao longo de seis ciclos fermentativos, sobre os valores de pH do vinho 99**
- 23. Efeito de diferentes concentrações de sulfito (0; 100; 300mg SO_2 /l) em meio semi-sintético, ao longo de seis ciclos fermentativos, sobre**

- os seguintes parâmetros: (a) Eficiência fermentativa; (b) Formação de glicerol (g/100g Etanol); (c) Peso de fermento (g) 103
24. Efeito de diferentes concentrações de sulfito (0; 100; 300mg SO₂/l) em meio semi-sintético, ao longo de seis ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: (a) Viabilidade celular (%); (b) Teor de trealose na célula (% M.S.) antes de iniciar a fermentação ao final do último ciclo; (c) Contaminação bacteriana (n° de bactérias x 10⁶/ml vinho) 105
25. Efeito de diferentes concentrações de sulfito (0; 100; 300mg SO₂/l) em meio semi-sintético, em três dos seis ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: (a) Formação de ácido succínico (mg/l vinho); (b) Formação de ácido láctico (mg/l vinho); (c) Formação de ácido acético (mg/l vinho) 106
26. Efeito de diferentes concentrações de sulfito (0; 100; 300mg SO₂/l) em meio semi-sintético, ao longo de seis ciclos fermentativos, sobre os valores do pH do vinho 107
27. Efeito de diferentes concentrações de substrato (6; 12 e 18% ART) em meio de melaço, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: (a) Eficiência fermentativa; (b) Formação de glicerol (g/100g Etanol); (c) Peso de fermento (g) 111

- 28. Efeito de diferentes concentrações de substrato (6; 12 e 18% ART) em meio de melaço, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: (a) Viabilidade celular (%);(b) Teor de trealose na célula (% M.S.) antes de iniciar a fermentação e ao final do último ciclo; (c) Contaminação bacteriana (n° de bactérias $\times 10^{-6}$ /ml vinho) 112**
- 29.Efeito de diferentes concentrações de substrato (6 e 18% ART) em meio de melaço, em três dos cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: (a) Formação de ácido succínico (mg/l vinho); (b) Formação de ácido láctico (mg/l vinho); (c) Formação de ácido acético (mg/l vinho) 113**
- 30. Efeito de diferentes concentrações de substrato (6; 12 e 18% ART) em meio de melaço, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os valores do pH do vinho 114**
- 31. Efeito de diferentes valores de pH do meio semi-sintético (3,45; 4,40 e 4,92) ao longo de quatro ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros:(a) Eficiência fermentativa;(b) Formação de glicerol (g/100g Etanol); (c) Peso de fermento. 116**
- 32. Efeito de diferentes valores de pH do meio semi-sintético (3,45; 4,40 e 4,92) ao longo de quatro ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros; (a) Viabilidade celular (%); (b) Teor de**

| | |
|--|------------|
| trealose na célula (% M.S.) antes de iniciar a fermentação e ao final do último ciclo; (c) Contaminação bacteriana (n° de bactérias x 10 ⁻⁶ /ml vinho) | 117 |
| 33. Efeito de diferentes valores de pH do meio semi-sintético (3,45 e 4,92) em dois dos quatro ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros; (a) Formação de ácido succínico (mg/l vinho); (b) Formação de ácido láctico (mg/l vinho); (c) Formação de ácido acético (mg/l vinho)..... | 118 |
| 34.Efeito de diferentes valores de pH do meio semi-sintético (3,45;4,40 e 4,92) ao longo de quatro ciclos fermentativos, sobre os valores de pH do vinho..... | 119 |
| 35. Efeito de diferentes temperaturas de incubação (27; 33 e 38°C) em meio semi-sintético, ao longo de quatro ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros:(a) Eficiência fermentativa; (b) Formação de glicerol (g/100g Etanol); (c) Peso de fermento (g)..... | 124 |
| 36. Efeito de diferentes temperaturas de incubação (27; 33 e 38°C) em meio semi-sintético, ao longo de quatro ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros:(a) Viabilidade celular (%); (b) Teor de trealose na célula (% M.S.) antes de iniciar a fermentação e ao final do último ciclo; (c) Contaminação bacteriana (n° de bactérias x 10⁻⁶/ml vinho). | 125 |

- 37. Efeito de diferentes temperaturas de incubação (27 e 38°C) em meio semi-sintético, em três dos quatro ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros:(a) Formação de ácido succínico (mg/l vinho); (b) Formação de ácido láctico (mg/l vinho); (c) Formação de ácido acético (mg/l vinho) 126**
- 38. Efeito de diferentes temperaturas de incubação (27; 33 e 38°C) em meio semi-sintético, ao longo de quatro ciclos fermentativos, sobre os valores de pH do vinho 127**
- 39.Efeito de diferentes concentrações de inóculo (6, 11 e 16% em peso úmido) em meio de melaço, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: (a) Eficiência fermentativa; (b) Formação de glicerol (g/100g Etanol);(c) Peso de fermento (g)..... 129**
- 40. Efeito de diferentes concentrações de inóculo (6, 11 e 16% em peso úmido) em meio de melaço, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: (a) Viabilidade celular (%); (b) Teor de trealose na célula (% M.S.) antes de iniciar a fermentação e ao final do último ciclo; (c) Contaminação bacteriana (n° de bactérias x 10⁻⁶/ml vinho)..... 130**
- 41. Efeito de diferentes concentrações de inóculo (6, 11 e 16% em peso úmido) em meio de melaço, em dois dos cinco ciclos fermentativos,**

- sobre os seguintes parâmetros: (a) Formação de ácido succínico (mg/l vinho); (b) Formação de ácido lático (mg/l vinho); (c) Formação de ácido acético (mg/l vinho)..... 131
42. Efeito de diferentes concentrações de inóculo (6, 11 e 16% em peso úmido) em meio de melaço, ao longo de cinco ciclos fermentativos sobre os valores de pH do vinho 132
43. Efeito de diferentes leveduras [Fleischmann, IZ-1904 e TA (M-300-A)] inoculadas em meio de melaço, ao longo de seis ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: (a) Eficiência fermentativa; (b) Formação de glicerol (g/100g Etanol); (c) Peso de fermento (g)..... 135
44. Efeito de diferentes leveduras [Fleischmann, IZ-1904 e TA (M-300-A)] inoculadas em meio de melaço, ao longo de seis ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: (a) Viabilidade celular (%); (b) Teor de trealose na célula (% M.S.) antes de iniciar a fermentação e ao final do último ciclo; (c) Contaminação bacteriana (n° de bactérias $\times 10^{-6}$ /ml vinho)..... 137
45. Efeito de diferentes leveduras [Fleischmann, IZ-1904 e TA (M-300-A)] inoculadas em meio de melaço, em três dos seis ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: (a) Formação de ácido succínico (mg/l vinho); (b) Formação de ácido lático (mg/l

- vinho); (c) Formação de ácido acético (mg/l vinho)..... 138**
- 46. Efeito de diferentes leveduras [Fleischmann, IZ-1904 e TA (M-300-A)] inoculadas em meio de melaço, ao longo de seis ciclos fermentativos, sobre os valores do pH do vinho 139**
- 47. Efeito da contaminação bacteriana em meio semi-sintético (estéril; estéril + antibiótico; contaminado e contaminado + antibiótico), ao longo de três ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: (a) Eficiência fermentativa; (b) Formação de glicerol (g/100g Etanol); (c) Peso de fermento (g)..... 142**
- 48. Efeito da contaminação bacteriana em meio semi-sintético (estéril; estéril + antibiótico; contaminado e contaminado + antibiótico), ao longo de três ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: (a) Viabilidade celular (%); (b) Teor de trealose na célula (% M.S.) antes de iniciar a fermentação e ao final do último ciclo; (c) Contaminação bacteriana (n° de bactérias $\times 10^{-6}$ /ml vinho)..... 143**
- 49. Efeito da contaminação bacteriana em meio semi-sintético (estéril; estéril + antibiótico; contaminado e contaminado + antibiótico), ao longo de três ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: (a) Formação de ácido succínico (mg/l vinho); (b) Formação de**

| | |
|--|------------|
| ácido láctico (mg/l vinho); (c) Formação de ácido acético (mg/l vinho)..... | 144 |
| 50. Efeito da contaminação bacteriana em meio semi-sintético (estéril; estéril + antibiótico; contaminado e contaminado + antibiótico), ao longo de três ciclos fermentativos, sobre os valores de pH do vinho..... | 145 |

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|--|---------------|
| 01. Composição do meio semi-sintético básico..... | 7 |
| 02. Adições de KCl à água de diluição | 59 |
| 03. Adições realizadas por litro de meio semi-sintético básico | 61 |
| 04. Características dos meios definitivos do ensaio de pH | 62 |
| 05. Características dos meios contaminados em cada ciclo..... | 64 |
| 06. Comportamento dos níveis de piruvato durante a fermentação alcoólica | 78 |
| 07. Produção de etanol (%), consumo de substrato (ART%), produção dos ácidos succínico, láctico e acético (mg/l) bem como a variação do pH, da viabilidade celular (%) e dos teores de trealose(% M.S.) durante a fermentação alcoólica de meio semi- sintético com 14% ART e 10% de fermento Fleischmann | 201 |
| 08. Efeito de diferentes fontes nitrogenadas (testemunha, sulfato de amônio, uréia, citrato de amônio) sobre a velocidade de | |

- fermentação avaliada pela perda de peso (g) a cada hora, no decorrer de cinco ciclos fermentativos, empregando-se fermento prensado (Fleischmann) e meio semi-sintético incubados a 33 C ... 202
09. Efeito de diferentes fontes nitrogenadas (testemunha, sulfato de amônio, uréia, citrato de amônio) em meio semi-sintético, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: eficiência fermentativa; formação de glicerol (g/100g de Etanol) e peso de fermento (g)..... 203
10. Efeito de diferentes fontes nitrogenadas (testemunha; sulfato de amônio; uréia e citrato de amônio) em meio semi-sintético, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: viabilidade celular (%); teor de trealose na célula (% M.S.) antes de iniciar a fermentação e ao final do último ciclo; contaminação bacteriana (n° de bactérias $\times 10^{-6}$ /ml de vinho)..... 204
11. Efeito de diferentes fontes nitrogenadas (testemunha, sulfato de amônio, uréia, citrato de amônio) em meio semi-sintético, em três dos cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: formação de ácido succínico (mg/l vinho), formação de ácido láctico (mg/l vinho) e formação de ácido acético (mg/l vinho), já descontados os teores de dos ácidos presentes nos meios 205

- 12. Efeito de diferentes fontes nitrogenadas (testemunha, sulfato de amônio, uréia, citrato de amônio) em meio semi-sintético, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os valores do pH do vinho e açúcares redutores residuais (AR% P/V)..... 206**
- 13. Efeito de diferentes concentrações de potássio (390, 1170, 4290 e 8190 mgK/l) na forma de KCl sobre a velocidade de fermentação avaliada pela perda de peso (g) a cada hora, no transcorrer de cinco ciclos fermentativos, empregando-se fermento prensado (Fleischmann) em meio semi-sintético incubados a 33 C. Cada dado representa a média de três repetições..... 207**
- 14. Efeito de diferentes concentrações de potássio (390, 1170, 4290 e 8190 mgK/l) na forma de KCl, em meio semi-sintético, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: eficiência fermentativa; formação de glicerol (g/100g de Etanol) e peso de fermento (g)..... 208**
- 15. Efeito de diferentes concentrações de potássio (390, 1170, 4290 e 8190 mgK/l) na forma de KCl em meio sintético, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: viabilidade celular (%), teor de trealose na célula (% M.S.) antes de iniciar a fermentação e ao final do último ciclo e contaminação bacteriana (nº de bactérias x 10⁻⁶ml vinho) 209**

16. Efeito de diferentes concentrações de potássio (390, 1170, 4290 e 8190mgK/l) na forma de KCl em meio semi-sintético, em três dos cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: formação de ácido succínico (mg/l vinho); formação de ácido láctico (mg/l vinho) e formação de ácido acético (mg/l vinho), já descontados os teores dos ácidos presentes no meio 210
17. Efeito de diferentes concentrações de potássio (390, 1170, 4290 e 8190 mgK/l) em meio de melação, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os valores de pH do vinho e açúcares redu to residuais (AR% P/V) 211
18. Efeito de diferentes concentrações de potássio (K_2SO_4), (2000, 4000 e 8000 mgK/l) na forma K_2SO_4 , sobre a velocidade de fermentação avaliada pela perda de peso (g) a cada hora, no transcorrer de seis ciclos fermentativos, empregando-se fermento prensado (Fleischmann) e meio semi-sintético incubados a 33 C. Cada dado representa a média de quatro repetições..... 212
19. Efeito de diferentes concentrações de potássio (2000, 4000 e 8000 mgK/l) na forma K_2SO_4 em meio de melação, ao longo de seis ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: eficiência fermentativa; formação de glicerol (g/100g de Etanol) e peso de fermento (g)..... 213

20. Efeito de diferentes concentrações de potássio (2000,4000 e 8000 mgK/l) na forma K_2SO_4 em meio de melaço, ao longo de seis ciclos fermentati vos, sobre os seguintes parâmetros: viabilidade celular (%);teor de trealose na célula (% M.S.) antes de iniciar a fermentação e ao final do último ciclo e contaminação bacteriana (n° de bactérias $\times 10^{-6}$ /ml vinho). 214
21. Efeito de diferentes concentrações de potássio (2000 e 8000 mgK/l) na forma K_2SO_4 em meio de melaço, em dois dos seis ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: formação de ácido succínico (mg/l vinho); formação de ácido láctico (mg/l vinho) e formação de ácido acético (mg/l vinho), já descontados os teores dos áci- dos presentes no meio..... 215
22. Efeito de diferentes concentrações de potássio (2000; 4000 e 8000 mgK/l) na forma K_2SO_4 em meio de melaço, ao longo de seis ciclos fermentativos, sobre os valores de pH do vinho e açúcares reductores residuais (AR% P/V)..... 216
23. Efeito de diferentes concentrações de sulfito (0, 100 e 300 mgSO₂/l sobre a velocidade de fermentação avaliada pela perda de peso (g) a cada hora, no transcorrer de seis ciclos fermentativos, empregando-se fermento prensado (Fleischmann) e meio semi-sintético incubados a 33 C..... 217

- 24. Efeito de diferentes concentrações de sulfito (0, 100 e 300 mg SO₂/l) em meio semi-sintético, ao longo de seis ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: eficiência fermentativa; formação de glicerol (g/100g de Etanol) e peso de fermento (g)..... 218**
- 25. Efeito de diferentes concentrações de sulfito (0; 100 e 300mg SO₂/l) em meio semi-sintético, ao longo de seis ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: viabilidade celular (%); teor de trealose na célula (% M.S.) antes de iniciar a fermentação e ao final do último ciclo e contaminação bacteriana (nº de bactérias x 10⁻⁶/ml vinho). 219**
- 26. Efeito de diferentes concentrações de sulfito (0, 100 e 300mg SO₂/l) em meio semi-sintético, em três dos seis ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: formação de ácido succínico (mg/l vinho); formação de ácido lático (mg/l vinho) e formação de ácido acético (mg/l vinho), já descontados os teores dos ácidos presentes no meio 220**
- 27. Efeito de diferentes concentrações de sulfito (0, 100 e 300mg SO₂/l) em meio semi-sintético, ao longo de seis ciclos fermentativos, sobre os valores do pH do vinho e açúcares redutores residuais (AR% P/V)..... 221**

- 28. Efeito de diferentes concentrações de substrato (6, 12 e 18% ART) sobre a velocidade de fermentação avaliada pela perda de peso (g) a cada hora, no transcorrer de cinco ciclos fermentativos, empregando-se meio de melaço e fermento prensado (Fleischmann) incubados a 33 C. Cada dado representa a média de quatro repetições 222**
- 29. Efeito de diferentes concentrações de substrato (6, 12 e 18% ART) em meio de melaço, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: eficiência fermentativa; formação de glicerol (g/100g de Etanol) e peso de fermento (g)..... 223**
- 30. Efeito de diferentes concentrações de substrato (6, 12 e 18% ART) em meio de melaço, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: viabilidade celular (%); teor de trealose na célula (% M.S.) antes de iniciar a fermentação e ao final do último ciclo e contaminação bacteriana (n° de bactérias $\times 10^{-6}$ /ml vinho)..... 224**
- 31. Efeito de diferentes concentrações de substrato (6 e 18% ART) em meio de melaço, em três dos cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: formação de ácido succínico (mg/l vinho); formação de ácido láctico (mg/l vinho) e formação de ácido acético (mg/l vinho), já descontados os teores dos ácidos presentes nos meios. 225**

- 32. Efeito de diferentes concentrações de substrato (6, 12 e 18% ART) em meio de melaço, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os valores de pH do vinho e açúcares redutores residuais (AR% P/V)..... 226**
- 33. Efeito de diferentes valores de pH sobre a velocidade de fermentação avaliada pela perda de peso (g) a cada hora, no transcorrer de quatro ciclos fermentativos, empregando-se fermento prensado (Fleischmann) e meio semi-sintético a 33 C. Cada dado representa a média de 4 repetições..... 227**
- 34. Efeito de diferentes valores de pH do meio semi-sintético (3,45; 4,40 e 4,92) ao longo de quatro ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: eficiência fermentativa; formação de glicerol (g/100g de Etanol) e peso de fermento (g)....... 228**
- .35. Efeito de diferentes valores de pH do meio semi-sintético (3,45; 4,40 e 4,92) ao longo de quatro ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: viabilidade celular (%); teor de trealose na célula (% M.S.) antes de iniciar a fermentação e ao final do último ciclo; contaminação bacteriana (n° de bactérias $\times 10^{-6}$ /ml vinho).. 229**
- 36. Efeito de diferentes valores de pH do meio semi-sintético (3,45 e 4,92) em dois dos quatro ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: formação de ácido succínico (mg/l vinho); formação**

- de ácido láctico (mg/l vinho) e formação de ácido acético (mg/l vinho),já descontados os teores dos ácidos presentes no meio..... 230
37. Efeito de diferentes valores de pH do meio semi-sintético (3,45, 4,40 e 4,92) ao longo de quatro ciclos fermentativos, sobre os valores de pH do vinho e açúcares redutores residuais (AR % P/V) 231
38. Efeito da temperatura sobre a velocidade de fermentação avaliada pela perda de peso (g) a cada hora, no transcorrer de quatro ciclos fermentativos, empregando-se fermento prensado (Fleischmann) e meio semi-sintético incubados a 33 C. Cada dado representa a média de quatro repetições..... 232
39. Efeito de diferentes temperaturas de incubação (27; 33 e 38 C) em meio semi-sintético, ao longo de quatro ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros eficiência fermentativa; formação de glicerol (g/100g de Etanol) e peso do fermento (g)..... 233
- 4.0. Efeito de diferentes temperaturas de incubação (27, 33 e 38 C) em meio semi-sintético, ao longo de quatro ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: viabilidade celular (%); teor de trealose (% M.S.) antes de iniciar a fermentação e ao final do último ciclo; contaminação bacteriana (n° de bactéria $\times 10^{-6}$ /ml vinho)..... 234

- 41. Efeito de diferentes temperaturas de incubação (27 e 38 C) em meio semi-sintético, em três dos quatro ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: formação de ácido succínico (mg/l vinho); formação e ácido láctico (mg/l vinho) e formação de ácido acético (mg/l vinho), já descontados os teores dos ácidos presentes no meio 235**
- 42. Efeito de diferentes temperaturas de incubação (27, 33 e 38 C) em meio semi-sintético, ao longo de quatro ciclos fermentativos, sobre o pH final do vinho e açúcares redutores residuais (AR % P/V)..... 236**
- 43. Efeito de diferentes concentrações de inóculo em meio de melão sobre a velocidade de fermentação estimada pela perda de peso (g) a cada hora, no transcorrer de 5 ciclos fermentativos, empregando-se fermento prensado (Fleischmann) 237**
- 44. Efeito de diferentes concentrações de inóculo (6, 11 e 16% em peso úmido) em meio de melão, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetro: eficiência fermentativa, produção de glicerol (g/100g de Etanol) e peso de fermento (g) 238**
- 45. Efeito de diferentes concentrações de inóculo (6, 11 e 16% em peso úmido) em meio de melão, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: viabilidade celular (%); teor de**

- trealose (% M.S.) antes de iniciar a fermentação e ao final do último ciclo; contaminação bacteriana (n° de bactéria $\times 10^{-6}$ /ml vinho)..... 239
46. Efeito de diferentes concentrações de inóculo (6, 11 e 16% em peso úmido) em meio de melaço, em dois dos cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: formação de ácido succínico (mg/l vinho), formação de ácido láctico (mg/l vinho) e formação de ácido acético (mg/l vinho), já descontados os teores dos ácidos presentes nos meios. 240
47. Efeito de diferentes concentrações de inóculo (6, 11 e 16% em peso úmido) em meio de melaço, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os valores de pH do vinho e açúcares redutores residuais (AR% P/V). 241
48. Efeito de diferentes leveduras [Fleischmann, IZ-1904 e TA(M-300-A)] sobre a velocidade de fermentação avaliada pela perda de peso (g) a cada hora, no transcorrer de seis ciclos fermentativos, empregando-se meio de melaço incubados a 33 C 242
49. Efeito de diferentes leveduras [Fleischmann, IZ-1904 e TA (M-300-A)] inoculadas em meio de melaço, ao longo de seis ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: eficiência

- fermentativa, formação de glicerol (g/100g de Etanol) e peso de fermento (g)..... 243
50. Efeito de diferentes leveduras [Fleischmann, IZ-1904 e TA(M-300-A) inoculadas em meio de melaço, ao longo de seis ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: viabilidade celular (%); teor de trealose na célula (% M.S.) antes de iniciar a fermentação e ao final do último ciclo e contaminação bacteriana (n° de bactérias $\times 10^{-6}$ mg/l vinho) 244
51. Efeito de diferentes leveduras [Fleischmann, IZ-1904 e TA(M-300-A)] inoculadas em meio de melaço, em quatro dos seis ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: formação de ácido succínico (mg/l vinho); formação de ácido láctico (mg/l vinho) e formação de ácido acético (mg/l vinho), já descontados os teores dos ácidos orgânicos presentes no meio..... 245
52. Efeito de diferentes leveduras [Fleischmann, IZ-1904 e TA(M-300-A)] inoculadas em meio de melaço, ao longo de seis ciclos fermentativos, sobre os valores de pH do vinho e açúcares redutores residuais (AR% P/V)..... 246
53. Efeito da contaminação bacteriana em meio semi-sintético (estéril; estéril + antibiótico; contaminado e contaminado + antibiótico) sobre a velocidade de fermentação avaliada pela perda de peso (g)

- a cada hora, no transcorrer de três ciclos fermentativos, empregando-se fermento prensado (Fleischmann) e meio sintético incubados a 33 C..... 247
54. Efeito da contaminação bacteriana em meio semi-sintético (estéril; estéril + antibiótico; conta minado e contaminado + antibiótico), em três ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: eficiência fermentativa; formação de glicerol (g/100g Etanol) e peso de fermento (g)..... 248
55. Efeito da contaminação bacteriana em meio semi-sintético (estéril; estéril + antibiótico; contaminado e contaminado + antibiótico), em três ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: viabilidade celular (%); teor de trealose na célula (% M.S.) antes de iniciar a fermentação e ao final do último ciclo e contaminação bacteriana (n° de bactérias $\times 10^{-6}$ /ml vinho) 249
56. Efeito da contaminação bacteriana em meio semi-sintético (estéril; estéril + antibiótico; contaminado e contaminado + antibiótico) sobre os seguintes parâmetros: formação de ácido succínico (mg/l vinho); formação de ácido láctico (mg/l vinho) e formação de ácido acético (mg/l vinho), já descontados os teores dos ácidos presentes nos meios 250

| | |
|---|------------|
| 57. Efeito da contaminação bacteriana em meio semi-sintético (estéril; estéril + antibiótico, contaminado e contaminado + antibiótico), sobre os valores de pH dos vinhos e açúcares redutores residuais (AR% P/V) | 251 |
|---|------------|

FATORES QUE AFETAM A FORMAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS BEM COMO OUTROS PARÂMETROS DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Autora: DENISE MARIA GÂNDARA ALVES

Orientador: Prof. Dr. LUIZ CARLOS BASSO

RESUMO

O presente trabalho objetivou avaliar o comportamento da levedura frente a diversos fatores físico (temperatura), químicos (pH do meio, teores excessivos do potássio, sulfito, diferentes concentrações de substrato e diferentes formas nitrogenadas) e microbiológicos (diferentes leveduras industriais, diferentes concentrações de levedura e efeito da contaminação bacteriana) em condições de fermentação.

As fermentações foram conduzidas com meios semi-sintéticos e de melão, com reciclo da levedura (3 a 6) empregando-se *Saccharomyces cerevisiae* de panificação (Fleischmann). No ensaio com diferentes leveduras empregou-se também *S. cerevisiae* M-300-A (TA) e *S. cerevisiae (uvarum)* IZ-1904.

Como parâmetros foram avaliados a eficiência fermentativa, as formações de glicerol e de ácidos orgânicos (succínico, láctico e acético), a biomassa, açúcares residuais, pH do vinho ao término de cada ciclo fermentativo.

Determinou-se também os teores de trealose na levedura no início do ensaio e ao final do último ciclo fermentativo, para se avaliar o efeito estressante.

Dos resultados obtidos ficou depreendido que o ácido succínico é produzido quase que exclusivamente pela levedura, enquanto o láctico pelas bactérias, sugerindo que os teores desse último se constitua em importante parâmetro para se avaliar a contaminação bacteriana. O ácido acético é produzido tanto pela levedura quanto pelas bactérias.

Constatou-se também que os teores de trealose guardaram uma relação direta com a tolerância da levedura a diferentes agentes estressantes, e a incapacidade da levedura IZ-1904 em manter-se viável ao longo dos ciclos fermentativos, reflete a sua característica metabólica de não acumular trealose.

Elevadas concentrações de potássio, hidrogênio iônico, açúcar, e a temperatura elevada mostraram-se estressantes à levedura. Alguns desses fatores são igualmente estressantes às bactérias contaminantes e ao exercerem um controle sobre as mesmas, resultam num efeito benéfico à fermentação, demonstrando ser a contaminação bacteriana um dos mais significativos fatores comprometedores do processo fermentativo.

Denotou-se também que cerca de 10% do açúcar pode ser desviado para a síntese de glicerol e ácido succínico, dependendo das condições de fermentação.

Finalmente são apresentadas ponderações sobre as interrelações dos diversos parâmetros analisados, avaliados quer isoladamente para cada fator estudado, quer no conjunto.

FACTORS EFFECTING ORGANIC ACID FORMATION AND OTHERS PARAMETERS OF ETHANOL FERMENTATION

Author: DENISE MARIA GÂNDARA ALVES

Adviser: Prof. Dr. LUIZ CARLOS BASSO

SUMMARY

The present work was carried out to better understand the action of several factors towards yeast fermentation, including physical (temperature), chemical (pH, potassium, sulfite, sugar concentration and nitrogen sources) and microbiological (yeast strains, yeast concentration and bacterial contamination) factors.

The fermentations were performed in semi-synthetic and molasse media, with yeast recycling (3 to 6), using *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast (Fleischmann). It was also used *S. cerevisiae* M-300-A (TA) and *S. cerevisiae* (*uvarum*), IZ-1904.

The fermentation performance was evaluated by means of ethanol efficiency, glycerol and organic acids formation (succinic, lactic, acetic), biomass, residual sugar and wine pH at the end of each fermentation cycle.

Yeast trehalose was determined at the beginning and the end of the last cycle of each experiment, in order to evaluate the stress of the factors.

The data show succinic acid as produced mainly by yeast metabolism, whereas lactic acid arrived from bacterial activity, suggesting this acid as a convenient indicator for bacterial contamination. Acetic acid is produced by both yeast and bacteria.

It is also clearly evident the relationship between trehalose content and yeast resistance towards stress, explaining why IZ-1904 strain cannot survive recycling at least at laboratory conditions.

Stress causing factors, such as high potassium levels, low pH values, high sugar concentration, the presence of sulfite and high temperature are all detrimental to fermentation, but when one of such factors similiary reduces bacterial activity, beneficial effects on fermentation were noted.

Such observation led to the conclusion that bacterial contamination exerts one of the most harmful effect towards yeast fermentation.

The results also show that 10% of the metabolised sugar is deviated to glycerol and succinic acid formation.

Finally some consideration on the relationship between the analysed parameters was drawn.

1. INTRODUÇÃO

É redundante salientar a importância do estudo da fisiologia da fermentação alcoólica num país como o Brasil, onde parte significativa da frota automotora utiliza-se de uma fonte energética renovável e ecologicamente correta como se atribui ao etanol.

Assim, um estudo direcionado à obtenção de subsídios que propiciem um aumento da eficiência fermentativa torna-se relevante. Além do que, grande parte das informações colhidas nesta área de pesquisa foi obtida em estudos relacionados com a fabricação de vinho, cerveja, cidra e outros produtos fermentados, cujos resultados, somente com muita cautela, poderiam ser extrapolados para as condições de fermentação do parque industrial instalado no país.

Não obstante, com os poucos dados disponíveis na literatura, supõe-se que ao redor de 5% do açúcar metabolizado pela levedura, seja desviado para a produção de biomassa e compostos secundários, especialmente glicerol e ácidos orgânicos.

Enquanto parte da formação de glicerol é justificada metabolicamente para a manutenção do equilíbrio de redox na célula, a formação do ácido succínico (o principal ácido excretado pela levedura) não encontra razões fisiológicas para a sua formação. Postula-se, inclusive, que a sua produção esteja

relacionada prioritariamente com distúrbios fisiológicos decorrentes de uma inadequação do meio fermentativo do que com as necessidades metabólicas da levedura (OURA, 1977).

O equilíbrio de redox celular é alterado em anaerobiose nos processos oxidativos das produções de biomassa e ácidos orgânicos. O restabelecimento deste equilíbrio está acoplado à formação de glicerol, o composto secundário mais abundantemente excretado pela levedura. Assim, a formação do ácido succínico guarda uma estequiometria interessante: 5 moles de glicerol devem ser formados para compensar a produção de 1 mol de ácido succínico, o que torna sua formação de particular importância, não apenas pelos seus teores em si, mas principalmente pela formação de glicerol acoplada à sua biossíntese. Da mesma forma, os demais ácidos excretados, bem como a biomassa formada, respondem por parte do glicerol gerado no restabelecimento do equilíbrio de redox celular durante a fermentação alcoólica.

Tal abordagem leva à proposição de procedimentos baseados na diminuição da síntese de tais subprodutos (biomassa e compostos secundários) com o intuito de se aumentar a eficiência de conversão do açúcar em etanol, conforme sugerido por OURA (1977).

É neste contexto, que o presente trabalho se propõe a analisar o comportamento da levedura frente a fatores físico-químicos e microbiológicos, avaliados, entre outros parâmetros, pela formação de alguns subprodutos, tais como glicerol, ácidos orgânicos e biomassa relacionando-os com a eficiência de conversão do açúcar em etanol.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Metabolismo de carboidratos na levedura

O objetivo primário que induz todos os organismos a metabolizarem os carboidratos é, via de regra, a máxima produção de energia no catabolismo oxidativo, a formação de estruturas celulares e a estocagem de reservas para utilização posterior.

No caso das leveduras (sinomínia empregada no presente trabalho à espécie *Saccharomyces cerevisiae*, que hoje engloba grande número de antigas espécies pertencentes ao gênero *Saccharomyces*) há várias peculiaridades bioquímicas que distinguem-nas desses conceitos universais.

Quanto ao catabolismo de carboidratos, por serem microrganismos anaeróbicos facultativos, as leveduras podem respirar e fermentar o substrato, e a contribuição de cada um destes eventos depende das condições do meio (GANCEDO & SERRANO, 1989). Outra ambigüidade se nota no que tange ao metabolismo biossintético: ao invés de um carboidrato de reserva, como nos demais organismos, as leveduras possuem dois, o glicogênio e a trealose (PANEK, 1991).

Um maior detalhamento das observações anteriormente descritas, bem como suas implicações sob os pontos de vista fisiológico e tecnológico, serão aventados nos itens subseqüentes.

2.1.1. Degradação do substrato e formação de alguns produtos da fermentação

A utilização do substrato inicia com sua absorção. A sacarose, principal substrato empregado no processo industrial brasileiro, é absorvida na forma de seus monossacarídeos estruturais, glicose e frutose, após hidrólise pela exoenzima invertase.

Com a difusão facilitada através da membrana por permeases específicas (CARTWRIGHT *et alii*, 1989), esses açúcares, são imediatamente fosforilados, e portanto, aptos a fluírem pela via de EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS.

Em termos energéticos, a respiração é muito mais favorável que a fermentação. Assim, sempre que possível, a levedura utiliza em aerobiose o açúcar oxidando-o completamente ao nível mitocondrial. Disto porém incorre uma queda da taxa de consumo de açúcar, se comparada à fermentação. É o chamado Efeito Pasteur, que em *Saccharomyces cerevisiae* é ausente ou muito pequeno em sua magnitude se comparado com outras espécies como a *Candida* (GANCEDO & SERRANO, 1989).

Entretanto, na presença de glicose em concentrações a partir de 2 g/l ocorre repressão catabólica das enzimas respiratórias, o que torna a fermentação a principal via de degradação do açúcar mesmo em condições aeróbicas (CHAPMAN & BARTLEY, 1968). A repressão chega a culminar com a perda total das mitocôndrias (DUNTZE *et alii*, 1969). Essa repressão é também denominada Efeito Crabtree (RATLEDGE & EVANS, 1989).

HOMMES (1966) observou que a glicose induz a um aumento no nível das enzimas glicolíticas, e CHAPMAN & BARTLEY (1968) encontraram aumentadas as atividades das enzimas descarboxilase pirúvica e desidrogenase

alcoólica induzidas pela glicose, o que denota o favorecimento da fermentação, até o principal produto final, o etanol (Figura 1).

2.1.1.1. Etanol

A despeito de ser o metabólito excretado em maior quantidade pela levedura durante a fermentação, e passível de se tornar um substrato em aerobiose, o etanol mostra-se tóxico à levedura ocasionando queda na viabilidade (BROWN *et alii*, 1981).

Sabe-se que o etanol é mais tóxico quando gerado endogenamente do que o adicionado ao meio (NAGODAWITHANA & STEINKRAUS, 1976 e HOPPE & HANSFORD, 1982), o que tornar-se-ia assaz importante sobre a inibição/desnaturação das enzimas glicolíticas, caso ele se acumulasse na célula, conforme descrito por NAVARRO (1980) e NAGODAWITHANA & STEINKRAUS (1976). Entretanto, após muitas controvérsias, notadamente concernentes a problemas de ordem metodológica, parece haver um consenso em que o etanol não se acumule intracelularmente (LOUREIRO & FERREIRA, 1983; GUIJARRO e LAGUNAS, 1984, van UDEN, 1985; D'AMORE *et alii*, 1987; D'AMORE *et alii* 1988, e LEITE *et alii*, 1990) a não ser nos estágios iniciais da fermentação (D'AMORE *et alii*, 1987 e D'AMORE *et alii*, 1988).

O sítio de ação do etanol é nas membranas lipoproteicas, onde se aloja no interior hidrofóbico acarretando um enrijecimento (INGRAM, 1976) e conseqüentemente afetando vários sistemas de transporte (LOUREIRO-DIAS & PEINADO, 1982; LEÃO & van UDEN, 1982; LEÃO & van UDEN, 1984a; van UDEN, 1985; PASCUAL *et alii*, 1988 e PERLOT, 1989). Diminui também a seletividade da membrana plasmática, permitindo efluxo de constituintes celulares (SALGUEIRO *et alii*, 1988 e LEE & LEWIS, 1987) bem como o influxo passivo de

prótons, diminuindo o potencial de membrana e portanto, afetando todos os sistemas que requeiram força protomotiva (LEÃO & van UDEN, 1984b).

Isto acaba por induzir deficiências nutricionais que exacerbam a toxidez do etanol (CASEY *et alii*, 1984 e DOMBEK & INGRAM, 1986) somando-se o fato de que a levedura em anaerobiose tem a integridade de suas membranas comprometidas por deficiências na síntese de ácidos graxos insaturados e ergosterol (CASEY *et alii*, 1984). Tais evidências levaram à busca de melhores desempenhos fermentativos pela adição de óleos vegetais (SAIGAL & VISWANATHAN, 1983; ALTERTHUM & CRUZ, 1987), lecitina (BASSO¹, 1991), ácidos graxos (GUTIERREZ *et alii*, 1990 e GUTIERREZ, 1991a), bem como sais de cálcio (NABAIS *et alii*, 1988) e magnésio (DOMBEK & INGRAM, 1986). Outros fatores também contribuem para o aumento da toxidez do etanol, nomeadamente a temperatura (NAGODAWITHANA *et alii*, 1974; SÁ-CORREIA & van UDEN, 1982; SÁ-CORREIA & van UDEN, 1983; SÁ-CORREIA, 1986 e RAMOS & MADEIRA-LOPES, 1990) e a síntese de subprodutos tóxicos (D'AMORE *et alii*, 1987) como, por exemplo, acetaldeído, glicerol, os ácidos fórmico, acético, láctico (MAIORELLA *et alii*, 1983); particularmente, o ácido acético (PAMPULHA & LOUREIRO-DIAS, 1989 e PAMPULHA, 1989) e também ácidos graxos, (LAFON-LAFOURCADE *et alii*, 1984; VIEGAS *et alii*, 1985 e VIEGAS *et alii*, 1989).

¹ BASSO, L.C. (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/ USP), Piracicaba, SP. Comunicação pessoal, 1991.

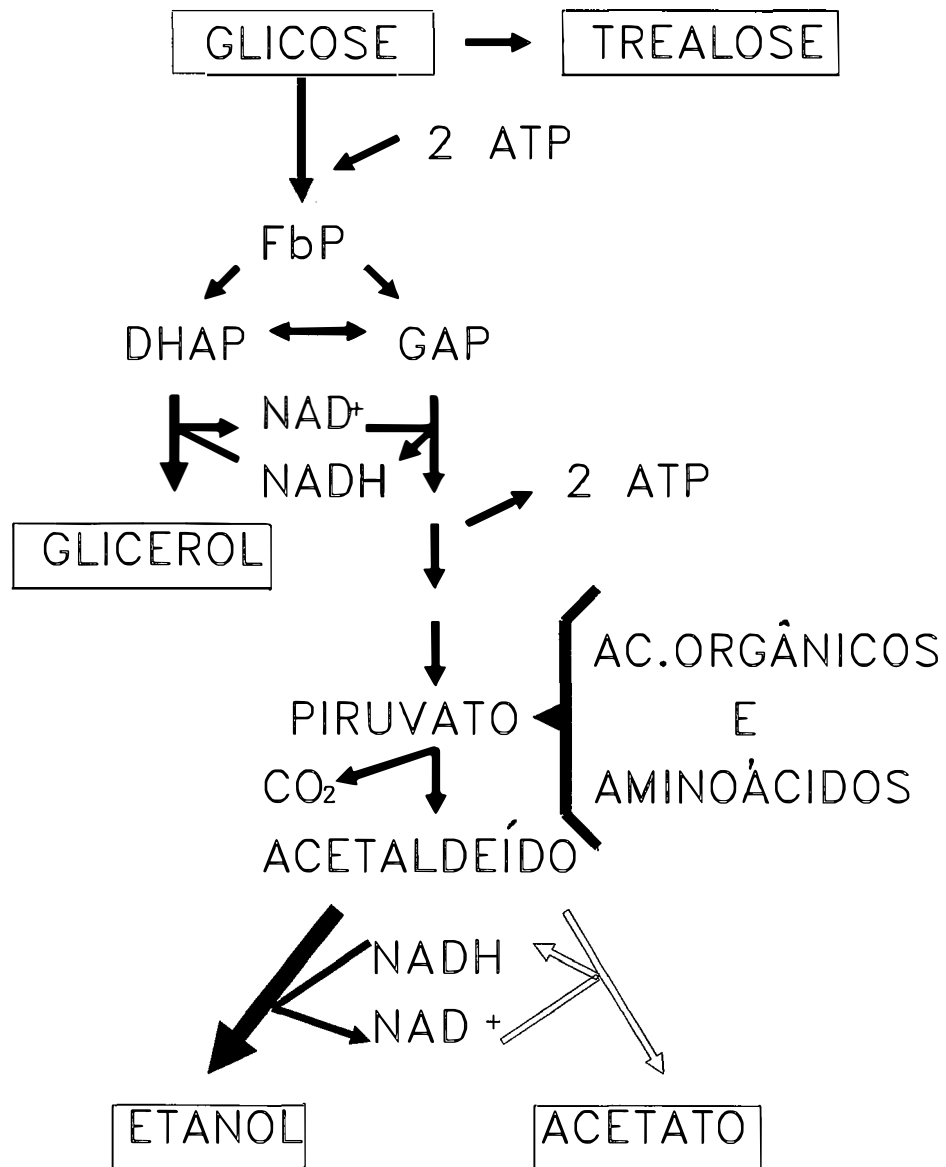


Figura 1: Formação de etanol, glicerol, acetato e trealose, a partir da glicólise anaeróbica, ressaltando as reações de oxidorredução.

Embora MAIORELLA *et alii* (1983) tivessem considerado o glicerol como um dos subprodutos tóxicos, num trabalho posterior (MAIORELLA *et alii*, 1984) consideraram-no como um subproduto não tóxico e com função osmorreguladora.

2.1.1.2. Glicerol

O glicerol é o único poliálcool produzido pela *Saccharomyces cerevisiae* (JENNINGS, 1984) cuja biossíntese foi estudada por GANCEDO *et alii*, (1968) identificando a reação enzimática NADH-dependente responsável pela redução da triose-fosfato ao glicerol-fosfato. LAGUNAS & GANCEDO (1973), observaram que as principais reações de regeneração do NADH eram as do acetaldeído e da fosfodi-hidroxiacetona. De fato, RADLER & SCHÜTZ (1982) consideraram que a formação de glicerol fosse resultado da competição entre a desidrogenase alcoólica e a desidrogenase de glicerol-fosfato para a regeneração de NADH. Assim sendo, a produção de glicerol foi aumentada na fermentação conduzida com um mutante deficiente em desidrogenase alcoólica-I conforme descrito por JOHANSSON & SJÖSTRÖM (1984). No início da fermentação, quando a atividade da descarboxilase pirúvica ainda é baixa, o piruvato e o glicerol são produzidos em quantidades maiores que o próprio etanol (WHITING, 1976).

A partir destas constatações, fica claro o porquê da síntese de glicerol relacionar-se inversamente com a eficiência fermentativa (OURA, 1977; PANCHAL & STEWART, 1980; MAIORELLA *et alii*, 1983 e FINGUERUT *et alii*, 1987). A utilização de antiespumantes que diminuem a resistência das membranas à saída de glicerol, estimula sua síntese e diminui a de etanol, acarretando um

decréscimo no conteúdo de ATP intracelular (GROSZ & STEPHANOPOULOS, 1990).

A produção de glicerol pode ser favorecida na presença de sulfito em condições alcalinas (HAJNY *et alii*, 1960). Desde que, energeticamente a formação de glicerol *per se* resulta em consumo líquido de ATP (GANCEDO & SERRANO, 1989 e GROSZ & STEPHANOPOULOS, 1990), a levedura teria que apresentar boas razões para sintetizar glicerol em excesso, posto que uma superprodução seria muito prejudicial à célula (GANCEDO & SERRANO, 1989). O glicerol necessário à biossíntese de lipídios pode ser considerado insignificante em relação ao montante que é produzido (NORDSTRÖM, 1962).

O glicerol vem sendo freqüentemente considerado um metabólito osmorregulador, pois sua formação é aumentada em meios com baixa atividade de água (ou analogamente, alta pressão osmótica) determinada pela presença de solutos, tais como sais ou açúcares (HAJNY *et alii*, 1960; PANCHAL & STEWART, 1980; MAIORELLA *et alii*, 1984; KENYON *et alii*, 1986; LARSON & GUSTAFSSON, 1987; JOVALL *et alii*, 1990; BELLINGER *et alii*, 1990 e TOKUOKA, 1993).

No entanto, para BRUMM & HEBEDA (1988), a produção de glicerol estaria mais relacionada com a regeneração do NADH, do que com a estabilização osmótica do meio.

Uma das condições em que se tem excesso de $\text{NADH} + \text{H}^+$ na célula, é quando ocorre o crescimento (NORDSTRÖM, 1966). Para haver crescimento é necessária a síntese de proteínas, onde parte dos aminoácidos provém do piruvato. Assim, para se restabelecer o equilíbrio de redox durante a fermentação, quando há crescimento, o único caminho é a formação de glicerol

(Figura 1). E embora a fermentação alcoólica não seja um processo oxidativo, havendo formação de material celular, esta compreende uma oxidação em termos globais (NORDSTRÖM, 1968). Tal pressuposição já havia sido assumida por BARTLEY (1960) que estabeleceu reações de crescimento em diferentes condições, baseadas em princípios termodinâmicos e deduções de fórmulas empíricas para o material celular.

Para além do crescimento, há outras condições que desequilibram o balanço de redox da célula: as formações oxidativas de ácidos orgânicos, notadamente, o succínico e o acético.

2.1.1.3. Ácidos orgânicos

2.1.1.2.1. Ácido succínico

O ácido succínico é quantitativamente o principal ácido formado pela levedura. Seus teores finais na fermentação vão de 0,2 a 1,7g/l (HEERDE & RADLER, 1978) e dependem de vários fatores, como linhagens de leveduras e condições ambientais (KLEINZELLER, 1941; COOTE & KIRSOP, 1974; WHITING, 1976 e SHIMAZU & WATANABE, 1981), sendo que a maior parte é formada nas duas primeiras horas de fermentação (BASSO², 1991).

A via biossintética do ácido succínico foi matéria para muitas pesquisas e se tornou um tema controvertido.

Com as alterações fisiomorfológicas acarretadas pela anaerobiose, como modificações das estruturas mitocondriais (PERLMAN & MAHLER, 1974),

² BASSO, L.C.. (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP), Piracicaba, SP. Comunicação pessoal. 1991.

desaparecimento completo de mitocôndrias (DUNTZE *et alli*, 1969), repressão e desaparecimento das atividades enzimáticas mitocondriais (HAUBER & SINGER, 1967; CHAPMAN & BARTLEY, 1968; MACHADO *et alii*, 1975), a via glicolítica responde por 70% da energia vital para a célula (LAGUNAS & GANCEDO, 1973) e o ciclo de Krebs, tal como é conhecido, é inoperante (VAVRA & JOHNSON, 1956 e MACHADO *et alii*, 1975). Foi sugerido por FREITAS-VALLE *et alii* (1981) que a excreção de succinato reflete o grau de desenvolvimento da mitocôndria, fato evidenciado pela observação de que células derreprimidas por maltose excretam menos succinato que as crescidas em glicose e pela correlação positiva entre os níveis de citocromos e a excreção de succinato.

Como o ácido succínico é produto do ciclo do glioxilato, durante aerobiose para o fornecimento de esqueletos carbônicos à gluconeogênese, esperava-se encontrar alguma atividade residual desse ciclo, que respondesse à síntese do succinato. Entretanto, foi verificado por STOPPANI *et alii* (1958) que nenhum glioxilato foi formado a partir do CO₂ marcado em anaerobiose e foi detectado por CHAPMAN & BARTLEY (1968), que as enzimas-chave do ciclo do glioxilato, a liase de isocitrato e a sintase de malato, que encontram-se no citoplasma em aerobiose, desaparecem em anaerobiose. Essa constatação foi confirmada por HEERDE & RADLER (1978), ficando assumido que o ciclo do glioxilato não participa da formação do ácido succínico durante a fermentação.

A atividade de muitas enzimas anabólicas muda durante a aerobiose. A carboxiquinase de fosfoenolpiruvado só opera quando concomitante à gluconeogênese (RUIZ-AMIL *et alii*, 1965). Contudo, algumas enzimas ATP-dependentes como a carboxilase pirúvica são induzidas pela carga energética da célula (MILLER & ATKINSON, 1972). Além disso, evidências anteriores como da

formação do aspartato, sugerida por VAVRA & JOHNSON (1956) sendo devido à condensação de unidades C₃-C₁, ficou caracterizada a participação da carboxilase pirúvica no provimento do ácido oxaloacético para as biossínteses e ciclo de Krebs, mesmo que este esteja funcionando parcialmente (RUIZ-AMIL *et alii*, 1965).

A carboxilase pirúvica tem uma ótima atividade no pH 8,3, necessita de íons ativadores como Mg⁺² e K⁺, usa ATP, usa cofatores como biotina, acetil-CoA, é modulada por aspartato, malato e inibida por oxalato (UTTER & KEECH, 1960; GAILIUSIS *et alii*, 1964; SCRUTTON *et alii*, 1965; SCRUTTON & UTTER, 1965; COOPER & BENEDICT, 1966; CAZZULLO & STOPANI, 1965; CAZZULLO & STOPANI, 1968 e MILLER & ATKINSON, 1972).

Assim, com o suprimento adequado de ácido oxaloacético, o ciclo de Krebs seria o responsável pela síntese do succinato.

Inicialmente apregoada, a via redutiva (Figura 2a) funcionaria a partir de isoenzimas da desidrogenase succínica, uma vez que esta tem baixa atividade, ou desaparece em anaerobiose (VAVRA & JOHNSON, 1956; e HAUBER & SINGER, 1967). Essas isoenzimas não apresentavam afinidade pelo succinato e malonato e demonstravam alta afinidade pelo fumarato, denominando-se redutase de fumarato (HAUBER & SINGER, 1967), também apresentando FAD⁺ como grupo prostético, mas sem ser ligado covalentemente (TISDALE *et alii*, 1968). Somando-se a estas evidências CHAPMAN & BARTLEY (1968) não detectaram atividade de desidrogenase de alfa-cetoglutarato sugerindo portanto que a via redutiva fosse a via de síntese do ácido succínico, assumida também por LUPIAÑES *et alii* (1974), MACHADO *et alii* (1975) e WHITING (1976).

No entanto, essas evidências foram revistas e modernamente assume-se como prioritária a síntese do succinato pela via oxidativa (Figura 2b). FREITAS-VALLE *et alii* (1981) observaram que a repressão da enzima succiniltioquinase sendo aumentada na presença de glicose, induz à diminuição da excreção de succinato, comprovando a ação da via oxidativa.

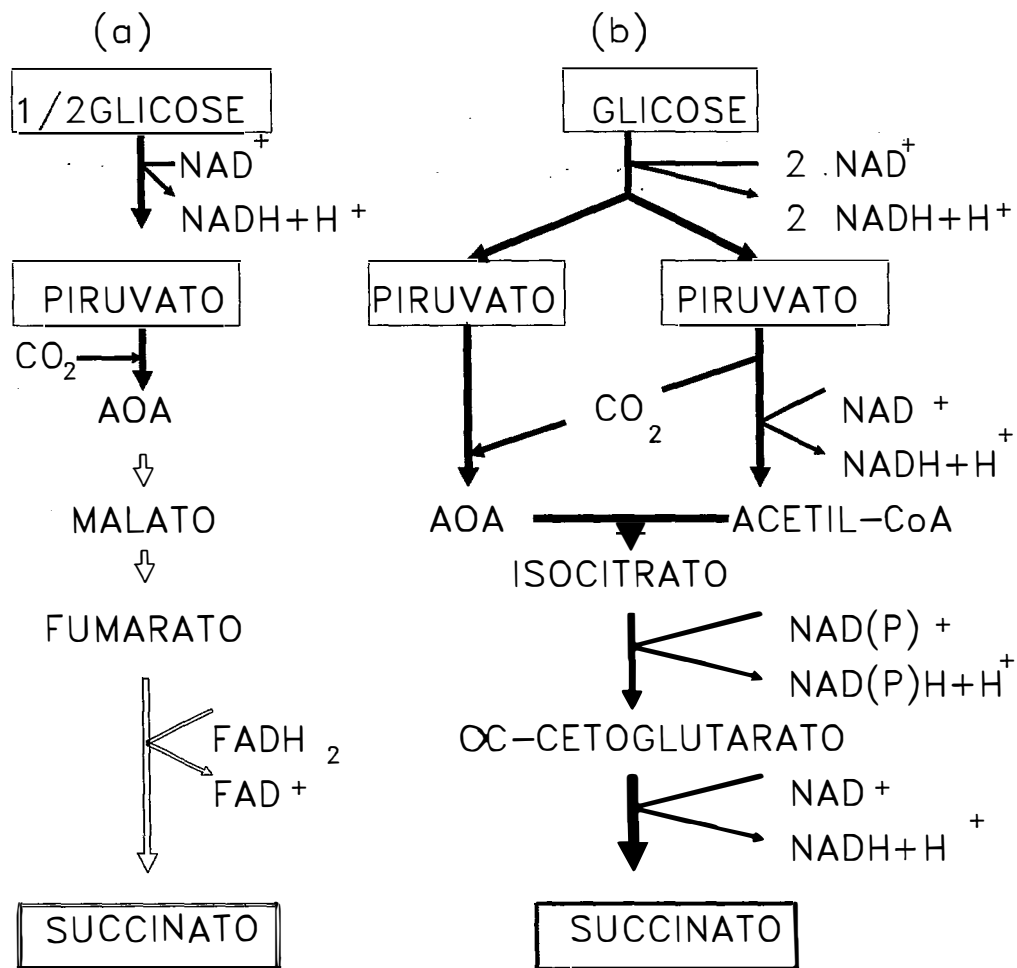


Figura 2: Vias biossintéticas do succinato: (a) redutiva e (b) oxidativa, ressaltando as reações de oxidorredução.

OURA (1977) considerou improvável a formação do succinato pela via redutiva, a partir das evidências que se seguem:

- embora a atividade da desidrogenase de alfa-cetoglutarato seja baixa, é suficiente para permitir a formação do succinato. Isto é confirmado pelo aumento da síntese de succinato a partir da adição de glutamato, pois o único caminho é a descarboxilação oxidativa do alfa-cetoglutarato. **LAFON-LAFOURCADE & PEYNAUD (1966)**, já haviam observado que a maior parte do alfa-cetoglutarato formado durante a fermentação é derivado do ácido glutâmico, isto, segundo **LEWIS & RAINBOW (1963)** é devido à ação de transaminases presentes na levedura.
- a produção de succinato não está acoplada com o alto nível de NADH, como por exemplo, na presença de sulfito, quando nenhum succinato adicional é formado.
- a fermentação eleva a carga energética da célula, que ativa a carboxilase pirúvica, e o ponto de estrangulamento, seria a baixa atividade da desidrogenase succínica.
- a formação de succinato estaria conectada conseqüentemente com a de glicerol para o restabelecimento do equilíbrio de redox.

Esta conexão é dada pela equação estequiométrica empírica estabelecida por **PEYNAUD** e assumida por **GENEVOIS (1950)**, onde:

$$2a + b + 2m + 5s + h = G \quad (\text{Equação 1})$$

sendo

a = quantidade molar de acetato;

b = quantidade molar de butilenoglicol;

m = quantidade molar de acetoína;

s = quantidade molar de succinato;

h = quantidade molar de acetaldeído e

G = quantidade molar de glicerol.

É interessante ressaltar que o coeficiente cinco na Equação (1) demonstra que mesmo uma formação de succinato em pequenas quantidades acarreta grande perda de açúcar, devido ao glicerol acoplado. Coincidentemente esse coeficiente corresponde ao número de moles de coenzimas reduzidas formadas pela síntese de um mol de succinato a partir de um mol de glicose (Figura 2b).

2.1.1.3.2. Ácido acético

O ácido acético é o principal ácido volátil produzido durante a fermentação (WHITING, 1976), embora sua presença em alguns casos, deva-se à atividade bacteriana (COOTE & KIRSOP, 1974). De acordo com WHITING (1973), o ácido acético é formado durante vários estágios da manufatura de cidra, devido à atividade de microrganismos, tais como leveduras do processo, leveduras contaminantes, bactérias lácticas e acéticas, mas principalmente relaciona-se com as bactérias lácticas.

Ainda assim, o ácido acético é encontrado geralmente em teores menores que o ácido succínico. No caso de bebidas alcoólicas, os teores médios na cidra encontram-se na faixa de 0,120 a 0,250 g/l (WHITING, 1973), enquanto que nas cervejas, de variadas origens, raramente excedem a 0,2 g/l (COOTE & KIRSOP, 1974), porém nas cervejas ácidas alemãs, podem atingir 2,34 g/l (KLOPPER *et alli*, 1986) e finalmente em vinhos produzidos a partir de fermentação com *S. cerevisiae* os teores variam de 0,075 a 0,150g/l, mas podem ser maiores caso utilizem-se outras leveduras (MILAN & ORTEGA, 1988). Portanto, os teores finais de acetato são variáveis e dependem muito das condições ambientais e do tipo de levedura utilizada (COOTE & KIRSOP, 1974; WHITING, 1976; SHIMAZU & WATANABE, 1981 e MILAN & ORTEGA, 1988).

O acetato é produzido via desidrogenase de acetaldeído, por meio de uma oxidação denominada terceira forma de fermentação de Neuberg (OURA, 1977). Assim, há um desvio da síntese de etanol, desequilibrando o balanço de redox, com a formação de duas coenzimas reduzidas (Figura 1). OURA, (1977)

correlacionou esta estequiometria com o coeficiente dois na equação de GENEVOIS (1950), onde são formados dois moles de glicerol para cada mol de acetato produzido (Equação 1).

Segundo COOTE & KIRSOP (1974), a formação de acetato durante a fermentação apresenta-se inversamente correlacionada com a de piruvato, sugerindo que este se converta em acetato. O acetato é excretado no início da fermentação quando os teores de piruvato são baixos, cai quando se atinge a máxima excreção de piruvato e volta a aumentar no final da fermentação, quando o piruvato é reabsorvido.

Todavia, esta relação não ficou evidente no trabalho de BELL *et alii* (1991b). De acordo com COOTE *et alii* (1973), o teor de piruvato depende da intensidade do crescimento, sendo metabolizado exclusivamente pelas leveduras, que o reabsorvem no final da fermentação (LAFON-LAFOURCADE & PEYNAUD, 1966). Ao contrário do piruvato, o teor de acetato aumenta quando há inibição do crescimento (NORDSTRÖM, 1963).

O crescimento pode ser prejudicado pela carência vitamínica. De forma que o teor de acetato é aumentado com a falta de ácido pantotênico e biotina (NORDSTRÖM, 1962), e os baixos níveis de ácido nicotínico estimulam o acúmulo de acetato, sem prejudicar o crescimento (MONK & COWLEY, 1984). A omissão de tiamina induz a um aumento na excreção de piruvato (LAFON-LAFOURCADE & PEYNAUD, 1966), embora a adição não influencie os teores finais (COOTE *et alii* 1973).

Com relação ao glicerol, fica conseqüentemente difícil estabelecer uma correlação entre os teores de acetato e glicerol, pois, conforme descrito anteriormente, a despeito de relacionarem-se estequiometricamente para o

equilíbrio do balanço de redox celular, a produção de glicerol encontra-se também conectada com o crescimento. Além de que, o ácido acético presente no meio pode ser devido à atividade bacteriana.

NORDSTRÖM (1961) observou que o ácido acético adicionado ao meio na concentração de 0,5g/l ocasionou uma queda no acetato produzido pela célula, embora sem efeito sobre o crescimento. Entretanto GUTIERREZ *et alii* (1991) utilizando concentrações maiores (4,2g/l) relatou uma queda no crescimento, acompanhada por queda dos teores de glicerol, o que já havia sido verificado por PAMPULHA (1989), trabalhando com concentrações ainda maiores de até 12g/l. Segundo DRYSDALE & FLEET (1989) o efeito inibitório demonstrado pelo ácido acético sobre o crescimento de *S. cerevisiae* pode ser parte devido a outras substâncias inibitórias provenientes do metabolismo bacteriano.

Muito embora o ácido acético seja fonte de carbono à levedura, principalmente em aerobiose, precursor de acetil-CoA, para o ciclo de Krebs, bem como para a biossíntese de lipídios e gluconeogênese, durante a fermentação ele pode encontrar-se em concentrações suficientes para exercer seu efeito tóxico. Este é tão maior quanto menor o pH, notadamente quando inferior ao seu pK (PAMPULHA, 1989), e permite um efeito sinérgico com o etanol na inibição da fermentação (PAMPULHA, 1989 e PAMPULHA & LOUREIRO, 1989) acelerando a morte térmica, sendo trinta vezes mais tóxico que o etanol em altas temperaturas (PINTO *et alii*, 1989).

O ácido acético, à semelhança de outros ácidos orgânicos fracos, perturba a homeostase de células microbianas, por penetrar na forma não-dissociada e dissociar-se no citoplasma, promovendo um abaixamento do pH_i, com

o acúmulo do ânion acetato. A acidificação intracelular reduz o pH, afetando a força protomotriz para os sistemas de transporte, e é uma das causas, conjuntamente com a ação do ânion acetato sobre as enzimas glicolíticas, da ação inibitória do ácido acético sobre a fermentação (PAMPULHA, 1989; PAMPULHA & LOUREIRO-DIAS, 1989, e PAMPULHA & LOUREIRO-DIAS, 1990). Ficou constatado pelas autoras que o ácido acético não afeta o transporte de glicose, mas exerce ação inibitória sobre a enolase, modificando o controle glicolítico. Foi sugerida a participação da ATPase no controle do pH citoplasmático (PAMPULHA & LOUREIRO-DIAS, 1990).

Fica claro pelo exposto, que a presença do ácido acético, seja oriundo da levedura, das bactérias contaminantes, ou adicionado ao meio, torna-se indesejada, mesmo que um aumento na produção de etanol com redução do crescimento seja verificado (PAMPULHA, 1989 e GUTIERREZ *et alii*, 1991), pois esse aumento pode ser estequiometricamente relacionado com o acetato utilizado, que por sua vez provoca distúrbios na célula que causam-lhe estresse, avaliado pela redução do teor de trealose (BASSO³, 1991).

2.1.2. Trealose e seu significado para a célula

A maioria dos trabalhos concernentes ao metabolismo da trealose relaciona-se ao crescimento aeróbico, em baixas concentrações de açúcares, quando, na fase de diauxia, a levedura inicia o acúmulo de trealose (PANEK, 1963; PANEK, 1975; LILLIE & PRINGLE, 1980 e FRANÇOIS *et alii*, 1991).

³ BASSO, L.C. (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP), Piracicaba, SP. Comunicação pessoal, 1991.

A trealose assumiu uma importância tecnológica relevante, quando seu acúmulo foi relacionado à manutenção da viabilidade celular para o armazenamento de levedura de panificação (SUOMALAINEN & PFAFFLI, 1961), manutenção de esporos viáveis (KANE & ROTH, 1974) e à manutenção da viabilidade, bem como melhores capacidades de produção de etanol em cepas com altos teores iniciais de trealose (D'AMORE *et alii*, 1991).

A manutenção da viabilidade celular, sob condições adversas denota a função protetora da trealose, que é resultado das imbricadas interrelações entre sua localização e mobilização na célula. Essas considerações fizeram WIEMKEN (1990) propor que a trealose não fosse considerada apenas e tão somente, um carboidrato de reserva.

O teor de trealose na célula é resultado de um complexo e fino ajustamento entre síntese/hidrólise, "pool" de metabólitos intermediários, pH intracelular, e é regulado pelos níveis de AMP cíclico.

De um modo geral, a síntese é favorecida quando há superprodução de ATP, que desacelera o fluxo glicolítico (RIBEIRO, 1993), é intensa no jejum (THEVELIN, 1984), bem como quando não há crescimento em células, como na fase estacionária (LILLIE & PRINGLE, 1980).

A degradação da trealose ocorre rapidamente na presença de glicose (WIEMKEN, 1990), que induz ao abaixamento do pH intracelular (VALLE *et alii*, 1987), à formação do AMP cíclico, que é o principal regulador dos níveis de trealose na célula (PANEK *et alii*, 1989) e também pela redução das atividades das enzimas de síntese por fontes de nitrogênio (FRANÇOIS *et alii*, 1991).

É sabido que a aerobiose favorece a síntese da trealose, se comparada à anaerobiose (GRBA *et alii*, 1975). PANEK, (1971) não detectou a síntese da

trealose em anaerobiose nem em células em jejum e nem semi-anaerobiose (PANEK, 1975). Nessas condições PANEK (1975) atribuiu não haver síntese de trealose à carência das enzimas da gluconeogênese e do ciclo de glioxilato e à não ocorrência de interconversão do glicogênio em trealose. No entanto, FRANÇOIS *et alii* (1991) trabalhando com mutante deficiente em carboxiquinase de fosfoenolpiruvato, verificou que a síntese de trealose ocorreu concomitante à degradação do glicogênio.

O fato da trealose se acumular no citoplasma (KELLER *et alii*, 1982) sugeriu a especulação desta poder ser um agente protetor. Como uma grande quantidade de trealose é acumulada em condições adversas, esse dissacarídeo exerceria uma profunda influência na atividade de água do citossol, podendo contribuir para desaceleração do metabolismo e promover a transição da célula para o estado de repouso (WIENKEN, 1990). No desenvolvimento da resistência ao estresse hídrico, a trealose mostrou-se mais efetiva que o glicerol (MACKENZIE *et alii*, 1988). Porém, essa tendência foi contrária àquela descrita no trabalho de MEIKLE *et alii* (1991). Mas a função osmorregulatória da trealose foi mais clara em *Escherichia coli*, em que células na presença de NaCl aumentaram seu conteúdo de trealose, em relação ao controle (LARSEN, 1987).

A trealose tem importante participação na manutenção da integridade da membrana em condições de baixa atividade de água (CROWE, J.H. *et alii*, 1984 e CROWE, L.M. *et alii*, 1984), substituindo as moléculas de água da membrana, com a participação de um transportador (CROWE *et alii*, 1991) capaz de permitir a presença de trealose nos dois lados da dupla camada fosfolipídica (ELEUTHERIO *et alii*, 1993b).

O estresse mais conhecido por induzir instantânea síntese de trealose é o choque térmico (GRBA *et alii*, 1975). A tolerância induzida foi demonstrada ser pela síntese de proteínas de choque térmico, e não à trealose (WINKLER, *et*

alii, 1991). No entanto, **PANEK et alii** (1990), concluíram que a sobrevivência das células ao choque térmico não seria exclusivamente devido às proteínas de choque térmico e nem à trealose. **ELEUTHERIO et alii** (1993a) observaram que o transportador para a trealose não estava envolvido no mecanismo de aquisição de termotolerância, mas uma correlação direta entre os níveis de trealose e a resistência ao estresse térmico foi demonstrada.

A função termoprotetora da trealose foi descrita por **HOTTINGER et alii**, (1987). A biossíntese da trealose seria favorecida pelo aumento endógeno do ATP durante o choque térmico, para manter um nível adequado de glicose no citoplasma. Quando a célula é transferida para a temperatura normal, ocorre o desaparecimento da trealose, ficando demonstrado um ciclo fútil da trealose, uma vez que na sua síntese são consumidos três ATP e na hidrólise, nenhum ATP é formado.

É importante ressaltar que o nome genérico de proteínas de choque térmico é utilizado para designar proteínas que são sintetizadas também quando a célula está exposta a outros tipos de agentes estressantes. Assim, **ATTFIELD** (1987) observou síntese de proteínas de choque térmico em leveduras expostas ao etanol, cádmio, sulfato de cobre e peróxido de hidrogênio, com respectivo acúmulo de trealose. Proteínas de choque térmico foram correlacionadas com a aquisição de termotolerância induzida pelo etanol, ácidos fracos e baixo pH (**COOTE et alii**, 1991).

Segundo **WIEMKEN** (1990) todas as relevantes enzimas que participam da síntese e degradação da trealose são aparentemente constitutivas, e **RIBEIRO** (1993), sugeriu que as enzimas da síntese da trealose fossem proteínas de choque térmico.

A despeito de todo o conhecimento referente ao metabolismo da trealose, pouco se sabe do comportamento das leveduras quando submetidas a um combinado efeito de situações estressantes, que se constitui o processo fermentativo industrial. Sabe-se que as células se mantêm viáveis até quando os teores de trealose caem a 0,2% M.S. e até esse valor não há correlação definida entre viabilidade e trealose (BASSO⁴, 1993).

Finalmente, a exaustão desse dissacarídeo (fermentação endógena) se mostra oportuna na ocasião da sangria na indústria, pois que se converte em etanol, incrementando o teor protéico relativo da levedura destinada à ração animal (AMORIM & BASSO, 1991).

2.2. Alguns fatores que afetam a fermentação alcoólica

2.2.1. Nitrogênio

O conteúdo de nitrogênio nas leveduras pode chegar a 10% da matéria seca, o qual representa um importante constituinte para qualquer meio de crescimento (JONES *et alii*, 1981), e numa fermentação o teor de nitrogênio é crítico para uma rápida e completa utilização do açúcar (O'CONNOR-COX *et alii*, 1991).

A concentração mínima de nitrogênio que satisfaça o requerimento da levedura é ditada pela amplitude de crescimento que permite uma fermentação satisfatória (O'CONNOR-COX *et alii*, 1991). Em meios com alta concentração de

⁴ BASSO, L.C. (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP), Piracicaba, SP. Comunicação pessoal. 1993.

substrato, a exigência é maior (CASEY *et alii*, 1984), provavelmente porque o etanol formado interfere na absorção de amônio e aminoácidos inibindo os sistemas de transporte das membranas (LEÃO & van UDEN, 1984a).

De acordo com COOPER (1982) *Saccharomyces cerevisiae* é capaz de utilizar uma ampla gama de compostos nitrogenados, tais como aminoácidos, bases nitrogenadas, uréia e amônio, empregando vários sistemas de transporte para cada fonte nitrogenada. A absorção de amônio ocorre com gasto de energia e relaciona-se com efluxo de prótons, acidificando o meio. Para a uréia, há dois sistemas de transporte, um de alta afinidade, dependente de energia, capaz de concentrar uréia internamente até 200 vezes mais que o meio, e uma difusão facilitada, quando o meio possui altos teores de uréia. Quanto à absorção dos aminoácidos existe a denominada permease geral de aminoácidos (CARTWRIGHT *et alii*, 1989).

As leveduras são geralmente capazes de utilizar íons amônio como única fonte de nitrogênio, sendo o sulfato de amônio a fonte mais utilizada em fermentações industriais, além do que provê a levedura de uma fonte de enxofre prontamente assimilável, se comparada à uréia. Assim, de acordo com as características dos meios fermentativos é utilizado nas concentrações de 70 a 400 mg/l (JONES *et alii*, 1981).

A maioria dos sistemas metabólicos de assimilação do nitrogênio geram amônia, que por intermédio da enzima desidrogenase glutâmica NADP-dependente, é incorporada ao glutamato, o qual é o principal doador de nitrogênio para o metabolismo biossintético.

A levedura não possui urease, gerando amônia a partir da carboxilação de uréia formando ácido alofânico que é hidrolisado a amônio e gás

carbônico pela hidrolase (COOPER, 1982). Segundo PARKKINEN & OURA (1974), a levedura de panificação crescida com amônia ou uréia não difere no seu comportamento quando a razão uréia/glicose é adequada ao crescimento; se for alta, ocorre acúmulo de amônia no meio provando que não é a enzima o fator limitante ao crescimento.

Os níveis intracelulares de nitrogênio são muito importantes para a manutenção do equilíbrio metabólico, de forma que a limitação de nitrogênio faz com que os níveis de AMPc abaxiem, refletindo no acúmulo dos carboidratos de reserva nomeadamente, o glicogênio e a trealose (LILLIE & PRINGLE, 1980 e GANCEDO & SERRANO, 1989).

O excesso de nitrogênio assimilável, ou seja, concentrações acima dos níveis recomendados, demonstrou ser favorável às fermentações com altas concentrações de açúcar, permitindo maior produção de etanol e material celular (parcialmente devido ao aumento do teor protéico) sem no entanto favorecer o aumento no número de células, nem a viabilidade celular. A menor produção de etanol apresentada pelo meio não suplementado não foi explicada pelo desvio de açúcar para a produção de glicogênio, acetaldeído e glicerol, assim, explicam O'CONNOR-COX *et alii* (1991), o carbono a partir da glicose foi divergido para um número de componentes celulares, via passagens alternativas do metabolismo.

GUTIERREZ (1989) fornecendo quantidades iguais de nitrogênio nas formas de sulfato de amônio e uréia detectou que esta permite maior acúmulo de trealose, enquanto que ao fornecer diferentes quantidades de nitrogênio na mesma forma (extrato de levedura) observou que o acúmulo de trealose é dobrado, quando o teor de nitrogênio é reduzido para um quarto.

A síntese de ácidos orgânicos também é diretamente afetada pelos teores, bem como pelas diferentes formas nitrogenadas fornecidas ao meio fermentativo.

KLEINZELLER (1941) observou que a produção de succinato num meio com glutamato é quatro vezes maior que num meio com cloreto de amônio.

COOTE & KIRSOP (1974), adicionando 300mgN/l ao meio sintético nas diferentes formas nitrogenadas serina, ácido glutâmico, ácido aspártico, asparagina, arginina e sulfato de amônio, encontraram respectivamente 0,380; 0,878; 0,475; 0,526; 0,197; 0,296g/l de succinato. Note-se que o ácido glutâmico é responsável pela maior excreção de succinato enquanto que a arginina e o sulfato de amônio pelos menores teores.

Segundo OURA (1977), o aumento da excreção de succinato pela adição de glutamato reforça a hipótese da via oxidativa, já que o único caminho em que o glutamato é convertido em succinato é pela descarboxilação oxidativa do alfa-cetoglutarato, comprovando que embora o sistema enzimático da desidrogenase de alfa-cetoglutarato seja pouco ativo, sua atividade é suficientemente alta para explicar a via oxidativa da formação do succinato durante a fermentação. Realmente, com o fornecimento de glutamato marcado, OURA (1977) observou que 70% do succinato tem origem naquele aminoácido.

HEERDE & RADLER (1978) forneceram 22 diferentes fontes de nitrogênio, na sua maioria aminoácidos e observaram que o aumento na formação de succinato estava relacionado com a formação proporcional de alfa-cetoglutarato. O glutamato induziu a uma maior excreção de succinato, a qual não foi inibida pelo malonato. Grandes quantidades de succinato surgiram a partir da prolina, a qual é metabolizada via glutamato, pois os autores também

conseguiram detectar a atividade enzimática da desidrogenase de alfa-cetoglutarato, reforçando a via oxidativa como responsável pela síntese do succinato.

FREITAS VALLE *et alii* (1981) encontraram sensível diminuição na síntese de succinato pelo fornecimento de sulfato de amônio, que desvia o alfa-cetoglutarato para glutamato. O mesmo resultado obteve GUTTIERREZ (1988) em meio de melaço suplementado com sulfato de amônio.

SHINDO *et alii* (1993), observaram que em células imobilizadas o teor de ácido succínico triplica em relação às células livres, e como o ácido metilcítrico foi detectado em maiores teores nas células imobilizadas, sendo este, intermediário na síntese de ácido succínico a partir da isoleucina, os autores sugeriram ser este aminoácido o precursor do ácido succínico nessas condições. O ácido acético, no entanto foi bem menor nas células imobilizadas.

Os teores de ácido acético variaram com as diferentes fontes nitrogenadas fornecidas por COOTE & KIRSOP (1974), sendo o ácido aspártico e arginina os responsáveis pelos maiores teores e a serina e o ácido glutâmico pelos menores e quase irrisórios (0,007g/l) teores. Para o ácido pirúvico, os menores teores foram obtidos com arginina e os maiores com ácido glutâmico e aspártico.

LAFON-LAFOURCADE & PEYNAUD (1966) obtiveram menor excreção de piruvato a partir de aminoácidos isolados ou misturados do que a partir de sulfato de amônio.

A adição de certos aminoácidos tais como, leucina, valina, isoleucina e treonina, conduz a uma intensa transformação destes nos seus correspondentes álcoois superiores (CACHOT *et alii*, 1991).

2.2.2. Potássio

O potássio foi considerado um elemento traço por JONES *et alli* (1981) baseando-se no seu requerimento pela célula e seu nível adequado à fermentação foi sugerido estar em torno de 390mg/l (JONES, 1986), mas AMORIM (1985) considerou um nível maior, em torno de 700 a 1200mg/l.

Porém, na prática, a levedura encontra-se exposta à concentrações de K^+ que podem atingir 6000mg/l nos meios fermentativos à base de meloço (BASSO⁵, 1991).

Dentro de tais concentrações, a levedura utilizada pode ser considerada tolerante à salinidade, se mantiver o seu metabolismo ativo e boa viabilidade.

Os mecanismos de tolerância ao sal ainda não foram totalmente esclarecidos, parecendo distintos entre as várias espécies de leveduras consideradas osmotolerantes, pertencentes aos gêneros *Saccharomyces*, *Debaryomyces* e *Candida* (TOKUOKA, 1993). É importante lembrar que essas leveduras são típicas de contaminação alimentar, cujo sal referido é o NaCl.

TOKUOKA (1993), considera que o complexo mecanismo de tolerância ao sal sugere a produção de polióis, para manutenção do equilíbrio osmótico; uma adequada composição do envelope celular (parede e membrana plasmática), bem como atividade da ATPase plasmática capaz de manter baixo o teor do íon dentro da célula.

Quanto à produção de polióis, a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, assim como outras, excretam principalmente glicerol como osmorregulador,

⁵ BASSO, L.C. (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP), Piracicaba, SP. Comunicação pessoal, 1991.

enquanto que *Debaryomyces hansenii* o retêm intracelularmente (LARSSON & GUSTAFSSON, 1987). Segundo BELLINGER *et alii* (1990), a proporção de carbono convertida em glicerol por *Saccharomyces cerevisiae* largamente excede a das leveduras osmofílicas. MAIORELLA *et alii* (1984) observaram uma superprodução de glicerol estimulada por vários sais, principalmente o KCl, onde a taxa de produção em relação ao etanol, é muito maior.

Pelo fato do K^+ atuar na célula como ativador numa série de reações da glicólise e outros passos do metabolismo (AMORIM, 1977), um dos motivos para o estímulo da produção deste poliol pelo potássio, poderia residir no fato que este ativasse a glicólise. Entretanto ROTHSTEIN & DEMIS (1953), relataram que na presença do K^+ o consumo de açúcar aumentava 83%, não por um efeito estimulante direto sobre a fermentação, mas pela reversão do efeito inibitório dos íons H^+ . O que é concordante com PEÑA *et alii* (1969) que descobriram que o estímulo da glicólise está relacionada com a absorção de K^+ e na atividade da H^+ ATPase para o equilíbrio do pH interno da célula, importante característica da osmotolerância. Assim, WATANABE *et alii* (1991) descreveram a espécie *Saccharomyces cerevisiae* como sensível ao sal, se comparada à espécie sal-tolerante *Zygosaccharomyces rouxii*. Os autores encontraram uma queda de 50% na atividade de ATPase da primeira, quando exposta à 31.200mg de K^+ por litro na forma de KCl, sendo que *Z. rouxii* manteve alta sua atividade.

A absorção de K^+ é um dos fatores do qual decorre a acidificação do meio extracelular durante a fermentação (CONWAY & DOWNEY, 1950a e b; CONWAY & BRADY, 1950; SIGLER *et alii*, 1981 e KOTYK, 1989). Esse transporte é permitido pela diferença de potencial eletroquímico que é gerada pela

extrusão de H^+ com hidrólise do ATP, mediada pelo H^+ -ATPase da membrana plasmática (VILLALOBO, 1984 e CALAHORRA, *et alii* 1987).

Embora o transporte de K^+ seja favorecido pela H^+ -ATPase, um transporte específico para ele já havia sido proposto (CONWAY *et alii*, 1950; CONWAY & KERNAN, 1955 e CONWAY & DUGGAN, 1958), mas passível de haver competição entre outros cátions alcalinos como o Mg^{+2} pelo mesmo carreador (ARMSTRONG & ROTHSTEIN, 1964). Ainda em relação a outros minerais, a excreção e K^+ possibilita a absorção de Zn^{+2} e Co^{+2} (JONES *et alii*, 1981), e o fosfato só é absorvido na presença de K^+ (AMORIM, 1977).

Sabe-se que o transporte de K^+ é possibilitado numa ampla faixa de concentrações do íon, por constituir-se de um sistema duplo: em baixas concentrações de K^+ funciona com alta afinidade (K_m 2mM) e em altas concentrações de K^+ com baixa afinidade (K_m 24mM), como descrito por RODRIGUEZ-NAVARRO e RAMOS (1984).

A habilidade da célula em absorver K^+ , deve-se à acidificação intracelular causada pela utilização da glicose, especialmente em fermentação, quando ácidos orgânicos são produzidos (CONWAY & DOWNEY, 1950a e b; CONWAY & BRADY, 1950 e SIGLER *et alii*, 1981).

De fato, o ácido orgânico mais abundantemente produzido pela fermentação é o ácido succínico, também responsável por parte da acidificação externa. Na presença de K^+ , CONWAY & BRADY (1950) notaram a retenção do ácido pela célula. Tal observação foi comprovada por DURO & SERRANO (1981), onde o efluxo de succinato foi inibido em 25% na presença de KCl 0,1M. Ainda KOTYK (1989) refere-se à maior produção de ácido succínico em anaerobiose e

sem K^+ . A adição de potássio, segundo COOTE *et alii* (1973), não afetou a excreção de piruvato.

A absorção de K^+ , propicia uma alcalinização do pH_i (PEÑA, 1975) que reverte a acidez induzida pela glicose, segundo descrevem VALLE *et alii* (1987), e isto poderia ser explicado pela sua retenção na forma de succinato de potássio (CONWAY & BRADY, 1950).

A célula retém o K^+ , e o acumula (RODRIGUEZ-NAVARRO e RAMOS, 1984), mas com a exaustão da glicose, este passa a ser excretado. A perda de K^+ foi quantificada por SCOTT *et alii* (1951), sendo de 30% e por SEASTON (1976) como sendo de 70%.

Com todas essas oscilações nos seus teores, a levedura finaliza uma fermentação com um teor de K^+ na faixa de 1,5 a 3,0 g/100g M.S. (GOMES, 1988).

2.2.3. Sulfito

A sulfitação ao caldo de cana como clarificante resulta em melaços com teores que podem atingir 700 mg/l, fornecendo mostos com até 175 mgSO₂/l (BASSO⁶, 1991). O mosto sulfitado pode comprometer seriamente o desenvolvimento da fermentação alcoólica, devido à sua ação no metabolismo da levedura.

Utilizado durante séculos na sanificação de dornas na fabricação de vinho, o sulfito é atualmente adicionado aos mostos de uva antes da fermentação e para esta aplicação REED e PEPPLER (1973) assumem que a levedura tem capacidade de adaptar-se a altos níveis de SO₂ por meio do preparo de culturas iniciais, embora respondendo com uma maior produção de acetaldeído.

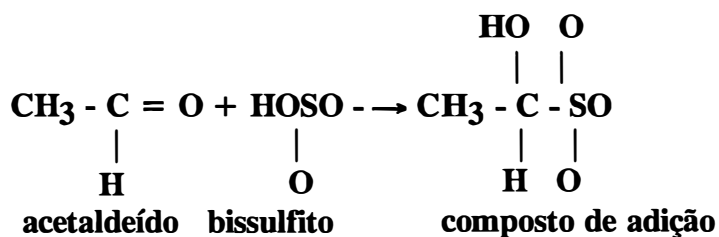
⁶ BASSO, L.C. (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP), Piracicaba, SP. Comunicação pessoal, 1991.

Sabe-se que este comprometimento do metabolismo afeta o equipamento enzimático responsável pela conversão do açúcar em etanol. Este fato é de real importância se considerarmos a produção de etanol combustível onde é visado a uma máxima eficiência fermentativa e qualquer distúrbio a esse nível reflete em quedas drásticas de produtividade.

O dióxido de enxofre é muito reativo e seu efeito tóxico é severamente dependente de pH devido à presença de duas constantes de dissociação. Entre os valores de pH de 5,0 e 9,0, há uma mistura de formas bissulfito (HSO_3^-) e sulfito (SO_3^{2-}) sendo o $\text{pK}_2 = 6,91$. Já em valores mais baixos de pH coexistem as formas de bissulfito e dióxido de enxofre (SO_2) com $\text{pK}_1 = 1,81$. O SO_2 é altamente reativo e combina-se com o O_2 formando sulfato, sem efeito tóxico (CARR *et alii*, 1976 e ANACLETO & van UDEN, 1982).

Considerando que a fermentação alcoólica o pH inicial é de 2,5 finalizando entre 3,5 e 4,0, na ausência de oxigênio, parte significativa do sulfito encontra-se na sua forma mais tóxica, o SO_2 . Embora transportado seletivamente para o interior da célula na forma de SO_2 , os efeitos a nível metabólico são descritos como bissulfito ou sulfito, uma vez que o pH intracelular encontra-se ao redor de 6,0 (ANACLETO & van UDEN, 1982).

A forma de bissulfito combina-se amplamente com aldeídos, ácidos orgânicos e outros componentes do mosto para formar ácidos hidroxissulfônicos pela reação com grupos carbonílicos:



Desta forma, o HSO_3^- também reage com cetoácidos tais como o ácido pirúvico e o alfa-acetoglutárico (REED & PEPLER, 1973). Os compostos de adição como acetaldeído-bissulfito são bactericidas (CARR *et alii*, 1976).

BASSO⁷ (1991) verificou que na adição de 100mgSO₂/l na forma de NaHSO₃, 40% reage com componentes do mosto e apenas 45% do acetaldeído teórico pôde ser detectado. Uma queda na viabilidade celular, diminuição do crescimento e da eficiência fermentativa também foram observados pelo autor.

Os prejuízos causados pelo sulfito durante a fermentação e respiração foram quantificados por BRECHOT *et alii* (1969), através das seguintes observações: inibição da fermentação de 30 a 40%; inibição da respiração de 40 a 80% e um aumento na "fermentação aeróbica" de 30 a 60 %, que os autores consideraram como sendo um "Efeito Pasteur Negativo".

GIBBONS & WESTBY (1987) estudaram os efeitos do metabissulfito de sódio, que também libera SO₂, na produção de etanol combustível a partir da beterraba e observaram que maiores teores de metabissulfito foram responsáveis pela queda na produção de etanol, considerando parte do açúcar desviado para manutenção celular, que houve queda na viabilidade celular. Entretanto HERRAIZ *et alii* (1989) não encontraram variação significativa nos teores alcoólicos nem na formação de glicerol na fermentação de mosto de uva sulfitados na concentração de 120 mg/l a temperatura de 21°C a pH 3,2, embora houvesse aumento significativo na produção de acetaldeído. Um aumento na produção de glicerol com adição de 100mgSO₂/l e no pH 3,8 foi encontrado por RANKINE &

⁷ BASSO, L.C. (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP), Piracicaba, SP. Comunicação pessoal, 1991.

BRIDSON (1971), que concluíram haver interação entre os efeitos do pH, linhagem de levedura e SO₂.

A formação de compostos voláteis durante a fermentação é afetada pelo sulfito, alterando a composição característica de vinhos não sulfitados (HERRAIZ, 1990). GUTIERREZ (1988) observou que na presença de 219 mg de SO₂ por litro de meio de melaço não houve alteração na produção de etanol a pH 4,0, havendo um aumento no teor de acetaldeído e redução de álcoois superiores. OURA (1977) não detectou variação nos teores de ácido succínico com a presença de sulfito, assim como WHITING & COGGINS (1960).

O efeito extremado do sulfito sobre a célula é a própria morte celular observada por vários autores, seja pela queda de viabilidade, seja pela perda da capacidade de formar colônias em meio YEPD (SCHIMZ, 1980).

O efeito letal é devido primariamente à ação do dióxido de enxofre, que em valores de pH mais baixos se ligaria a sítios receptores da superfície da membrana, possibilitando o desencadeamento dos distúrbios intracelulares que acarretariam a morte celular. Baseados neste raciocínio, ANACLETO & van UDEN (1982) estudaram a cinética da morte celular em função do aumento da concentração de sulfito e da temperatura.

O modelo cinético da morte celular pelo sulfito, proposto pelos autores, revela a existência de dois sítios presentes na superfície externa da membrana, permitindo algumas especulações. O primeiro sítio o SDD, o sítio de morte pelo sulfito, tem alta afinidade pelo SO₂ e seria uma proteína. Quando o SO₂ se liga a ele, o sítio SDD funcionaria como um catalisador diminuindo a energia de ativação para a termodesnaturação ou ativação da ATPase. Nas concentrações letais, todos os sítios estariam saturados pelo SO₂. A cinética não é

função da temperatura devido à ação de um segundo sítio EM, modulador da entropia, que ocupado pelo SO_2 aumenta a entropia do processo de desnaturação, induzido pela ocupação do sítio SDD. O sítio EM seria provavelmente uma proteína ou outra região da mesma proteína que contém o sítio SDD. No estado de saturação dos sítios ocorre a morte celular.

Os distúrbios causados pelo sulfito a nível molecular têm sido descritos na literatura, embora a maior parte desses trabalhos tenham se desenvolvido em concentrações de sulfito de 10 à 100 vezes maiores que as normalmente encontradas na preservação dos alimentos (SCHIMZ & HOLZER, 1979).

WILLIAMS *et alii* (1935) observaram a clivagem da vitamina B₁ nas porções tiazólicas e pirimidínicas da molécula de tiamina e seus derivados fosforilados. A tiamina pirofosfato é cofator da piruvato descarboxilase e sua destruição provoca excesso de produção de piruvato e glicerol (WHITING, 1976).

Ataques nucleofílicos pelo sulfito foram detectados em coenzimas oxidadas, como o NAD^+ (JOHNSON & SMITH, 1976) e reduzidas, NADH (TUAZON & JOHNSON, 1977). O sulfito reage facilmente com proteínas que contêm FAD como grupo prostético (MÜLLER & MASSEY, 1969).

Segundo HAYATSU & MILLER (1972) os nucleotídeos de citosina são desaminados a uracila e em concentrações de SO_2 tais como as encontradas na atmosfera, já é observada a clivagem de DNA, numa reação dependente de O_2 .

Com relação às proteínas, o efeito do sulfito recai sobre as pontes de dissulfeto da cistina que são sulfitolisadas (COLE, 1967) e sobre a oxidação da metionina formando metionina sulfóxido (YANG, 1970).

SCHIMZ & HOLZER (1979) observaram que há um período de insensibilidade ao sulfito, na lag-fase e este período pode ser reduzido com o aumento da concentração de sulfito. O abaixamento do pH de 5,0 para 3,0 ocasiona

um decréscimo na produção de ATP de 10 vezes, enquanto que um aumento da temperatura de 10°C para 25°C induz a um rápido decréscimo de 4 vezes no conteúdo de ATP. Os efeitos do sulfito são reversíveis até um limite de tempo, acima do qual se tornam irreversíveis.

HINZE & HOLZER (1986) analisaram o metabolismo energético da levedura frente ao sulfito. A uma concentração de 5mM ocorre uma acentuada queda no nível de ATP intracelular, acompanhada por um aumento na produção de fosfato inorgânico, também decorrente da hidrólise de outros nucleotídeos, GTP, UTP e CTP. O "pool" de ATP é mantido na célula através de um equilíbrio estacionário regulado pelas fosforilações/desfosforilações. Os autores utilizaram dois tipos de levedura, a mutante *pet 936* deficiente em F₁-ATPase mitocondrial e o tipo selvagem crescidas em meio aeróbico. O comportamento de ambas na alteração dos níveis de ATP e Pi foram muito similares. O mesmo ocorreu com a inibição da atividade do gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase incubada com sulfito. Em função dessas observações os autores concluíram que a queda nos níveis de ATP é devido à inibição da fosforilação a nível de substrato, que ocorre na via glicolítica, embora admitam que em células intactas, o aparato mitocondrial também seja prejudicado a nível de fosforilação na cadeia respiratória.

MAIER *et alii* (1986), observaram que os níveis de ribonucleosídeos fosfato sofrem drástico decréscimo na presença de 2mM de SO₂ a pH 3,6. Os teores de ATP caem, juntamente com o de ADP com conseqüente aumento de AMP, sendo os teores deste último, idênticos à soma ATP + ADP enquanto que a atividade da ATPase, aumenta com 1mM de SO₂. Porém a acidificação interna causada pelo sulfito (de pH 7,4 para 5,4) que ativa a ATPase não explica a diminuição do "pool" de ATP.

Em aerobiose o consumo de açúcar caiu com 0,2mM de SO₂ e cessou com 1mM a pH 3,6. Durante a fermentação a queda de produção do etanol foi significativa com 0,2mM de SO₂ e também cessou com 1mM. Com relação ao efeito do sulfito sobre as enzimas glicolíticas, a inibição de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase foi de 98% com o sulfito interagindo com a enzima, enquanto que a inibição da desidrogenase alcoólica (80%) mostrou-se competitiva, dado pelo composto de adição de acetaldeído-bissulfito, com reversão da inibição a altas concentrações de acetaldeído (cerca de 25mM). Como o efeito inibitório é reversível, o SO₂ portanto não interage com esta enzima.

2.2.4. Concentração de substrato

O substrato utilizado na fermentação do etanol para combustível no Brasil é a sacarose, que após hidrólise externa é absorvida como glicose e frutose, cujas concentrações são altas o suficiente para induzir repressão catabólica da respiração, favorecendo a fermentação, mesmo que em aerobiose, pelo denominado efeito Crabtree (RATLEDGE & EVAN, 1989).

A repressão catabólica, que ocorre a partir de 2g/l de glicose expressa-se a nível das enzimas citoplasmáticas do ciclo do glioxilato (POLAKIS & BARTLEY, 1965 e CHAPMAN & BARTLEY, 1968), a nível das enzimas mitocondriais (ROSSI *et alii*, 1964; POLAKIS *et alii*, 1964; HAUBER & SINGER, 1967; CHAPMAN & BARTLEY, 1968 e MACHADO *et alii*, 1975) e

sobre a estrutura e número de mitocôndrias (BLEEG *et alii*, 1972 e PERLAMN & MAHLER, 1974) até o desaparecimento completo da referida organela (POLAKIS *et alii*, 1964; POLAKIS *et alii*, 1965 e DUNTZE *et alii*, 1969). Em concentrações elevadas de glicose (5 e 10%) o efeito repressivo do substrato elimina ou reduz possíveis diferenças entre linhagens selvagens e deficientes respiratórias (GASPARINI, 1986).

O efeito de altas concentrações de açúcar sobre o metabolismo da levedura vem sendo estudado, principalmente sob os aspectos dos mecanismos de tolerância frente às altas pressões osmóticas decorrentes. Porém, a terminologia "tolerante ao açúcar" segundo KREGGER-van RIJ (1984) é empregada para aquelas leveduras capazes de crescer em agar contendo 50% de glicose (P/V), as quais raramente pertencem à espécie *Saccharomyces cerevisiae*, mas freqüentemente aos gêneros *Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Candida*, *Torulaspota* e *Debaryomyces*.

A alta concentração de substrato permite um alto teor alcoólico, que é desejável a nível industrial pois reduz os custos da destilação, além de propiciar maior assepsia. No entanto, os efeitos danosos são sentidos pela levedura, que reduz a viabilidade (NAGODAWITHANA *et alii*, 1974 e NAGODAWITHANA & STEINKRAUS, 1976) o crescimento e a fermentação, prejuízos que relacionam-se com o acúmulo de etanol intracelular no início da fermentação (D'AMORE *et alii*, 1988).

PANCHAL & STEWART (1980) observaram que a produção de etanol a partir do teórico esperado decai com o aumento da pressão osmótica, seja ela proporcionada pela sacarose ou pelo sorbitol adicionados, devido à produção de glicerol, que é aumentada nessas condições. O glicerol difunde-se mais

rapidamente para fora da célula, enquanto que a excreção do etanol é retardada. Assim, os maiores níveis de etanol intracelulares reduzem a viabilidade e há uma eventual redução na taxa de fermentação.

Segundo HOLCBERG & MARGALITH (1981) a imobilização de células permite maior viabilidade celular a altas concentrações de glicose, com alta produção de etanol. Contudo BAJPAI *et alii* (1988) observaram o contrário, uma queda na eficiência fermentativa com células imobilizadas.

GUTIERREZ (1989) observou acúmulo de trealose, aumento no crescimento e queda na eficiência fermentativa com o aumento da concentração de açúcar. Como a redução na eficiência fermentativa correlaciona-se com o aumento da produção de glicerol, este é considerado um soluto osmorregulador, o aumento na pressão osmótica decorrente de elevadas concentrações de açúcar ocasionaram aumento na sua síntese (PANCHAL & STEWART, 1980; KENYON *et alii*, 1986; LARSSON & GUSTAFSSON, 1987; GUTIERREZ, 1989; BELLINGER *et alii*, 1990 e TUKUOKA, 1993). Entretanto, para espécies osmotolerantes, o glicerol produzido é acumulado intracelularmente (JOVALL *et alii*, 1990 e TUKUOKA, 1993) e não é excretado como em *Saccharomyces cerevisiae*. Embora haja linhagens de *S. cerevisiae* selecionadas para crescimento em altas concentrações de açúcar (BERTOLINI *et alii*, 1991) não foi estudada sua capacidade de síntese e/ou acúmulo de glicerol.

BRUMM & HEBEDA (1988) relataram que nas mais altas concentrações de glicose, a produção de glicerol relativa, ou seja, a razão entre glicerol e etanol ao final da fermentação, decaiu. Isto contrapõe-se à idéia de que, se o glicerol tem função osmorreguladora, para tal, a relação deveria manter-se estável ou crescer. Assim, os autores propõem um mecanismo para produção de

glicerol com dois moduladores. Primeiro seria a pressão osmótica do meio, estimulando a síntese de glicerol como estabilizador. O segundo modulador seria a taxa de fermentação, em altas concentrações de substrato, que sendo absorvido e rapidamente metabolizado, a taxa de formação de NADH a partir da triose-fosfato excede a taxa de redução do acetaldeído, desviando o fluxo glicolítico para a síntese de glicerol. Este, segundo os autores, seria o principal motivo da produção de glicerol.

EKUNSANMI & ODUNFA (1990) sugeriram que leveduras que sejam mais tolerantes ao etanol também tendem a ser mais tolerantes aos estresse osmótico. A tolerância ao etanol é particularmente importante desde que a sua toxidez é mais difícil de ser evitada do que a inibição pelo substrato. Esta pode ser contornada por adições parceladas do substrato, que permite maior viabilidade (NAGODAWITHANA *et alii*, 1974 e PANCHAL & STEWART, 1989), menor produção de glicerol (KENYON *et alii*, 1986), conseqüentemente melhor desempenho fermentativo, com células mais saudáveis para o reciclo (PANCHAL & STEWART, 1989).

A toxidez pelo etanol, portanto, é o maior inconveniente das fermentações com altas concentrações de açúcar. Conforme relatado anteriormente, no item 2.1.1.1., a toxidez pelo etanol é exacerbada pelos subprodutos tóxicos da fermentação, entre eles, o ácido acético. De acordo com MONK & COWLEY, (1984), com altas concentrações de açúcar há uma maior produção de ácido acético, com redução no crescimento da levedura.

Quanto ao ácido succínico, KLEINZELLER (1941) observou ser este um produto estável, cujo teor é proporcional ao açúcar consumido, o que foi confirmado mais tarde por LUPIAÑES *et alii* (1974) com ainda as constatações

que este não se acumula, sendo excretado pelas células, na condição metabólica similar de mutantes "petite" induzidas pela glicose.

Finalmente, quanto ao acúmulo de trealose DELGADO (1993) não constatou tendências significativas com o aumento da concentração de açúcar nos teores finais desse carboidrato, mas observou uma tendência ao maior crescimento com concentrações mais elevadas.

2.2.5. pH

A concentração hidrogeniônica é um fator significativo para as fermentações industriais devida a sua importância tanto no controle da contaminação bacteriana quanto ao seu efeito sobre o crescimento da levedura, taxa de fermentação e formação de subprodutos. As principais contaminantes são as bactérias formadoras do ácido láctico e seu desenvolvimento é severamente reprimido a valores de pH abaixo de 5 (JONES *et alii*, 1981). De fato, GALLO (1989) observou a redução de 44,6% no número de bactérias após o tratamento ácido. Foi sugerido por PARSON *et alii* (1984) que a faixa de pH ótima para fermentação fosse entre 2,8 e 3,2, onde se mantém alta a produção de etanol, no entanto GOMES (1988) observou maiores perdas de nutrientes a valores baixos de pH, nomeadamente nitrogênio e potássio.

Os valores de pH dos meios fermentativos industriais geralmente encontra-se na faixa de 4,5 a 5,0 com uma boa capacidade tamponante (JONES *et alii* 1981), mas algumas leveduras mantêm sua homeostase de forma quase independente dos valores de pH do meio, bem como da sua capacidade tamponante (ERASO & GANCEDO, 1987). De modo que, sob uma faixa de pH externo, entre 3

e 8, o pH_i encontra-se entre 6 e 7, com um gradiente interno do centro para a periferia da célula, sendo mais ácido próximo à membrana (SLAVIK & KOTYK, 1984).

A acidificação intracelular é induzida pela presença de glicose, que é revertida pela capacidade que a levedura tem em expulsar os íons hidrogênio para o meio, mediada pela H^+ -ATPase da membrana plasmática, que gera um potencial eletroquímico (VILLALOBO, 1984 e CALAHORRA *et alii*, 1987) permitindo a absorção de K^+ e alcaliniza o meio intracelular (VALLE *et alii*, 1987). O pH_i é mantido pela atuação conjunta das ATPases da membrana plasmática, vacuolar e mitocondrial (BEAUVOIT *et alii*, 1991). A H^+ -ATPase sofre mudanças na sua conformação, desencadeada por H^+ , que permite sua atividade otimizada (BLANPAIN *et alii*, 1992) na faixa de pH externo ao redor de 6 (WACH & GRÄBER, 1991), muito embora o pH externo abaixo de 4 triplique a atividade da ATPase, dobrando sua afinidade pelo ATP, sem contudo alterar seu pH ótimo (ERASO & GANCEDO, 1987).

Segundo GAO & FLEET (1988), a diminuição do pH externo de 6 para 3 aumenta a sensibilidade da levedura ao etanol, que de acordo com CARTWRIGHT *et alii* (1986) dissipa a força protomotiva da membrana, reduzindo o pH_i abaixo do ótimo para as enzimas glicolíticas e alcogênicas. Esse feito é aumentado na presença de ácidos orgânicos fracos, principalmente nos valores de pH_i abaixo do pK dos ácidos, aumentando a toxidez pelo etanol, de modo sinérgico como o caso do ácido acético (PAMPULHA & LOUREIRO, 1989). Para o ácido octanóico, VIEGAS & SÁ-CORREIA (1991) buscaram uma ativação da ATPase da membrana pelo ácido, que não ficou muito evidente. Todavia, DOMBEK & INGRAM (1987) descreveram uma manutenção do pH_i

próximo à neutralidade, a despeito da acidificação externa, com teores de etanol ao redor de 12%. Esta observação pode ser explicada pela constatação de ROSA & SÁ-CORREIA (1991) de que o etanol nas concentrações entre 6 e 8% (V/V) ativa *in vivo* a ATPase da membrana plasmática de *S. cerevisiae*, o que foi confirmado também por COOTE *et alii* (1991). De qualquer maneira, a redução do pH; mesmo que rapidamente revertida, aumenta os teores de AMPc que ativam a trealase (VALLE *et alii*, 1987).

Além da ativação da H⁺-ATPase da membrana plasmática expelindo prótons, a levedura possui outros mecanismos de acidificação do meio externo durante a fermentação iniciada a um pH ao redor de 4,5-5,0; são eles, a liberação do gás carbônico, a absorção do K⁺, e a excreção de ácidos orgânicos (CONWAY & DOWNEY, 1950a, b; CONWAY & BRADY, 1950; SIGLER *et alii*, 1981 e KOTYK, 1989).

A excreção de ácidos orgânicos, bem como a absorção de aminoácidos básicos têm um substancial efeito na acidificação externa (COOTE & KIRSOP, 1976). A excreção do piruvato é máxima nos valores de pH entre 4 e 4,5 (LAFON-LAFOURCADE & PEYNOUD, 1966), embora COOTE *et alii* (1973) não tenham encontrado o mesmo efeito. SHIMAZU & WATANABE (1981) não detectaram significativas diferenças nos teores de ácido acético com o aumento do pH de 3 para 4, enquanto que o succinato aumentou consideravelmente. Finalmente, quanto ao glicerol, pH alcalinos propiciam sua formação (HAJNY *et alii*, 1960), que é fundamentalmente dependente da linhagem de levedura empregada (RANKINE & BRIDSON, 1971).

2.2.6. Temperatura

A temperatura é sem dúvida um dos fatores ambientais mais importantes, que influencia todas atividades dos microrganismos, e a levedura, não é uma exceção (WATSON, 1987).

Segundo JONES *et alii* (1981), a temperatura ótima para a fermentação é de 5 a 10°C acima do ótimo para o crescimento, que para WATSON (1987) encontra-se na faixa de 25 a 30°C. Para a levedura *Sacharomyces uvarum* o ótimo para o crescimento, relatado por BROWN & OLIVER (1982) foi de 35°C, o mesmo valor foi encontrado por WALSH & MARTIN (1977) para um grupo B, enquanto que para o grupo A foi 30,4°C. MARQUES (1991) observou maiores eficiências a 25°C do que a 30°C. De acordo com MERRIT (1966), quando a temperatura de 42°C é atingida, o crescimento cessa.

Essas considerações se revestem de particular interesse, posto que nas regiões tropicais a temperatura do processo facilmente atinge 40°C. Assim, como uma refrigeração adequada para o processo muitas vezes pode ser inviável, ou ineficiente, o uso de leveduras termotolerantes faz-se procedente (SAIGAL & VISWANATHAN, 1984).

Leveduras que crescem a 40°C ou acima, são consideradas termotolerantes (PANCHAL & TAVARES, 1990). No entanto, a capacidade de fermentar a essas temperaturas, geralmente é reduzida.

Espécies de *Kluyveromyces* tem sido descritas como capazes de fermentar em temperaturas ao redor de 45°C; são elas *K. marxianus* (HACKING *et alii*, 1984; BAJAPAI & MARGARITIS, 1987; e SAMPAIO & SPENCER-MARTINS, 1989) e *K. fragilis* (SÁ-CORREIA & van UDEN, 1982; SÁ-

CORREIA & van UDEN, 1983; HACKING *et alii*, 1984; SLCZODRAK *et alii*, 1988). Essas espécies contudo, não são mais aptas ao bom desempenho fermentativo, nem tão pouco tolerantes ao etanol, quando comparadas à *Saccharomyces cerevisiae* (KROWEL & BRABER, 1979).

Não obstante a utilização de temperaturas mais elevadas reduza o tempo de fermentação, a taxa de morte celular aumenta (NAGODAWITHANA *et alii*, 1974). Isto porque a sensibilidade da *S. cerevisiae* ao etanol aumenta, com o aumento da temperatura (NAVARRO & DURAND, 1978; D'AMORE & STEWART, 1987 e GAO & FLEET, 1988).

De acordo com van UDEN (1985), como não há acúmulo de etanol na célula, o efeito inibitório do etanol sobre a fermentação torna-se significativo em altas temperaturas. Assim, NAVARRO (1980) observou que a enzima hexoquinase de *Saccharomyces carlsbergensis* mostrava-se sensível ao etanol 10% na temperatura de 30°C.

O etanol acelera a morte térmica (LEÃO & van UDEN, 1982), diminuindo a temperatura máxima para o crescimento (LOUREIRO & van UDEN, 1982) bem como aumentando a temperatura mínima (SÁ-CORREIA & van UDEN, 1983). O alvo da morte térmica induzida pelo etanol foi sugerido por CABEÇA-SILVA *et alii* (1982) como sendo a mitocôndria, mais especificamente, a membrana interna mitocondrial, por esta ter maior dificuldade em aumentar a saturação de seus fosfolipídios, tornando-se susceptível.

O aumento da temperatura também induz a uma queda nos teores das proteínas da célula e dos ácidos nucleicos (IDRIS EL SHERT & BERRY, 1980 e PARADA & ACEVEDO, 1983), conseqüentemente diminuindo o crescimento

(KROWEL & BRABER, 1979). Foi detectado por GOMES (1988) perdas de nutrientes, tais como fósforo e potássio na temperatura de 40°C.

Segundo LALUCE *et alii* (1990) a termotolerância é um caráter controlado por fatores genéticos e nutricionais, fato que levou alguns autores a buscarem por meio de seleção, leveduras com tais características (SANTOS, 1988; D'AMORE *et alii* e DELGADO, 1993), ou ainda, por meio de técnicas de manipulação genética (PANCHAL *et alii*, 1982).

A suplementação do meio fermentativo com nutrientes permite manifestações fisiológicas desencadeadas pela temperatura através de algumas alterações que propiciam a termotolerância. Desta feita, as leveduras mudam as características dos ácidos graxos de suas membranas, visando a manutenção da integridade das mesmas, modificações essas que podem também ser favorecidas pela presença de etanol (MISHRA & PRASAD, 1989). De modo que são aumentadas as proporções de ácidos graxos saturados (ALTERTHUM & CRUZ, 1987 e LOW & PARKS, 1987) bem como o tamanho de suas cadeias (ALTERTHUM & CRUZ, 1987 e SUUTARI, 1990).

Uma exposição rápida das leveduras a altas temperaturas (choque térmico) sob condições específicas, induz à síntese de substâncias relacionadas à termotolerância, nomeadamente, a trealose (GRBA *et alii*, 1975; HOTTINGER *et alii*, 1987 e RIBEIRO, 1993) e as proteínas de choque térmico (DE VIRGILIO *et alii*, 1991; WINKLER *et alii*, 1991; ELEUTHERIO *et alii*, 1993a e RIBEIRO, 1993), embora a termotolerância não requeira necessariamente essas substâncias (WATSON, *et alii*, 1984 e PANEK *et alii*, 1990).

COOTE *et alii* (1991) sugeriram que a aquisição de termotolerância induzida pela temperatura, etanol, ácidos fracos (sórbito) e pelo abaixamento do

pH externo é desencadeado por um mecanismo envolvendo o pH e a atividade aumentada da ATPase plasmática.

De uma maneira geral, o aumento da temperatura aumenta a excreção dos ácidos pirúvico (RANKINE, 1965; LAFON-LAFOURCADE & PEYNOUD, 1966 e COOTE *et alii*, 1973) e succínico (de 10 a 30°C) sem quase afetar o acético, mesmo quando a temperatura oscila ao redor de 40°C. A queda na síntese do ácido succínico a 40°C pode refletir os distúrbios causados pela temperatura, segundo SHIMAZU & WATANABE, (1981). Quanto ao glicerol, na fabricação de vinhos, onde a temperatura do processo é relativamente baixa, se comparada àquelas de produção de álcool combustível, o aumento de 15 para 25°C induz a um aumento na síntese de glicerol que pode ser até dobrada, de acordo com a linhagem empregada (RANKINE & BRIDSON, 1971).

2.2.7. Diferentes leveduras e concentrações de inóculo

Nas condições industriais da fabricação do etanol combustível, a fermentação rápida é permitida devido às altas concentrações de inóculo utilizadas e conseqüentemente às altas temperaturas (PANCHAL & TAVARES, 1990).

A recirculação da levedura permite a manutenção da alta concentração celular e a maior eficiência obtida é decorrente de um menor consumo de açúcar utilizado para formação de células (CASEY *et alii*, 1984 e AMORIM *et alii*, 1985), que de acordo com as condições da fermentação pode desviar de 2 a 10% do açúcar total (STUPIELLO & HORII, 1982). Nesta ótica, a estratégia do controle operacional sugerida por FINGUERUT *et alii* (1987) foi a de manter a concentração de leveduras a mais alta possível evitando as perdas no

processo e aumentando a velocidade de conversão de açúcares a partir de células vivas e adaptadas. As altas concentrações iniciais de célula ocasionam menor crescimento (NAGODAWITHANA *et alii*, 1974; STREHAIANO *et alii*, 1983 e VEGA *et alii*, 1987), e permitem maiores taxas de produção de etanol (CACHOT *et alii*, 1991), enquanto que a remoção de células determina queda na eficiência fermentativa (DE MARTIN, 1988).

NAGADOWITHANA & STEINKRAUS (1976) observaram que fermentações rápidas contendo alta população de células requerem suplementação nutricional, muito embora isto não as proteja da queda de viabilidade determinada pela temperatura mais elevada. Os autores consideraram que esse efeito fosse devido à toxidez pelo etanol intracelular. Contudo, VEGA *et alii* (1987) concluíram que o aumento da concentração de inóculo diminui a severidade da inibição pelo etanol, sugerindo que essa variável fosse incluída nos modelos cinéticos de inibição da fermentação pelo etanol.

A queda da viabilidade na indústria durante o início da safra, conhecida até então por "fase de adaptação" da levedura, hoje é considerada uma fase de substituição, tendo em vista os recentes trabalhos de identificação de leveduras pela técnica de eletroforese do DNA cromossômico intacto desenvolvidos por BASSO *et alii* (1993) e corroborados por NONATO⁸ (1993). Assim, as leveduras contaminantes podem ser indesejáveis, prejudicando o processo, ou desejáveis, apresentando no transcorrer da safra, por vezes, desempenhos superiores ao esperado, sendo tais leveduras consideradas adequadas ao processo industrial, conquanto são selecionadas *in loco*. Estas leveduras compreendem um

⁸ NONATO, R. (Copersucar, Piracicaba, SP). Comunicação pessoal, 1993.

rico material para futuros estudos bioquímico-fisiológicos, genéticos e microbiológicos para caracterizar as peculiaridades metabólicas que permitem-nas dominar sobre as outras populações, comparando-as com àquelas amplamente estudadas, hoje consideradas por BASSO *et alii* (1993) "starters", nomeadamente, Fleischmann, IZ-1904 e TA(M-300-A). Essa característica, ou melhor, conjunto de características a qual pode-se designar "rusticidade" pode tornar-se mais um tópico a ser acrescentado aqueles descrito por PANCHAL & TAVARES (1990) para uma levedura "ideal" à produção de etanol combustível.

A espécie de levedura *Saccharomyces cerevisiae* hoje engloba um variado número de antigas espécies do gênero *Saccharomyces*, tais como as mais estudadas leveduras, consideradas por WHITING (1976), da indústria de cervejaria *S. uvarum* e *S. bayanus*, da indústria de champanhe, assim como várias outras, cujos critérios de classificação encontram-se descritos em YARROW (1984). Em 1981, JONES *et alii* consideraram *S. cerevisiae* mais adequada à produção de etanol combustível do que *S. uvarum*, por ser mais tolerante às condições adversas do ambiente industrial.

Estudos iniciais concernentes à atividade respiratória e fermentativa da então denominada *S. carlsbergensis* (IZ-1831) foram realizados por HORII (1972). De acordo com as condições e tempo de cultivo essa levedura mostrou ter elevada capacidade fermentativa.

Maiores eficiências fermentativas foram encontradas para *S. cerevisiae (uvarum)* IZ-1904 por BASSO⁹ (1987) e por GUTIERREZ (1989) se comparada às *S. cerevisiae* Fleischmann e M-300-A. No entanto, com os ciclos consecutivos, *S. cerevisiae (uvarum)* exauriu suas reservas de glicogênio e trealose acompanhada pela queda acentuada da viabilidade (BASSO⁹, 1987).

⁹ BASSO, L.C. Relatório de pesquisas em fisiologia e bioquímica de leveduras. FERMENTEC, Piracicaba, SP. 1987.

A indução de deficiência respiratória tem resultado em mutantes com maior capacidade de produção de etanol em aerobiose com *S. cerevisiae (uvarum)* (BACILA & HORII, 1979) ou menor capacidade com *S. cerevisiae* (ESSER *et alii*, 1982) e menor crescimento (BACILA & HORII, 1979 e GASPARINI, 1986) ou ainda maior produção de glicerol, a despeito da maior atividade da desidrogenase alcoólica (JOHANSSON & SJÖSTRÖM, 1984). Contudo, as altas concentrações de substrato eliminam ou reduzem as diferenças apresentadas entre as linhagens selvagens e deficientes respiratórias (JOHANSSON & SJÖSTRÖM, 1984 e GASPARINI, 1986), com uma maior autólise das células dos mutantes e provável menor tolerância ao etanol (JOHANSSON & SJÖSTRÖM, 1984).

As diferenças metabólicas entre os vários microorganismos são, via de regra, utilizadas como critérios de classificação. Pode-se depreender daí que a produção de metabólitos excretados pelas leveduras variam amplamente, mesmo a nível de linhagem, como é o caso do etanol, glicerol e ácidos orgânicos.

Diferenças na produção de glicerol foram significativas entre as linhagens de *S. cerevisiae* estudadas por RANKINE & BRIDSON (1971), RADLER & SCHÜTZ (1982) e BELL *et alii* (1991). Nenhuma diferença nas produções de glicerol foi encontrada por GUTIERREZ (1989) e (1991) entre as leveduras *S. cerevisiae* M-300-A e de pacificação, porém foram maiores que a apresentada pela *S. cerevisiae (uvarum)* IZ-1904, frente às variáveis temperatura, pH, concentração de sacarose, fontes nitrogenadas e na presença de 2,4D.

As distinções entre diferentes leveduras (gêneros, espécies e linhagens) na produção de vários ácidos orgânicos encontram-se na revisão realizada por WHITING (1976), no trabalho de SHIMAZU & WATANABE (1981) e mais recentemente, no estudo realizada por BELL *et alii* (1991).

Uma grande variação na produção de ácido succínico, de acordo com as linhagens de *S. cerevisiae* estudadas, foi obtida por COOTE & KIRSOP (1974), HEERDE & RADLER (1978), SHIMAZU & WATANABE (1981) e BELL *et alii*

(1991). Segundo HEERDE & RADLER (1978) quantidades semelhantes de succinato foram produzidas por linhagens deficientes respiratórias em relação ao tipo selvagem.

O ácido acético produzido pelas leveduras também varia com as linhagens de *S. cerevisiae* (COOTE & KIRSOP, 1974, SHARMA & TAURO, 1987 e MILLAN & ORTEGA, 1988). Outras espécies são capazes de produzir mais ácido acético do que *S. cerevisiae*, por exemplo *Torulaspota delbrueckii* (MILLAN & ORTEGA, 1988) e *Candida kruzei* (SHIMAZU & WATANABE, 1981).

Finalmente, quanto à capacidade de acumular trealose, GUTIERREZ (1989) e (1990) observou que *S. cerevisiae* M-300-A e Fleischmann acumularam mais que *S. cerevisiae* (*uvarum*) IZ-1904. DELGADO (1993) trabalhando com treze linhagens de *S. cerevisiae*, observou que aquelas que possuíam maiores teores de trealose, também eram detentoras das maiores viabilidades.

2.2.8. Contaminação bacteriana

A contaminação bacteriana é um sério problema no processo industrial da fabricação do álcool, correlacionando-se negativamente com a eficiência fermentativa, podendo acarretar casos de extremos prejuízos à fermentação (AMORIM *et alii*, 1981 e ALTERTHUM *et alii*, 1984). A contaminação na indústria tem origem nas más condições de assepsia bem como na má qualidade da matéria prima (NGANG *et alii*, 1990).

As contaminantes mais frequentemente encontradas no processo vem sendo isoladas e classificadas (RONDINI, 1985 e GALLO, 1989). De acordo com GALLO (1989) os gêneros mais frequentes são *Bacillus* e *Lactobacillus*, cujas espécies predominantes na população investigada foram: *B. coagulans*, *L.*

fermentum, *L. helveticus*, *B. stearotherophilus*, *L. plantarum*, *L. animalis* e *L. buchneri*. Além destas, outras espécies têm se mostrado importantes, são elas: *L. vaccinostercus*, *L. coryniformes*, *B. brevis*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *Pediococcus* sp, *Leuconostoc* sp e *Sporolactobacillus* sp (OLIVEIRA,¹⁰ 1993).

As espécies de *Lactobacillus* têm ampla distribuição, são espécies, na sua maioria acidófilas, tolerantes ao etanol (TILBURI, 1975 e PRIEST, 1981). vulgarmente denominadas bactérias lácticas. As bactérias lácticas são altamente sacarolíticas, deficientes em passagens anabólicas, exigentes em nutrientes. A maior parte é fermentativa estrita, mas aerotolerante, podem produzir unicamente lactato (homofermentativas), lactato, etanol e gás carbônico: lactato e acetato (heterofermentativas) ou apenas lactato a partir de malato (fermentação malolática) conforme descrito por GOTTSCHALK (1985).

O uso de biocidas no controle da contaminação bacteriana foi estudado a sua ação sobre a levedura por BRAUNBECK (1988). Alguns mostram-se de estreito espectro de atuação e até mesmo reduzindo a produção de etanol (CRUZ *et alii*, 1985). É comum, após algum tempo depois da utilização de biocidas haver uma seleção das bactérias menos sensíveis que acabam por predominar no processo. (OLIVEIRA¹⁰, 1993)

O tratamento ácido, conforme descrito por HORII (1980) ainda é prática efetiva no controle da contaminação (GALLO, 1989).

Segundo RUSSEL (1992), as bactérias resistentes a meios com valores de pH baixos, como as do gênero *Lactobacillus* deixam seu pH declinar, mantendo mais ou menos constantes o pH, evitando assim o acúmulo dos ânions tóxicos da fermentação. O mecanismo bioquímico que permite esta resistência, ainda é um problema não resolvido.

A ampla distribuição de algumas espécies determina estudos concernentes ao seu comportamento, como é o caso do *L. plantarum*, uma das

¹⁰ OLIVEIRA, A.J. (Escola Superior de Agronomia "Luiz de Queiroz"/USP), Piracicaba, SP. Comunicação pessoal, 1993.

principais contaminantes, por exemplo, da fabricação de pães em várias regiões da França (INFANTES & TOURNEUR, 1991), de Marrocos (BORAAM *et alii*, 1993), da indústria de bebidas européias (RADLER, 1975, WHITING, 1975 e BRYAN-JONES, 1975) e como visto, das destilarias de álcool combustível do Brasil. Isto deve-se ao fato de ser uma espécie bem adaptada ao material vegetal (BORRAM, 1993), tornando-se uma das mais evidentes competidoras pelos substratos fermentescíveis juntamente com a levedura, seja no ambiente natural ou industrial. Realmente, na fermentação de suco de laranja, *S. cerevisiae* e *L. plantarum* foram identificadas por KENNES *et alii* (1991a) como os principais microrganismos contaminantes.

Nos ecossistemas naturais, que contêm populações subdominantes metabolicamente ativas, o comportamento dos microrganismos torna-se de difícil compreensão, levando-se em conta que os parâmetros físico-químicos do meio exercem uma pressão seletiva, permitindo mudanças constantes na sua complexa composição química e microbiológica (KENNES *et alii*, 1991a, b). Talvez por isso mesmo nas condições bem definidas da indústria, carece-se de conhecimentos à cerca das relações tróficas e dos antagonismos entre populações microbianas coexistentes entre leveduras do processo e bactérias contaminantes. Segundo BORAAM *et alii* (1993), a coexistência de leveduras com as bactérias lácticas deve-se à habilidade das leveduras sobreviverem no ambiente ácido causado pelos ácidos acético e láctico, bem como pela resistência aos antibióticos produzidos pelas bactérias lácticas. As relações antagônicas, segundo WALKSMAN (1945) são travadas pela produção de uma ampla gama de substâncias tóxicas, compreendendo desde compostos simples como ácidos orgânicos, álcoois até compostos mais complexos como polipeptídeos, proteínas e derivados do metabolismo secundário.

DRYSDALE & FLEET (1989) observaram que a queda no crescimento e na viabilidade de *S. cerevisiae* durante a fabricação de vinho foi

devido a presença de bactérias acéticas, embora parte da inibição pudesse ser devido ao ácido acético, houve indicações de que outras substâncias inibitórias seriam produzidas por essas bactérias. As bactérias acéticas são aeróbicas, de metabolismo oxidativo, difícil estarem presentes na fermentação industrial. O ácido acético é produzido anaerobicamente em grandes quantidades por *L. brevis* e depois por *L. plantarum* (NG, 1972).

O ácido láctico é um produto frequente nas fermentações, e embora possa ser produzido pelas leveduras (WHITING, 1976), sua presença pode ser considerada indicadora da atividade bacteriana (GENEVOIS, 1950). AMIN *et alii* (1983) compararam os subprodutos de *Saccharomyces bayanus* (*S. cerevisiae*) com os de *Zymomonas mobilis* e verificaram ser o glicerol e o ácido succínico típicos da levedura e o lactato típico da bactéria.

NGANG *et alii* (1990) inocularam *S. cerevisiae* juntamente com concentrações crescentes de inóculo de uma bactéria homofermentativas (*L. casei*) e perceberam que a produção de ácido láctico era proporcional ao tamanho do inóculo. A inibição do metabolismo da levedura na presença da bactéria ficou evidente. Todavia, essa inibição não foi somente decorrente do ácido láctico, nem por deficiência nutricional, ficando constatado haver um outro fator de inibição. O surpreendente, segundo os autores, foi ter havido a presença de ácido acético ao final da fermentação, podendo indicar uma conversão da fermentação homofermentativa para heterofermentativa.

Segundo MAIORELLA *et alii* (1983) o mecanismo de inibição pelo ácido acético é diferente do ácido láctico. Este último, é muito menos solúvel em lipídios que o acético, não inibe o transporte de fosfato, embora haja interferência química com funções de manutenção e gasto de ATP. No entanto, a concentração de inibição é muito maior que a produção do ácido acético, necessitando aparecer no teor de 17g/l para reduzir 20% da produção da massa celular, sendo a redução de 80% obtida com 38g/l. É sabido que em condições aeróbicas, com mitocôndrias

ativas, a levedura é capaz de absorver lactato por um sistema específico (CASSIO *et alii*, 1987) podendo utilizá-lo como fonte de carbono, sendo o sistema sujeito à repressão por glicose (GANCEDO & SERRANO, 1989).

O ácido succínico, embora produto característico da levedura durante a fermentação, é produzido por algumas linhagens de *Lactobacillus*. Dentre 86 isolados de melaço de cana da Tailândia, 30 produziram ácido succínico sendo as principais linhagens de *L. reuteri*, que produziram até 2,5mM de ácido succínico a partir do meio básico, 12,4mM a partir do ácido fumárico e 9,1mM a partir de citrato biamônio (KANEUCHI *et alii*, 1988).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Ensaio de fermentação com reciclo de levedura

3.1.1. Leveduras

A espécie de levedura utilizada em todos os experimentos foi *Saccharomyces cerevisiae* do tipo de panificação "Fleischmann" adquirida no comércio. No experimento de comparação de leveduras, além desta, foram utilizadas linhagem M-300-A, comumente denominada TA, e linhagem IZ-1904 fornecidas pelo Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da ESALQ/USP.

3.1.2. Meios fermentativos

3.1.2.1. Meios semi-sintéticos

A maioria dos experimentos foi conduzida com meios semi-sintéticos derivados do meio semi-sintético básico cuja formulação encontra-se apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição do meio semi-sintético básico.

| COMPONENTES | QUANTIDADES |
|------------------------|-------------|
| Sacarose | 150,00 g/l |
| Extrato de levedura | 2,50 g/l |
| Citrato biamônio | 2,26 g/l |
| $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ | 1,14 g/l |
| $MgSO_4$ | 0,24 g/l |
| $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 28,7 mg/l |
| $MnSO_4$ | 16,9 mg/l |

O meio semi-sintético básico era preparado para resultar nos tratamentos definitivos e então procedia-se à esterilização dos mesmos em autoclave durante 20 minutos a 1 atm (121°C). Após resfriamento, os meios definitivos eram acondicionados em frascos plásticos em quantidade suficiente para cada ciclo e congelados.

3.1.2.2. Meios de melão

Obtidos a partir da diluição 1:4 (P/V) do melão industrial com os teores de 64% ART, 2240 mgN/Kg, 100 mgP/Kg e 8.000mgK/Kg. Após a adição dos tratamentos, os meios definitivos eram autoclavados a 1 atm (121°C) durante 20 minutos, resfriados, acondicionados e congelados.

Os procedimentos para a obtenção dos meios definitivos encontram-se nos itens relativos à condução de cada ensaio.

3.1.3. Condução dos experimentos

Os ensaios foram conduzidos com o fermento prensado (ou úmido, como no ensaio de diferentes leveduras), o qual era analisado inicialmente quanto ao teor de trealose, viabilidade e contaminação bacteriana.

O fermento era pesado em tubos tarados de centrífuga com 150 ml de capacidade e suspenso em 20 ml de água esterilizada, a qual em alguns ensaios era preparada para se obter os tratamentos desejados, e a seguir adicionava-se mediante pesagem um volume relativo a 60 ml do meio fermentativo.

Os tubos tampados com folha de alumínio eram incubados a 33°C (ou ainda a 27°C e 38°C como no estudo do efeito da temperatura). As evoluções de fermentação eram avaliadas pelo despreendimento de CO₂ acompanhado por pesagens a cada hora até 7 horas de fermentação.

Com o término da fermentação, procedia-se às análises microbiológicas (viabilidade celular, e contaminação bacteriana) no vinho bruto descritas no item 3.1.4. O fermento era separado do vinho por centrifugação (800 x g durante 15 minutos) para que o vinho delevurado fosse submetido à medição de pH e densidade e depois ser encaminhado às análises (de glicerol, etanol, ácidos orgânicos e açúcar residual) descritas no item 3.1.6.; e o fermento reutilizado no ciclo subsequente. Na ocasião do último ciclo, realizava-se a análise de trealose final.

Os procedimentos específicos de cada ensaio encontram-se descritos a seguir.

3.1.3.1. Efeito de diferentes fontes nitrogenadas

Foram pesados 9 g de fermento prensado por tubo. O experimento compunha-se de quatro tratamentos, sendo eles adicionados ao meio básico, respectivamente, uréia (0,6g/l, resultando em pH=5,01); citrato biamônio (2.26g/l, resultando em pH=4,96) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,32g/l, resultando em pH=5,00) perfazendo em cada tratamento 455 mg de N/l. Na testemunha não houve adição de N, continuando esta com 175 mgN/l proveniente do extrato de levedura, e em todos, 15,94% ART. O ensaio foi conduzido com três repetições por tratamento ao longo de cinco ciclos fermentativos.

3.1.3.2. Efeito do potássio (KCl em meio semi-sintético)

Foram pesados 7g de fermento prensado e os tratamentos adicionados à água de diluição como na Tabela 2.

Tabela 2. Adições de KCl à água de diluição.

| TRATAMENTOS | ÁGUA ESTÉRIL | KCl 800mM |
|-------------|--------------|-----------|
| 390 mgK/l | 20 ml | -- |
| 1170 mgK/l | 18 ml | 2 ml |
| 4290 mgK/l | 10 ml | 10 ml |
| 8190 mgK/l | -- | 20 ml |

Adicionou-se à suspensão gotas (3) de H_2SO_4 2N até $\text{pH}=2,5$ em todos os tratamentos e utilizou-se diretamente o meio básico, com pH ajustado com ácido cítrico (2g/l resultando em $\text{pH}=4,8$) com 15,63% ART. O ensaio foi conduzido com quatro repetições, durante cinco ciclos fermentativos.

3.1.3.3. Efeito do potássio (K_2SO_4 em meio de melaço)

Foram pesados 6 g de fermento prensado e utilizou-se meio de melaço diluído 1:4 (P/V), com pH 4,80 e 15,95% ART. Os tratamentos consistiram em adições de K_2SO_4 na água de tratamento do fermento para resultar em teores de K^+ de 4000mg/l e 8000mg/l no meio de fermentação. A testemunha, sem adição do sal potássico, já resultava em teor de potássio de 2000mg/l.

3.1.3.4. Efeito do sulfito

Utilizou-se 9 g de fermento prensado, sendo três tratamentos: testemunha consistiu no meio básico sem adição de NaHSO_3 , com pH 5,61, e adições respectivas de 188,62 mg/l e 565,86 mg/l de NaHSO_3 (pureza 86,20%) para resultarem nos tratamentos com 100mg SO_2 /l (pH 5,59) e 300mg SO_2 /l (pH 5,55).

A pureza do sal em NaHSO_3 foi determinada por iodometria e os teores finais de SO_2 nos meios definitivos por colorimetria, através da reação para-rosanilina e formaldeído, segundo ZAGO *et alii* (1989).

O teor de ART foi de 16,01% para todos os tratamentos com quatro repetições e seis ciclos fermentativos.

3.1.3.5. Efeito de concentrações de substrato

Empregou-se 8 g de fermento prensado e os tratamentos consistiram no meio de melão diluído 1:10 (P/V) resultando em 5,98% ART, com pH 4,89, que suplementado com KH_2PO_4 (880mg/l) consistiu no primeiro tratamento. Os demais meios resultaram da adição de sacarose comercial até características finais de 12,40% de ART com pH 4,85 e 18,15% ART com pH 4,64, deixando constante outras características do mosto. O ensaio foi conduzido com quatro repetições e cinco ciclos fermentativos.

3.1.3.6. Efeito de diferentes valores de pH

Foram pesados 10 g de fermento prensado. Os tratamentos constituíram no meio básico ao qual procedeu-se às adições descritas na Tabela 3, resultando nas características descritas na Tabela 4.

Tabela 3. Adições realizadas por litro de meio semi-sintético básico.

| ÁCIDO CÍTRICO (500mM) | KCl (500mM) | KOH (500mM) |
|--------------------------|----------------|----------------|
| 30 ml | 50 ml | -- |
| 20 ml | 20 ml | 30 ml |
| 20 ml | -- | 50 ml |

Tabela 4. Características dos meios definitivos do ensaio de pH.

| ART | pH | K ⁺ | CITRATO | Cl ⁻ | d |
|--------|------|----------------|---------|-----------------|-------|
| 16,85% | 3,45 | 1365 mg/l | 25 mM | 25 mM | 1,065 |
| 16,85% | 4,40 | 1365 mg/l | 20 mM | 10 mM | 1,064 |
| 16,85% | 4,92 | 1365 mg/l | 20 mM | 0 mM | 1,064 |

3.1.3.7. Efeito da Temperatura

O experimento constituiu em três tratamentos: incubação à 27°C, 33°C e 38°C utilizando-se de 10 g de fermento prensado por tubo, sendo quatro repetições por tratamento ao longo de quatro ciclos fermentativos. O meio utilizado foi o básico, com pH 4,8 (ajustado com KOH) e com 16,14% ART.

3.1.3.8. Efeito de concentrações de inóculo

Foram pesados 5, 10 e 15 g de fermento prensado, em cujas suspensões foram acrescentadas gotas de H₂SO₄ 2N até pH=2,5, aguardando-se uma hora antes da adição do meio. Tais quantidades de fermento resultaram em teores de inóculo de 6, 11 e 16% no meio de fermentação. O meio utilizado em cada um dos cinco ciclos fermentativos foi obtido a partir da diluição do melaço 1:4 (P/V) sem suplementação resultando em meio com 15,35% ART e pH 4,96. O ensaio teve quatro repetições.

3.1.3.9. Efeito de diferentes leveduras

As leveduras M-300-A, IZ-1904 e "Fleischmann" foram multiplicadas anaerobicamente segundo protocolo proposto por GUTIERREZ¹¹ (1991), com algumas modificações. Empregou-se meio de melaço esterilizado (121°C, 1 atm, durante 20 minutos) contendo 6% ART, suplementado com citrato biamônio 8mM, K₂HPO₄ 4mM, extrato de levedura 2g/l, ácido linolêico 34mg/l e o pH ajustado para 5,0 com KOH 50mM. O inóculo com 2 g massa úmida em 100 ml de YEPD foi adicionado sobre 500 ml do meio diluído 1:2.

O crescimento foi conduzido à temperatura ambiente com adições pela manhã e à tarde de 500 ml de meio até um volume final de 5 litros. Adicionou-se penicilina 5 mg/l nos dois primeiros dias de multiplicação. As massas celulares de 10g por tubo foram obtidas por centrifugação a 800 x g durante 15 minutos, suspensas em 20 ml de água destilada, e sobre as quais foram adicionados os meios fermentativos, que eram constituídos de melaço diluído 1:4 (P/V) com pH 4,81 e 16,08% ART. Cada tratamento (TA, IZ e FL) tinha quatro repetições e foi conduzido ao longo de seis ciclos fermentativos.

3.1.3.10. Efeito da contaminação bacteriana

Foram pesados 8 g de fermento prensado. Os tratamentos consistiram no meio semi-sintético estéril; meio estéril com antibióticos; meio contaminado e meio contaminado com antibióticos, cada qual com três repetições. Os antibióticos foram adicionados nos tubos, e consistiram em virginiamicina e

¹¹GUTIERREZ, L.E. (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP, Piracicaba,SP).Comunicação pessoal, 1991.

penicilina nas concentrações de 10 mg/l de cada um (com as respectivas especificações dos produtos comercializados para indústria alcooleira), nos dois primeiros ciclos e cloranfenicol (100 mg/l do produto farmacêutico) no terceiro.

O meio contaminado foi obtido inoculando-se ao meio básico sem ajuste de pH (com o valor original pH 6,4) uma cultura bacteriana mista, proveniente do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial composta pelas espécies: *Leuconostoc mesenteroides*; *Bacillus subtilis*; *Bacillus brevis*; *Bacillus coagulans*; *Bacillus megaterium*; *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus buchneri*.

O meio foi mantido à temperatura ambiente durante uma noite, para o crescimento da cultura a ser utilizada no 1º ciclo, sendo posteriormente conservado em geladeira para utilização nos ciclos subsequentes. O ART do mosto esterilizado foi igual ao do contaminado e as demais características do meio contaminado encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5. Característica dos meios contaminados em cada ciclo.

| CICLO | No. BACTÉRIAS (células vivas/ml) | pH | d |
|-------|-------------------------------------|------|--------|
| 1º. | 3,76 x 10 ⁸ | 4,47 | 1,0607 |
| 2º. | 3,63 x 10 ⁸ | 4,42 | 1,0602 |
| 3º. | 3,38 x 10 ⁸ | 4,26 | 1,0605 |

3.1.4. Análises microbiológicas

Foram realizados nos fermentos que iniciavam as fermentações bem como no vinho bruto ao final de cada ciclo.

3.1.4.1. Viabilidade celular

Consistiu na coloração diferencial com solução de azul de metileno e contagem de células vivas, de acordo com ZAGO *et alii* (1989).

As observações microbiológicas foram feitas ao microscópio ótico de campo claro.

3.1.4.2. Contaminação bacteriana

Consistiu na coloração diferencial entre as células vivas e mortas com uma solução de azul de metileno e azul de nilo, de acordo com protocolo proposto por ZAGO *et alii* (1989) e observação ao microscópio ótico de campo claro.

3.1.5. Análise nos meios fermentativos

3.1.5.1. Açúcares redutores totais (ART)

Constituiu na hidrólise ácida do açúcar (sacarose) presente nos meios fermentativos e quantificação dos açúcares redutores mediante a reação

colorimétrica baseada no método de SOMOGYI e NELSON adaptado por AMORIM *et alii* (1982).

3.1.6. Análises nos vinhos delevurados

3.1.6.1. Açúcares redutores residuais (AR)

Análises feitas de acordo com SOMOGYI e NELSON adaptado por AMORIM *et alii* (1982), conforme descrito o item 3.1.5.1., porém sem a reação de hidrólise da sacarose.

3.1.6.2. Glicerol

As análises foram feitas de acordo com o método descrito em ZAGO *et alii* (1989). Baseia-se na oxidação do glicerol com metaperiodato liberando formaldeído e subsequente condensação com acetil acetona, seguida de colorimetria.

3.1.6.3. Etanol e eficiência fermentativa

Consistiu na destilação do vinho em microkjeldhal e densimetria eletrônica da solução hidroalcoólica em densímetro Anton Paar modelo DMA-46, conforme protocolo descrito por ZAGO *et alii* (1989).

O grau alcoólico foi utilizado para o cálculo da eficiência fermentativa, relacionando-se estequiometricamente com a quantidade de açúcar

presente no meio, a partir do rendimento teórico, onde 100g de ART produzem no máximo 64,75ml de etanol 100% puro a 20°C; descontou-se o álcool presente na levedura, antes do início de cada ciclo.

3.1.6.4. Ácidos Orgânicos

As análises dos ácidos orgânicos presentes nos meios fermentativos e nos vinhos delevurados foram feitas com o emprego da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, utilizando-se um cromatógrafo modelo CG-180-C equipado com pré-coluna BIO-RAD, com coluna ORH-801, detector de índice de refração CG-410 e integrador-processador CG-200.

Na extração e purificação das amostras, foram utilizados 5 ml de vinho percolados numa coluna contendo 2ml de resina catiônica (DOWEX-50W, forma H^+) a um fluxo de 1 gota por segundo, lavados com aproximadamente 60 ml de água destilada. O eluído, juntamente com a água de lavagem, após serem neutralizados com NaOH 2N foram passados em coluna contendo 2 ml de resina aniônica (DOWEX 1x8, forma Cl^-) a um fluxo de 1 gota por segundo, lavados com aproximadamente 60 ml de água destilada, descartando-se o eluído e as lavagens.

Os ácidos orgânicos eram recuperados da resina aniônica com 10 ml de H_2SO_4 1N e uma porção deste eluato passada em membrana (Millipore) com poros de 45 μm , estando assim pronta para injeção no cromatógrafo.

Avaliou-se a combinação dos parâmetros temperatura da coluna e fluxo da fase móvel (H_2SO_4 0,01N) buscando-se uma melhor separação entre os ácidos succínico, láctico e acético.

3.1.7. Análise na levedura

3.1.7.1. Trealose

Foi dosada através da reação com antrona em meio sulfúrico, após a extração seletiva com ácido tricloroacético a 0°C, conforme método descrito por **TREVELYAN & HARRISON (1956)**.

3.2. Ensaio de cinética da fermentação

Suspendeu-se em 70 ml de água destilada e esterilizada, 90 g de fermento prensado "Fleischmann", sobre o qual adicionou-se 1 litro de meio semi-sintético (Tabela 1), com 14,05% ART, pH 5,6 e incubou-se a 33°C.

Nos tempos 0, 20min, 40min, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h e 24h monitorava-se o pH e eram retiradas alíquotas da suspensão bruta para as seguintes análises (com repetição):

- grau alcoólico cujo procedimento está descrito no item 3.1.6.3.
- viabilidade celular de acordo com procedimento do item 3.1.4.1.

A contagem bacteriana foi realizada apenas nos tempos 0 e 24h de acordo com o item 3.1.4.2.

Em cada tempo, duas alíquotas de 15 ml da suspensão bruta eram retiradas e mantidas a 0°C durante 5 minutos e centrifugadas durante 10 minutos a 800 x g. O sobrenadante filtrado a vácuo em papel Whatman nº 2 era encaminhado às análises de ART (item 3.1.5.1.) e ácidos orgânicos (item 3.1.6.4). Na levedura (precipitada) procedia-se à determinação de trealose (item 3.1.7.1).

3.3. Análises estatísticas

Os experimentos foram conduzidos com delineamento experimental inteiramente casualizado em parcelas subdivididas. As parcelas consistiram nos tratamentos e as subparcelas nos ciclos.

Como a maioria das variáveis compreende dados relativos (teores, porcentagens) e variáveis discretas (contagens de células) procedeu-se à verificação da homocedasticidade pelo Teste de Hartley. Havendo homogeneidade das variâncias, não foi necessária a transformação de nenhuma das variáveis.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Otimização dos parâmetros da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Buscando-se a princípio uma melhor separação dos ácidos succínico e acético, sabidamente produzidos na fermentação, de modo a isolá-los dos ácidos mais abundantes nos meios fermentativos, nomeadamente, o cítrico, presente no meio semi-sintético e o trans-aconítico, presente no meio de melação, foram testados vários fluxos da fase móvel (0,3; 0,4; 0,5 e 0,6 ml/min) em combinação com diferentes temperaturas da coluna (28, 35, 40, 43, 46, 50, 53 e 66°C).

A escolha da combinação de 0,4 ml/min de fluxo com 46°C da temperatura da coluna, possibilitou a melhor separação dos ácidos em questão, bem como a identificação mediante adições dos padrões, dos demais ácidos, reconhecendo-se o lático como frequente e abundante nos vinhos. A Figura 3 representa o perfil cromatográfico dos padrões dos ácidos succínico, lático e acético na concentração 2mM, com os respectivos tempos de retenção em minutos.

A quantificação desses ácidos foi realizada considerando-se a taxa de recuperação, que é a porcentagem dos padrões recuperados após eluição das resinas iônicas. Assim, as taxas de recuperação para os ácidos foram, respectivamente, 70,90% para o succínico, 81,05% para o lático e 77,20% para o acético. Esses valores são relativamente baixos se comparados aos obtidos por BELLS *et alii* (1991), que foi na ordem de 97%, com um procedimento analítico algo semelhante ao descrito no presente trabalho.

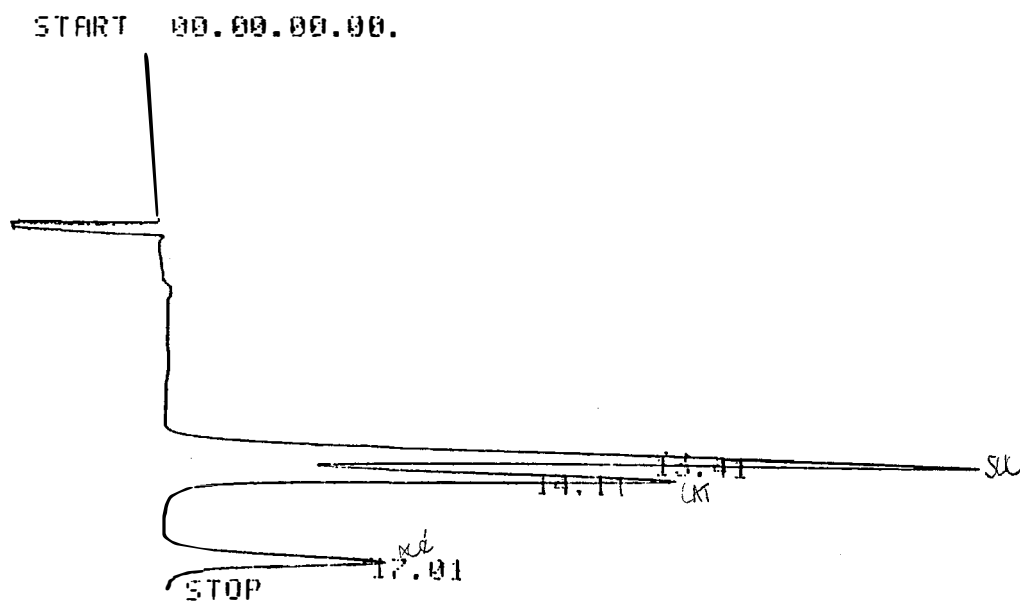


Figura 3. Perfil cromatográfico dos padrões 2mM dos ácidos orgânicos quantificados, com os respectivos tempos de retenção em minutos. Ácido succínico (13,41), ácido láctico (14,11) e ácido acético (17,01).

Nos perfis cromatográficos dos ácidos presentes nos meios semi-sintético e de melão e nos seus respectivos vinhos, encontram-se identificados os tempos de retenção para cada ácido, apresentado nas Figuras 4, 5, 6, e 7.

Nas condições metodológicas estabelecidas, nota-se que o ácido pirúvico remonta com o málico (Figuras 4, 5, 6 e 7) e com o trans-aconítico (Figuras 6 e 7). Além do que, o valor apresentado pode estar sendo superestimado pela presença do ácido oxaloacético, que descarboxila-se na coluna, originando ácido pirúvico. O ácido oxaloacético é produzido principalmente quando a contaminação bacteriana é alta.

START 00.00.00.00.

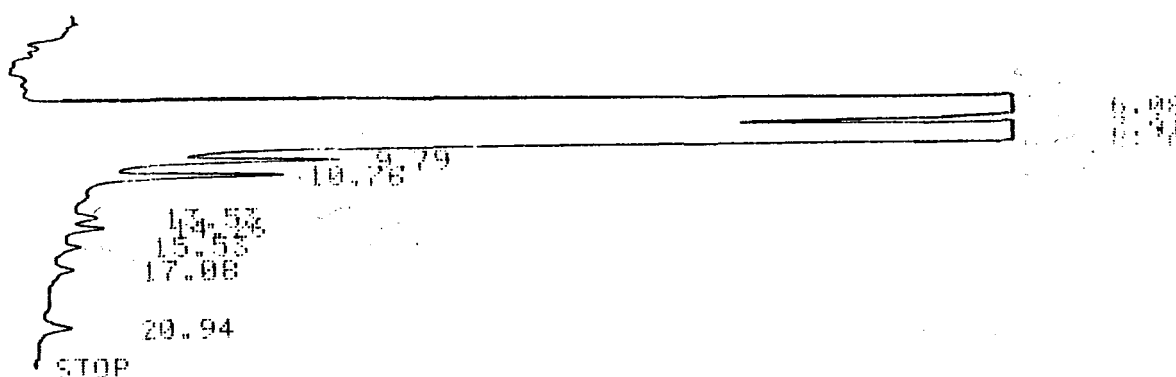


Figura 4. Perfil cromatográfico dos ácidos orgânicos presentes no meio semi-sintético, com os respectivos tempos de retenção em minutos. Ácido sulfúrico (6,08), ácido cítrico (7,91), ácidos isocítrico e alfa-cetoglutárico (8,76), não identificado (9,79), ácidos pirúvico, málico e glioxílico (10,76), ácido succínico (13,53), ácido láctico (14,16), ácidos fumárico e fórmico (15,53), ácido acético (17,08) e o tempo de 20,94 minutos corresponde ao etanol.

START 00.00.00.00.

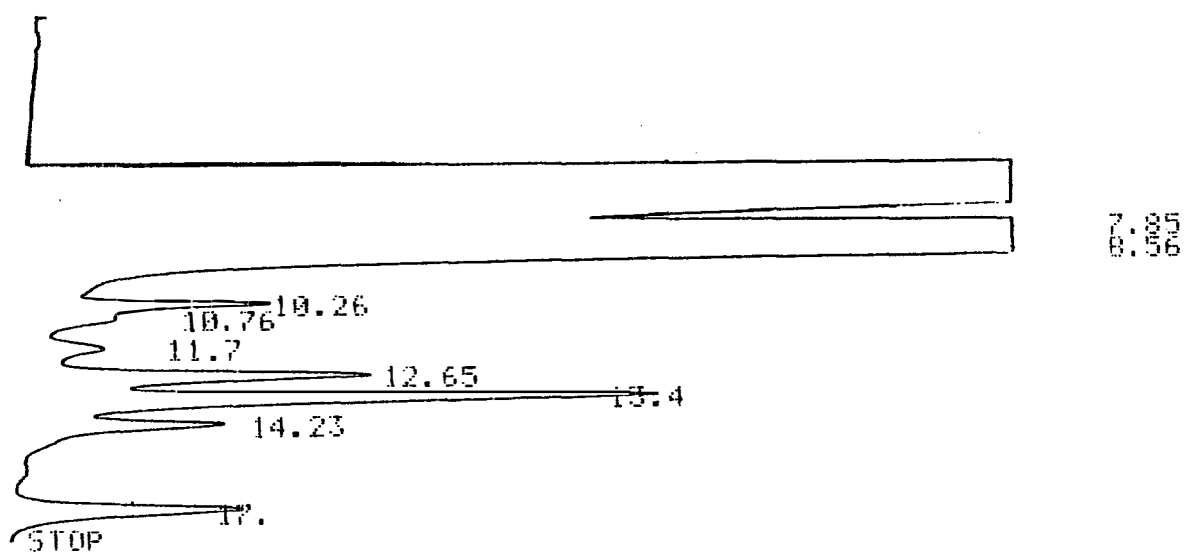


Figura 5. Perfil cromatográfico dos ácidos orgânicos presentes no vinho proveniente de meio semi-sintético, com os respectivos tempos de retenção em minutos. Ácido cítrico (7,85), ácido isocítrico e alfa-cetoglutárico (8,56), ácido pirúvico e málico e glioxílico (de 10,26 a 10,76), não identificados (11,70 e 12,65), ácido succínico (13,40), ácido láctico (14,23) e ácido acético (17,00).

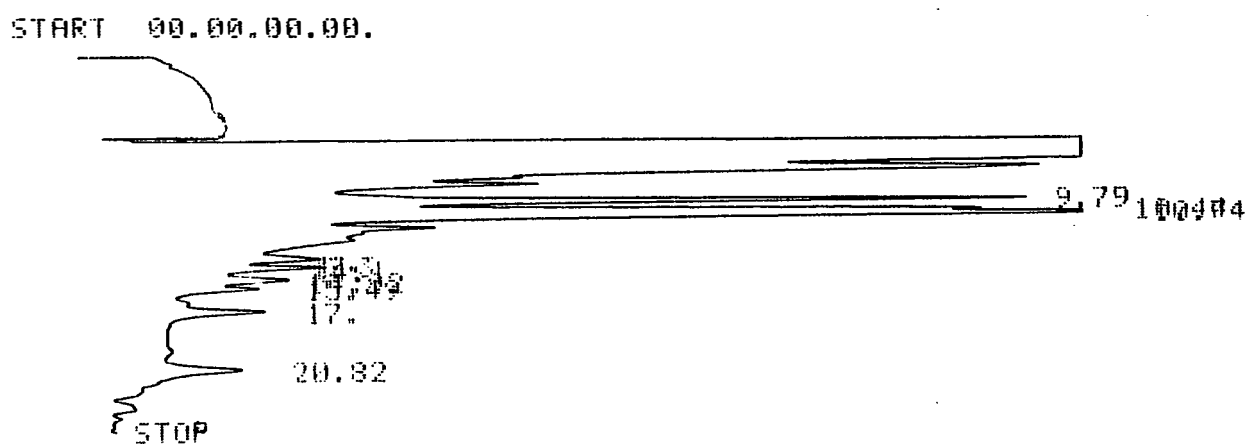


Figura 6. Perfil cromatográfico dos ácidos orgânicos presentes no meio de melão com os respectivos tempos de retenção em minutos. Não identificado (9,79), ácidos trans-aconítico, pirúvico e málico (de 10,44 a 10,74), ácido succínico (13,30), ácido lático (14,10), ácido fumárico (14,92), ácido fórmico (15,49), ácido acético (17,00) e o tempo 20,82 corresponde ao etanol.

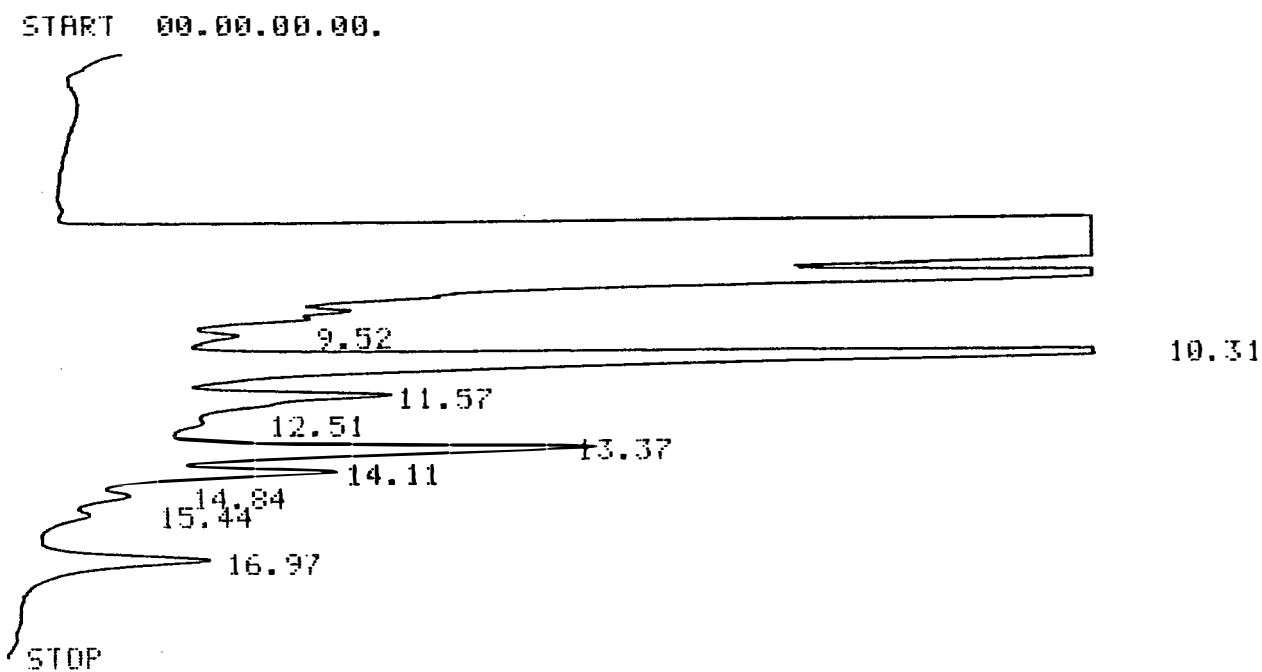


Figura 7. Perfil cromatográfico dos ácidos orgânicos presentes no vinho proveniente do meio de melão com os respectivos tempos de retenção em minutos. Não identificado (9,52), ácido trans-aconítico (10,31), ácido pirúvico e málico (11,57), não identificado (12,51), ácido succínico (13,37), ácido lático (14,11), ácido fumárico (14,84), ácido fórmico (15,44) e ácido acético (16,97).

4.2. Formação de alguns produtos no transcorrer da fermentação alcoólica

4.2.1. Etanol

A produção de etanol a partir de um meio semi-sintético com 14% ART obedece uma relação direta com o consumo de açúcar (Figura 8). A fermentação finaliza entre 7 e 8 horas, quando a produção de etanol é máxima e o substrato é esgotado do meio. Note-se que ao redor das duas primeiras horas de fermentação há formação de 50% do etanol com a respectiva utilização de metade do substrato disponível.

4.2.2. Ácidos orgânicos e trealose

Enquanto que as curvas de síntese dos ácidos acético e láctico seguem um paralelismo (Figura 9) com a produção de etanol até a segunda hora de fermentação, a velocidade de produção do succínico mostra-se maior até a primeira hora, quando já estão formados 60% do total, permanecendo estável entre a primeira e segunda hora, quando então volta a subir. Note-se a correlação existente entre as produções do ácido succínico e de ácido pirúvico, cujos valores estão apresentados na Tabela 6, expressos em alturas de picos.

Tabela 6. Comportamento dos níveis de piruvato durante a fermentação alcoólica.

| TEMPO | 0 | 20' | 40' | 1h | 2h | 4h | 6h | 8h | 24h |
|--------------------|----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| ALTURA (mm) | 4 | 4 | 121 | 218 | 221 | 176 | 151 | 149 | 149 |

Os teores de ácido pirúvico não foram calculados pelos motivos descritos anteriormente. Porém como esses teores apresentaram uma tendência definida no presente ensaio, já relatada por LAFON-LAFOURCADE & PEYNAUD (1966), havendo uma excreção do piruvato no início da fermentação com posterior reabsorção, mereceram destaque. O ácido pirúvico só começou a ser excretado após os 20 minutos iniciais da fermentação, que coincide com uma alta velocidade de excreção do succinato (Figura 9). A máxima excreção de piruvato é atingida entre a primeira e a segunda hora, o que coincide com a fase de atenuação da excreção do succinato. Após a segunda hora, o succinato volta a subir, atingindo o teor máximo na sexta hora, mantendo-se até o fim do ensaio.

A correlação existente entre as produções de ácidos succínico e pirúvico pode ser explicada pela biossíntese do ácido succínico a partir da carboxilação do piruvato, pela carboxilase pirúvica (MILLER & ATKINSON, 1972), que desvia o piruvato da síntese de etanol. Esse desvio é acentuado no início da fermentação, quando as atividades da descarboxilase pirúvica e desidrogenase alcoólica são baixas. Essas enzimas são induzidas pelo substrato (CHAPMAN & BARTLEY, 1968).

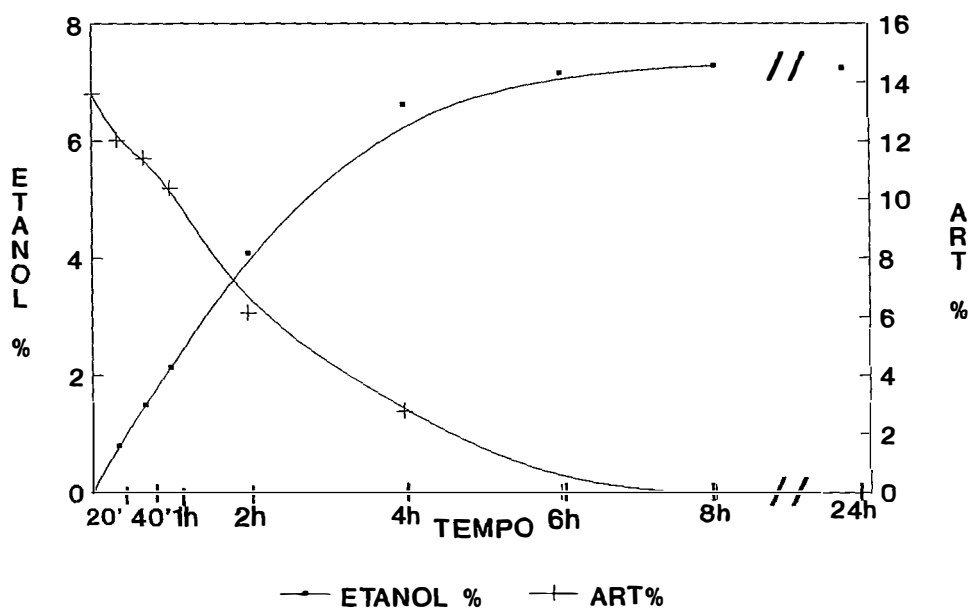


Figura 8. Formação de etanol (% V/V) e consumo de substrato (% P/V) no transcorrer da fermentação em meio semi-sintético com 14% ART. Dados correspondentes à média de duas repetições.

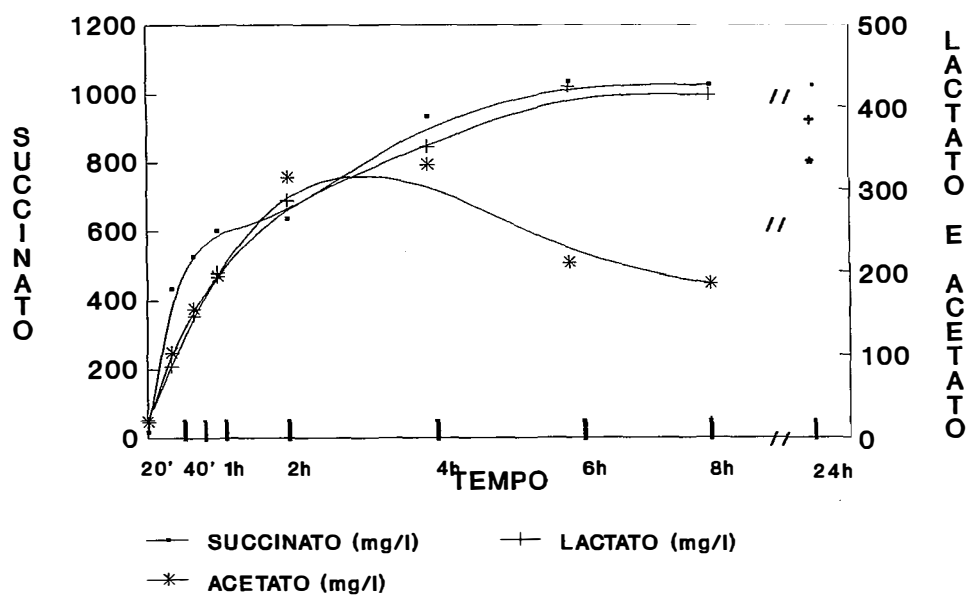


Figura 9. Formação dos ácidos succínico, láctico e acético (mg/l) no transcorrer da fermentação em meio semi-sintético com 14% ART. Dados correspondentes à média de duas repetições.

O fluxo glicolítico é estimulado pelo sinal de glicose, que ocorre imediatamente após a célula iniciar a absorção do substrato. Dentre outros efeitos, o sinal de glicose estimula a síntese do AMPc através da indução da adenilato ciclase e de uma acidificação intracelular (VALLE *et alii*, 1987). Esse mecanismo estimula o metabolismo catabólico, que pode ser observado pela queda nos teores intracelulares de trealose (Figura 10), exatamente durante o período em que a velocidade de produção do succinato é maior (Figura 9). A ressíntese de trealose coincide com retomada de formação de succinato e início de excreção do piruvato.

A correlação descrita por COOTE & KIRSOP (1974), em que o piruvato se converteria em acetato, não ficou evidente. Ao contrário, quando a excreção de piruvato foi maior, também ocorreu alta produção de acetato. E quando o teor de acetato começou a cair a partir da quarta hora, o piruvato já caía desde a segunda hora. Apenas no último tempo (24h) o teor de piruvato encontrava-se como sendo o menor até então e o acetato, o maior. O lactato teve um comportamento de síntese crescente, como o etanol. O seu valor não foi alterado no tempo de 24 horas.

A queda mais intensa no pH também ocorreu até a primeira hora de fermentação, corroborando a teoria de que a produção de ácidos orgânicos contribui, pelo menos em parte, para a acidificação do meio externo (Figura 9 e 10), conforme sugerido por CONWAY & DOWNEY (1950a); CONWAY & BRADY (1950); SIGLER *et alii*, (1981) e KOTYK (1989).

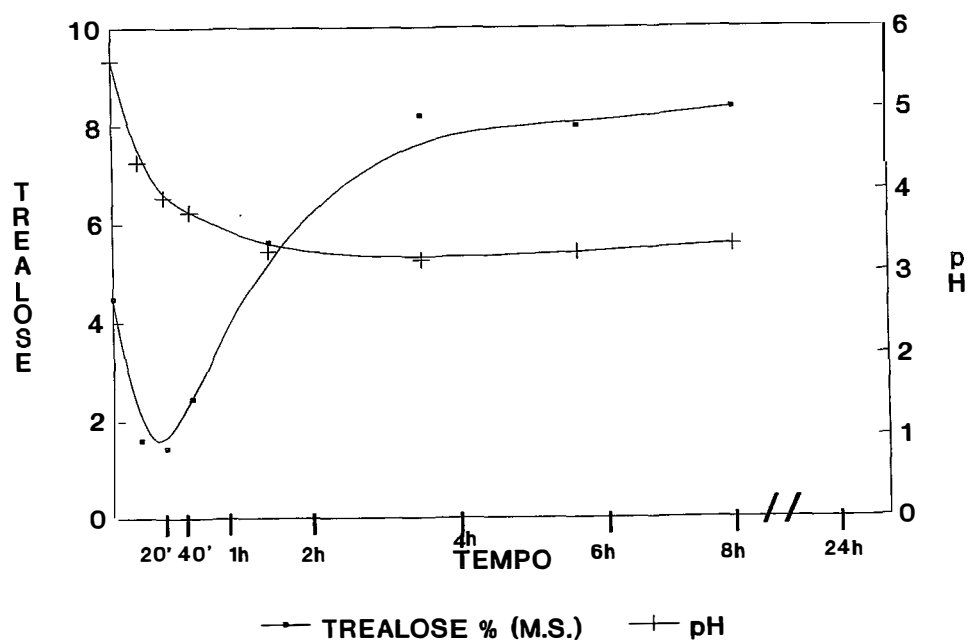


Figura 10. Mobilização da trealose (%MS) e queda do pH externo no transcorrer da fermentação em meio semi-sintético com 14% ART. Dados correspondentes à média de duas repetições.

4.3. Alguns fatores que afetam a fermentação alcoólica

Todos os resultados discutidos no presente capítulo são significativos ao nível de 1% de probabilidade. As significâncias de 5% encontram-se explicitadas no texto.

4.3.1. Efeito de diferentes fontes nitrogenadas

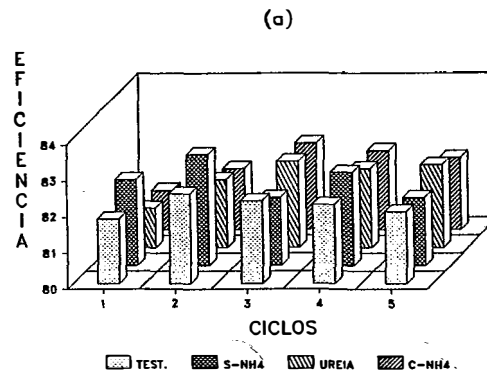
Foram adicionadas diferentes fontes de nitrogênio ao meio fermentativo, na forma amoniacal (citrato e sulfato de amônio) e na forma amídica (uréia). Optou-se pela utilização das duas formas amoniacaais, de modo a isolar-se o efeito acidificante da presença do sulfato de amônio, através do fornecimento de citrato de amônio que exerce um poder tamponante ao meio. O tratamento testemunha consistiu dos teores de nitrogênio presentes no extrato de levedura.

Com a observação do efeito dos tratamentos sobre a eficiência fermentativa (Figura 11a) depreende-se que o sulfato de amônio permitiu a maior eficiência, diferenciando-se apenas do citrato de amônio. Possivelmente este tratamento foi prejudicial por ter permitido a maior proliferação bacteriana. (Figura 12c).

Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------------------|------|----|----|-------|------|----|----|
| S-NH ₄ | 82.4 | a | A | 4 | 82.3 | a | A |
| TEST. | 82.3 | ab | AB | 2 | 82.3 | a | A |
| UREIA | 82.0 | bc | AB | 3 | 82.3 | a | A |
| C-NH ₄ | 81.9 | c | B | 5 | 82.1 | ab | AB |
| | | | | 1 | 81.7 | b | B |

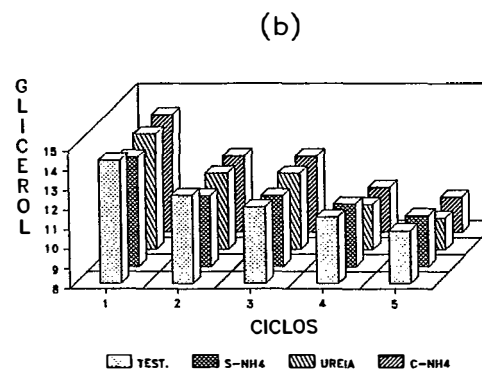
C.V. = 0.185% C.V. = 0.428%
D.M.S. 5% = 0.34836 D.M.S. 5% = 0.41484
D.M.S. 1% = 0.43386 D.M.S. 1% = 0.51003



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------------------|------|----|----|-------|------|----|----|
| TEST. | 12.1 | a | A | 1 | 13.9 | a | A |
| S-NH ₄ | 11.8 | b | B | 2 | 12.0 | b | B |
| C-NH ₄ | 11.6 | bc | B | 3 | 11.8 | b | B |
| UREIA | 11.5 | c | B | 4 | 10.8 | c | C |
| | | | | 5 | 10.2 | d | D |

C.V. = 1.258% C.V. = 2.000%
D.M.S. 5% = 0.23311 D.M.S. 5% = 0.27760
D.M.S. 1% = 0.29032 D.M.S. 1% = 0.34129



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------------------|------|----|----|-------|------|----|----|
| UREIA | 14.9 | a | A | 5 | 15.7 | a | A |
| C-NH ₄ | 14.9 | a | A | 4 | 14.8 | b | B |
| TEST. | 14.3 | b | B | 3 | 14.4 | c | C |
| S-NH ₄ | 14.1 | c | C | 2 | 14.2 | d | D |
| | | | | 1 | 13.7 | e | E |

C.V. = 0.565% C.V. = 0.601%
D.M.S. 5% = 0.08695 D.M.S. 5% = 0.1035
D.M.S. 1% = 0.10830 D.M.S. 1% = 0.1273

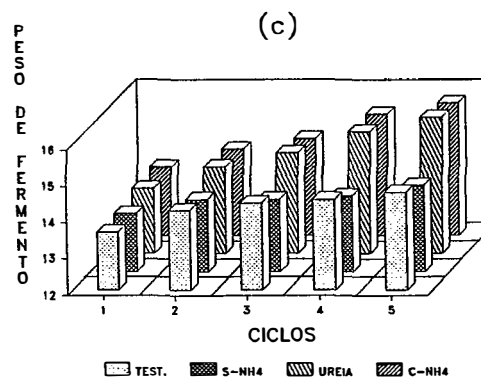


Figura 11. Efeito de diferentes fontes nitrogenadas (testemunha, sulfato de amônio, uréia, citrato de amônio) em meio semi-sintético, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros:

- (a) Eficiência fermentativa;**
- (b) Formação de glicerol (g/100g Etanol)**
- (c) Peso de fermento (g);**

À esquerda de cada gráfico encontram-se as respectivas significâncias estatísticas.

A eficiência foi menor no primeiro ciclo em todos os tratamentos, permanecendo constante independentemente dos tratamentos, ao longo dos demais ciclos. As menores eficiências no primeiro ciclo foram acompanhadas pelas maiores produções de glicerol (Figura 11b), de ácido succínico (Figura 13a) e acético (Figura 13c).

O glicerol relativo foi decaindo ao longo dos ciclos indistintamente aos tratamentos, e foi acompanhado pelo crescimento da levedura (Figuras 11b e c). A maior produção de glicerol obtida foi no tratamento testemunha, sem suplementação de nitrogênio (175 mgN/l) em relação aos suplementados (455 mgN/l). Já o maior crescimento foi obtido com uréia (Figura 11c) a qual permite menor acidificação do meio externo (Figura 14). Concordantemente, o tratamento que permitiu maior acidificação (Figura 14) que foi o sulfato de amônio propiciou o menor crescimento (Figura 11c).

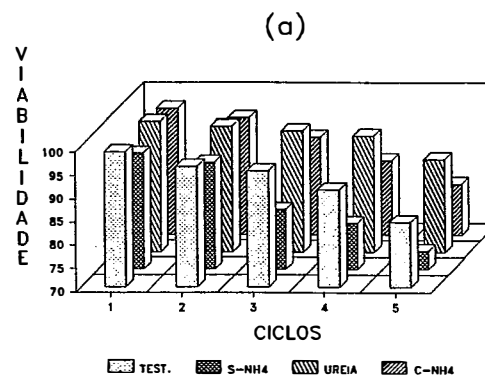
A viabilidade celular que caiu ao longo dos ciclos foi maior para uréia e menor para o sulfato de amônio (Figura 12a), tendência semelhante à do crescimento, possivelmente devido ao efeito diferenciado sobre o pH externo, exercido pelas duas fontes (Figura 14).

O teor de trealose não variou entre as fontes nitrogenadas: uréia, sulfato e citrato de amônio nem do primeiro para o último ciclo, mas caiu na testemunha (Figura 12b).

Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|------|----|----|-------|------|----|----|
| UREIA | 94.6 | a | A | 1 | 97.0 | a | A |
| TEST. | 92.9 | a | A | 2 | 95.2 | ab | A |
| C-NH4 | 90.0 | b | B | 3 | 94.3 | b | A |
| S-NH4 | 87.4 | c | C | 4 | 87.6 | c | B |
| | | | | 5 | 82.1 | d | C |

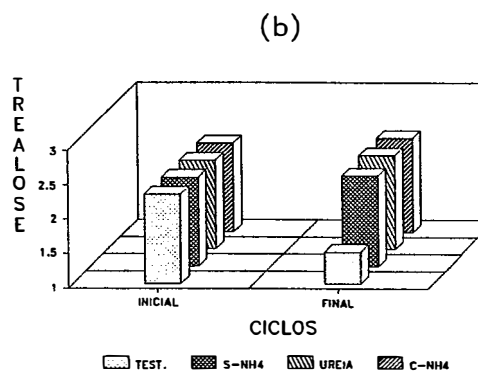
C.V. = 0.971% C.V. = 2.218%
D.M.S. 5% = 2.00610 D.M.S. 5% = 2.38898
D.M.S. 1% = 2.49847 D.M.S. 1% = 2.93714



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao nao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|------|----|----|---------|------|----|----|
| C-NH4 | 2.37 | a | A | INICIAL | 2.30 | a | A |
| UREIA | 2.36 | a | A | FINAL | 2.13 | a | A |
| S-NH4 | 2.32 | a | A | | | | |
| TEST. | 1.46 | b | B | | | | |

C.V. = 8.301% C.V. = 13.312%
D.M.S. 5% = 0.54565 D.M.S. 5% = 0.27766
D.M.S. 1% = 0.74680 D.M.S. 1% = 0.40457



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|------|----|----|-------|------|----|----|
| C-NH4 | 7.19 | a | A | 4 | 8.09 | a | A |
| UREIA | 6.28 | ab | A | 3 | 6.42 | ab | AB |
| TEST. | 5.01 | bc | AB | 5 | 6.39 | ab | AB |
| S-NH4 | 3.66 | c | B | 2 | 4.73 | b | B |
| | | | | 1 | 2.05 | c | C |

C.V. = 16.908% C.V. = 32.032%
D.M.S. 5% = 1.75804 D.M.S. 5% = 2.09352
D.M.S. 1% = 2.18953 D.M.S. 1% = 2.57396

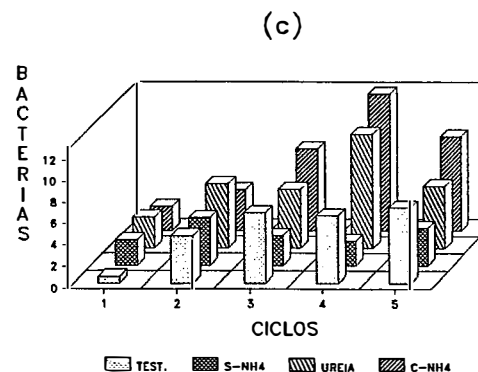


Figura 12. Efeito de diferentes fontes nitrogenadas (testemunha, sulfato de amônio, uréia, citrato de amônio) em meio semi-sintético, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros:

(a) Viabilidade celular (%);

(b) Teor de trealose na célula (% MS) antes de iniciar a fermentação e ao final do último ciclo;

(c) Contaminação bacteriana (nº de bactérias x 10⁻⁶/ml vinho);

A esquerda de cada gráfico encontram-se as respectivas significâncias estatísticas.

Quanto à contaminação bacteriana, esta aumentou ao longo dos ciclos, mais acentuadamente nos tratamentos com uréia e citrato de amônio, sendo o sulfato de amônio, o tratamento que permitiu menor contaminação (Figura 12c). A contaminação bacteriana guarda uma estreita relação com a produção de ácido láctico (Figura 13b) e com o ácido acético (Figura 13c), pois as maiores excreções dos ácidos láctico e acético relacionaram-se com os valores de pH mais elevados, (Figura 14) sendo estes, funções das absorções das fontes nitrogenadas.

Assim, há um efeito benéfico do sulfato de amônio, sendo devido à maior acidificação do meio proporcionada pela absorção do íon amônio, que é trocado por prótons, e pela própria presença do ânion sulfato. Esse efeito é sentido pelas maiores eficiências acompanhadas pelos menores teores de glicerol e ácidos orgânicos. Porém, o menor crescimento decorrente, também é proporcionado pela queda de viabilidade, à despeito do teor de trealose final permanecer igual ao inicial. É provável que em ciclos fermentativos subsequentes, a acidificação causada pelo sulfato de amônio reduzisse os teores de trealose pela ação estressante exercida pelos H^+ . GUTIERREZ (1989) observou maior acúmulo de trealose ao final de uma fermentação, com uréia, se comparado ao sulfato de amônio; observou também que o acúmulo de trealose é menor quando o teor de nitrogênio é maior.

O efeito de diferentes fontes nitrogenadas ficou evidenciado no comportamento do ácido succínico (Figura 13a).

O fornecimento da forma amoniaca, seja ela sulfato ou citrato de amônio conduz a uma sensível diminuição dos teores de ácido succínico. Isto é explicado pelo desvio do alfa-cetoglutarato para síntese de glutamato, o principal doador de nitrogênio às biossínteses. Com o desvio, o alfa-cetoglutarato deixa de ser oxidado a succinato, reduzindo seu teor, fato anteriormente observado por vários autores (KLEINZELER, 1941; COOTE & KIRSOP, 1974; OURA, 1977; HEERDE & RADLER, 1978; FREITAS-VALLE *et alii*, 1984 e GUTIERREZ, 1988), o que reforça a hipótese da via oxidativa de formação do succinato. Este não é alterado pela acidificação provocada pelo sulfato de amônio, conforme reforçado no ensaio de pH.

A uréia, que também origina amônio, porém mais lentamente, devido às duas reações enzimáticas (COOPER, 1982) induz a uma síntese de succinato intermediária entre a maior (com a testemunha) e a menor (com fontes amoniacas) como pode ser observado na Figura 13a.

A maior produção de succinato no tratamento testemunha torna-se interessante, posto que a não suplementação permitiu também maior produção de glicerol, mesmo com um dos menores crescimentos propiciados. Assim, pode-se conectar a síntese de glicerol ao desequilíbrio do balanço de redox ocasionado pela produção oxidativa do succinato. Além disso, como o crescimento foi dos menos acentuados para este tratamento, o glicerol correlaciona-se, neste caso, mais com a formação de succinato, conforme sugerido por OURA (1977). Realmente, calculando-se estequiometricamente os desvios do açúcar para as sínteses de glicerol e ácido succínico, observa-se que cerca de 5,5% do açúcar em média dos ciclos, é desviado para síntese de glicerol, no tratamento testemunha, dos quais 57% estão acoplados à síntese de ácido succínico que

desvia 4% do açúcar. O acetato desvia cerca de 0,5% do açúcar, cuja produção neste ensaio correlacionou-se com a contaminação bacteriana. Caso o acetato fosse produzido exclusivamente pelas leveduras, responderia por cerca de 7% do glicerol formado.

Como a testemunha possui predominantemente fonte de nitrogênio alfa-amínico, a qual não foi intensamente desviada para o crescimento, pode-se inferir que essa fonte contribuiu com esqueletos carbônicos para a biossíntese do succinato. Muito embora esse teor proveniente do extrato de levedura esteja presente em todos os tratamentos, o efeito não ocorreu nos demais, notadamente, nos tratamentos com suplementação amoniacal, posto que há inibição dos íons amônio ao transporte de aminoácidos (JONES *et alii*, 1981) ocorrendo absorção preferencial dos íons amônio.

Conclui-se que a adição de sulfato de amônio é benéfica, acidificando o vinho, controlando a contaminação, e permitindo menores desvios do açúcar para as sínteses dos ácidos orgânicos, como o succínico, proveniente do metabolismo da levedura (reduzindo também o glicerol acoplado) ou os ácidos do metabolismo bacteriano (lático e acético). Embora pudesse ocorrer um efeito estressante à levedura devido à acidificação, essa tendência não ocorreu no presente ensaio.

4.3.2. Efeito do potássio

Dois ensaios foram conduzidos para avaliar-se o efeito do K^+ sobre a fermentação, um com meio semi-sintético (390 a 8190 mgK/l) e outro com meio de melaço (2000 a 8000 mgK⁺/l). Embora as condições experimentais de cada um tenham sido distintas, os resultados indicam que doses crescentes de potássio não afetaram as eficiências fermentativas, que aumentaram ao longo dos ciclos, independentemente dos tratamentos (Figuras 15a e 19a).

Teste de Tukey para médias de tratamento e ciclo.
A interação foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-----------|------|----|----|-------|------|----|----|
| 390mgK/l | 87.8 | a | A | 5 | 88.8 | a | A |
| 4290mgK/l | 87.6 | a | A | 3 | 88.8 | a | A |
| 1170mgK/l | 87.6 | a | A | 4 | 88.4 | a | A |
| 8190mgK/l | 87.3 | a | A | 2 | 87.5 | b | B |
| | | | | 1 | 84.3 | c | C |

C.V. = 0.352%

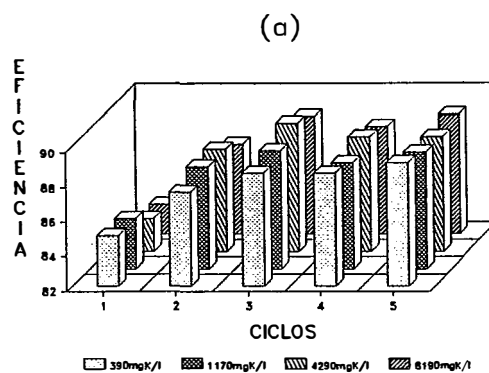
D.M.S. 5% = 0.50987

D.M.S. 1% = 0.63501

C.V. = 0.587%

D.M.S. 5% = 0.60718

D.M.S. 1% = 0.74650



Teste de Tukey para médias de tratamento e ciclo.
A interação não foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-----------|------|----|----|-------|------|----|----|
| 8190mgK/l | 8.72 | a | A | 1 | 9.92 | a | A |
| 390mgK/l | 8.23 | b | B | 2 | 8.14 | b | B |
| 4290mgK/l | 8.18 | bc | B | 5 | 7.98 | bc | BC |
| 1170mgK/l | 8.06 | c | B | 3 | 7.82 | cd | CD |
| | | | | 4 | 7.62 | d | D |

C.V. = 1.230%

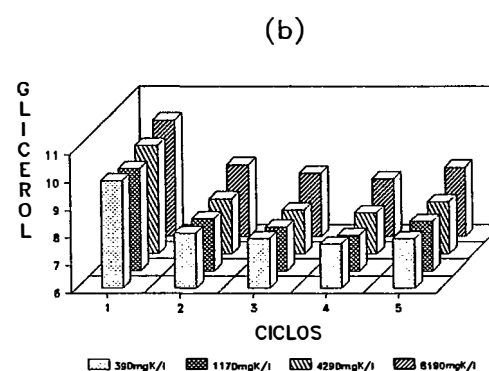
D.M.S. 5% = 0.16946

D.M.S. 1% = 0.21106

C.V. = 2.060%

D.M.S. 5% = 0.20181

D.M.S. 1% = 0.24811



Teste de Tukey para médias de tratamento e ciclo.
A interação foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-----------|------|----|----|-------|------|----|----|
| 4290mgK/l | 11.0 | a | A | 3 | 10.9 | a | A |
| 8190mgK/l | 11.0 | a | A | 2 | 10.9 | a | A |
| 1170mgK/l | 10.8 | b | B | 4 | 10.9 | a | A |
| 390mgK/l | 10.6 | c | C | 5 | 10.8 | a | A |
| | | | | 1 | 10.5 | b | B |

C.V. = 1.038%

D.M.S. 5% = 0.09816

D.M.S. 1% = 0.12225

C.V. = 0.911%

D.M.S. 5% = 0.11690

D.M.S. 1% = 0.14372

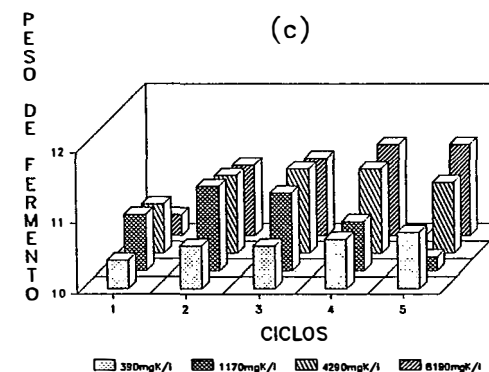


Figura 15. Efeito de diferentes concentrações de potássio (390, 1170, 4290 e 8190 mgK/l) na forma de KCl em meio semi-sintético, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros:

(a) Eficiência fermentativa;

(b) Formação de glicérol (g/100g Etanol);

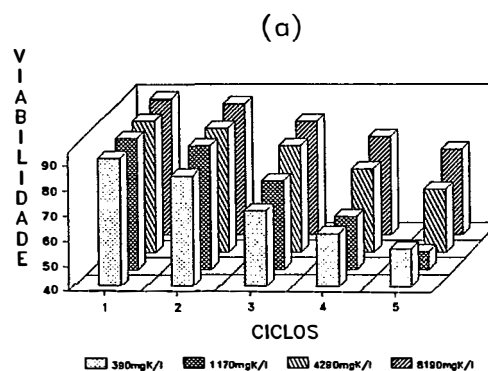
(c) Peso de fermento (g);

À esquerda de cada gráfico encontram-se as respectivas significâncias estatísticas.

Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-----------|------|----|----|-------|------|----|----|
| 8190mgK/l | 85.0 | a | A | 1 | 92.6 | a | A |
| 4290mgK/l | 80.2 | b | B | 2 | 88.3 | b | B |
| 1170mgK/l | 73.0 | c | C | 3 | 77.9 | c | C |
| 390mgK/l | 71.8 | c | C | 4 | 68.7 | d | D |
| | | | | 5 | 60.0 | e | E |

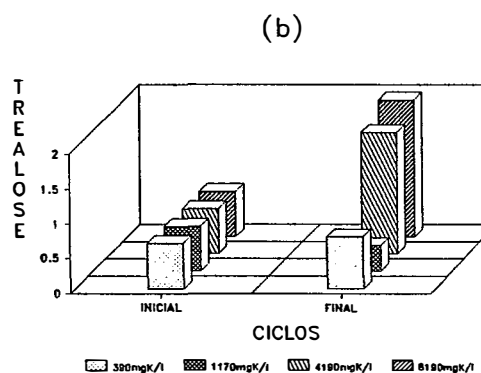
C.V. = 2.987% C.V. = 3.442%
D.M.S. 5% = 2.64521 D.M.S. 5% = 3.15007
D.M.S. 1% = 3.29445 D.M.S. 1% = 3.87786



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-----------|------|----|----|---------|------|----|----|
| 8190mgK/l | 1.95 | a | A | FINAL | 1.20 | a | A |
| 4290mgK/l | 1.75 | a | A | INICIAL | 0.65 | b | B |
| 390mgK/l | 0.75 | b | B | | | | |
| 1170mgK/l | 0.37 | c | C | | | | |

C.V. = 7.948% C.V. = 10.302%
D.M.S. 5% = 0.25069 D.M.S. 5% = 0.09020
D.M.S. 1% = 0.13143 D.M.S. 1% = 0.13143



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-----------|------|----|----|-------|------|----|----|
| 4290mgK/l | 0.82 | a | A | 1 | 0.84 | a | A |
| 1170mgK/l | 0.78 | a | A | 5 | 0.80 | a | A |
| 390mgK/l | 0.60 | a | A | 4 | 0.65 | a | A |
| 8190mgK/l | 0.60 | a | A | 3 | 0.65 | a | A |
| | | | | 2 | 0.55 | a | A |

C.V. = 19.728% C.V. = 49.641%
D.M.S. 5% = 0.34626 D.M.S. 5% = 0.41234
D.M.S. 1% = 0.43124 D.M.S. 1% = 0.50695

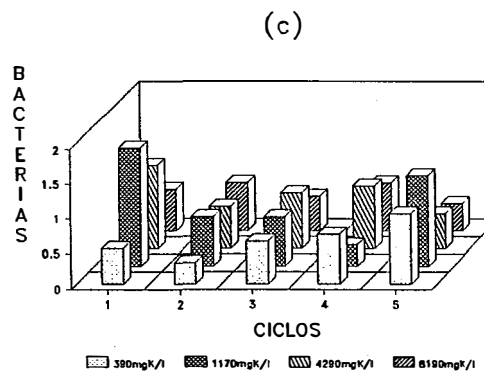


Figura 16. Efeito de diferentes concentrações de potássio (390, 1170, 4290 e 8190 mgK/l) na forma KCL em meio semi-sintético, ao longo de cinco ciclos fermentativos sobre os seguintes parâmetros:

(a) Viabilidade celular (%);

(b) Teor de trealose na célula (% MS) antes de iniciar a fermentação e ao final do último ciclo;

(c) Contaminação bacteriana (nº de bactérias x 10⁻⁶/ml vinho);

À esquerda de cada gráfico encontram-se as respectivas significâncias estatísticas.

Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.

A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-----------|-----|----|----|-------|-----|----|----|
| 390mgK/l | 344 | a | A | 1 | 374 | a | A |
| 1170mgK/l | 338 | a | AB | 5 | 303 | b | B |
| 4290mgK/l | 331 | a | AB | 3 | 293 | b | B |
| 8190mgK/l | 281 | b | B | | | | |

C.V. = 4.700%

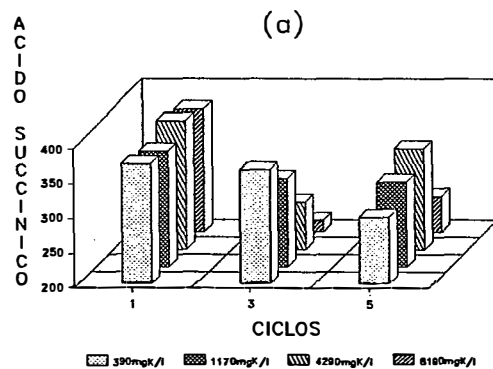
C.V. = 10.587%

D.M.S. 5% = 46.28989

D.M.S. 5% = 36.12889

D.M.S. 1% = 59.31963

D.M.S. 1% = 47.41298



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.

A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-----------|-----|----|----|-------|-----|----|----|
| 390mgK/l | 151 | a | A | 5 | 124 | a | A |
| 1170mgK/l | 130 | b | A | 3 | 84 | b | B |
| 4290mgK/l | 55 | c | B | 1 | 58 | c | C |
| 8190mgK/l | 20 | d | C | | | | |

C.V. = 7.786%

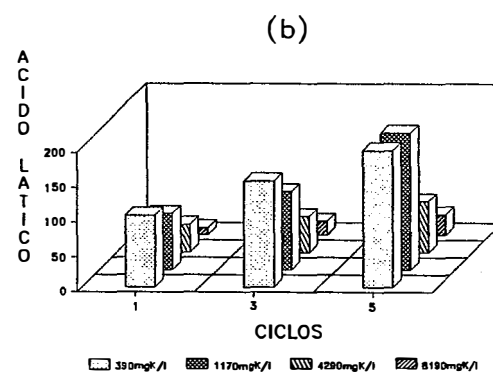
C.V. = 16.598%

D.M.S. 5% = 19.98008

D.M.S. 5% = 15.59429

D.M.S. 1% = 25.60410

D.M.S. 1% = 20.46484



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.

A interacao nao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-----------|-----|----|----|-------|-----|----|----|
| 390mgK/l | 172 | a | A | 5 | 197 | a | A |
| 1170mgK/l | 154 | a | A | 3 | 102 | b | B |
| 4290mgK/l | 107 | b | B | 1 | 77 | c | B |
| 8190mgK/l | 68 | c | C | | | | |

C.V. = 8.262%

C.V. = 15.501%

D.M.S. 5% = 26.34326

D.M.S. 5% = 20.56071

D.M.S. 1% = 33.75840

D.M.S. 1% = 26.98241

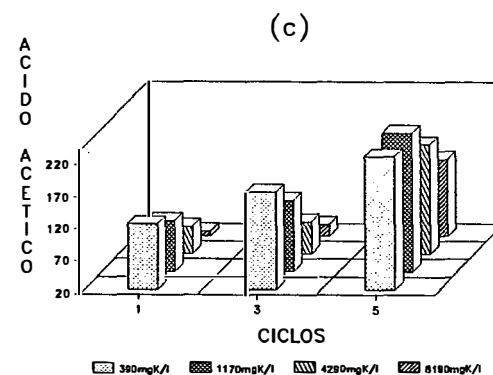


Figura 17. Efeito de diferentes concentrações de potássio (390, 1170, 4290 e 8190 mgK/l) na forma de KCL em meio semi-sintético, em três dos cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros:

(a) Formação de ácido succínico (mg/l vinho);

(b) Formação de ácido láctico (mg/l vinho);

(c) Formação de ácido acético (mg/l vinho);

À esquerda de cada gráfico encontram-se as respectivas significâncias estatísticas.

Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-----------|------|----|----|-------|------|----|----|
| 8190mgK/l | 3.39 | a | A | 2 | 3.36 | a | A |
| 4290mgK/l | 3.34 | b | B | 4 | 3.34 | a | A |
| 1170mgK/l | 3.30 | b | B | 1 | 3.28 | b | B |
| 390mgK/l | 3.16 | c | C | 3 | 3.28 | b | B |
| | | | | 5 | 3.22 | c | C |

C.V. = 1.249%

D.M.S. 5% = 0.03468

D.M.S. 1% = 0.04320

C.V. = 1.060%

D.M.S. 5% = 0.04130

D.M.S. 1% = 0.05078

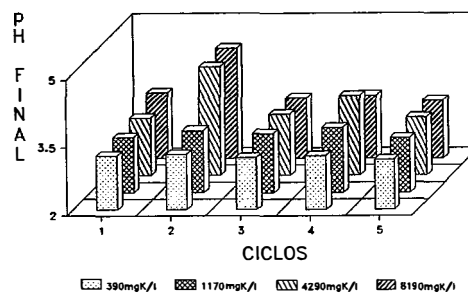


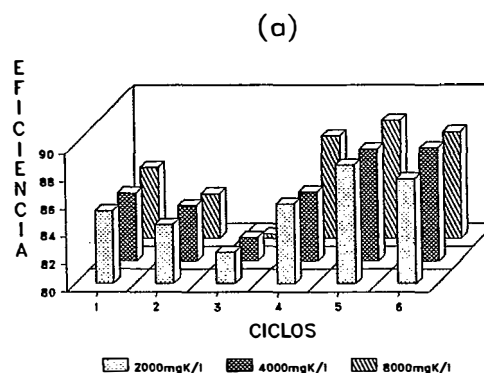
Figura 18. Efeito de diferentes concentrações de potássio (390, 1170, 4290 e 8190 mgK/l) na forma de KCL em meio semi-sintético ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os valores de pH do vinho.

À esquerda do gráfico encontram-se as significâncias estatísticas.

Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-----------|------|----|----|-------|------|----|----|
| 2000mgK/l | 85.6 | a | A | 5 | 88.4 | a | A |
| 8000mgK/l | 85.3 | a | A | 6 | 87.8 | a | A |
| 4000mgK/l | 85.3 | a | A | 4 | 86.0 | b | B |
| | | | | 1 | 85.1 | c | C |
| | | | | 2 | 83.8 | d | D |
| | | | | 3 | 81.4 | e | E |

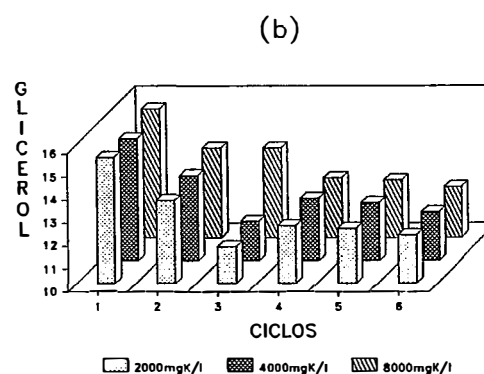
C.V. = 0.293% C.V. = 0.608%
D.M.S. 5% = 0.36379 D.M.S. 5% = 0.63185
D.M.S. 1% = 0.46111 D.M.S. 1% = 0.76197



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-----------|------|----|----|-------|------|----|----|
| 8000mgK/l | 13.4 | a | A | 1 | 15.4 | a | A |
| 4000mgK/l | 13.0 | b | B | 2 | 13.7 | b | B |
| 2000mgK/l | 12.9 | b | B | 4 | 12.6 | c | C |
| | | | | 5 | 12.4 | c | CD |
| | | | | 3 | 12.4 | cd | CD |
| | | | | 6 | 12.1 | d | D |

C.V. = 0.974% C.V. = 1.685%
D.M.S. 5% = 0.15517 D.M.S. 5% = 0.26951
D.M.S. 1% = 0.19668 D.M.S. 1% = 0.32502



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-----------|------|----|----|-------|------|----|----|
| 2000mgK/l | 11.3 | a | A | 6 | 12.9 | a | A |
| 4000mgK/l | 11.0 | b | B | 5 | 12.1 | b | B |
| 8000mgK/l | 10.6 | c | C | 4 | 11.5 | c | C |
| | | | | 3 | 10.8 | d | D |
| | | | | 2 | 10.0 | e | E |
| | | | | 1 | 8.6 | f | F |

C.V. = 0.544% C.V. = 1.748%
D.M.S. 5% = 0.13482 D.M.S. 5% = 0.23416
D.M.S. 1% = 0.17088 D.M.S. 1% = 0.28238

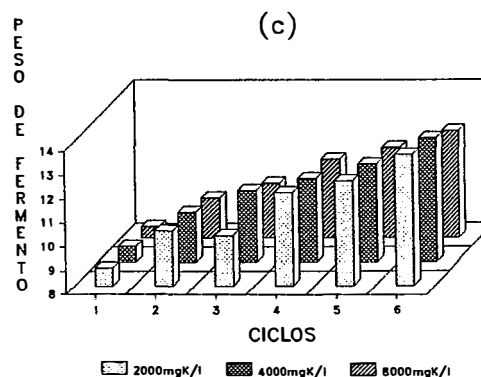


Figura 19. Efeito de diferentes concentrações de potássio (2000; 4000 e 8000 mgK/l) na forma K_2SO_4 em meio de melão, ao longo de seis ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros:

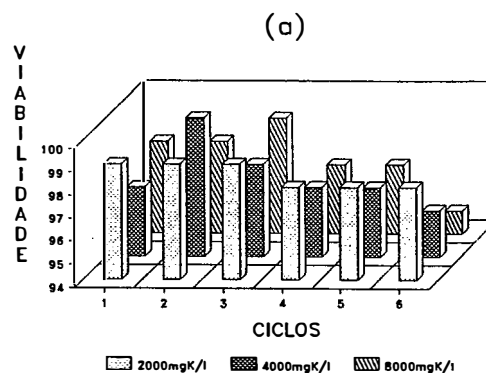
- (a) Eficiência fermentativa;**
- (b) Formação de glicerol (g/100g Etanol);**
- (c) Peso de fermento (g);**

À esquerda de cada gráfico, encontram-se as respectivas significâncias estatísticas.

Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao nao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-----------|------|----|----|-------|------|----|----|
| 2000mgK/l | 98.7 | a | A | 2 | 99.0 | a | A |
| 4000mgK/l | 97.8 | ab | A | 3 | 98.9 | a | A |
| 8000mgK/l | 97.7 | b | A | 1 | 98.4 | a | AB |
| | | | | 4 | 98.0 | ab | AB |
| | | | | 5 | 97.6 | ab | AB |
| | | | | 6 | 96.5 | b | B |

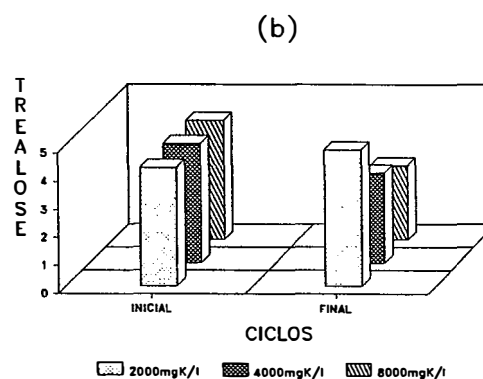
C.V. = 0.376% C.V. = 1.394%
D.M.S. 5% = 0.95753 D.M.S. 5% = 1.66308
D.M.S. 1% = 1.21366 D.M.S. 1% = 2.00557



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-----------|------|----|----|---------|------|----|----|
| 2000mgK/l | 4.56 | a | A | INICIAL | 4.25 | a | A |
| 4000mgK/l | 3.74 | b | B | FINAL | 3.58 | b | B |
| 8000mgK/l | 3.45 | c | C | | | | |

C.V. = 3.737% C.V. = 3.794%
D.M.S. 5% = 0.20768 D.M.S. 5% = 0.13737
D.M.S. 1% = 0.28549 D.M.S. 1% = 0.19747



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao nao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-----------|------|----|----|-------|------|----|----|
| 2000mgK/l | 10.8 | a | A | 1 | 14.2 | a | A |
| 4000mgK/l | 9.7 | a | A | 2 | 9.9 | ab | A |
| 8000mgK/l | 9.1 | a | A | 4 | 9.2 | ab | A |
| | | | | 6 | 9.1 | ab | A |
| | | | | 5 | 9.0 | ab | A |
| | | | | 3 | 8.0 | b | A |

C.V. = 24.960% C.V. = 45.992%
D.M.S. 5% = 3.19696 D.M.S. 5% = 5.55261
D.M.S. 1% = 4.05211 D.M.S. 1% = 6.69609

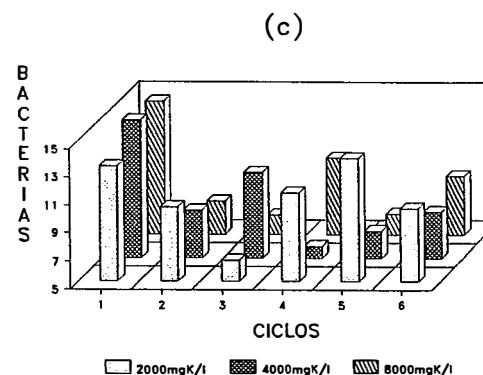


Figura 20. Efeito de diferentes concentrações de potássio (2000; 4000 e 8000 mgK/l) na forma de K_2SO_4 em meio de melão, ao longo de seis ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros:

(a) Viabilidade celular (%);

(b) Teor de trealose na célula (% MS) antes de iniciar a fermentação e ao final do último ciclo;

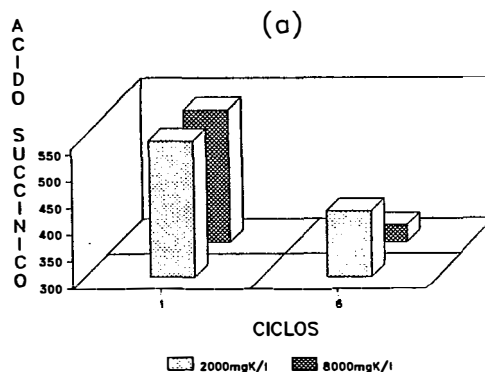
(c) Contaminação bacteriana (n° de bactérias $\times 10^{-6}$ /ml vinho)

À esquerda de cada gráfico, encontram-se as respectivas significâncias estatísticas.

Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-----------|-----|----|----|-------|-----|----|----|
| 2000mgK/l | 488 | a | A | 1 | 548 | a | A |
| 8000mgK/l | 438 | b | A | 6 | 377 | b | B |

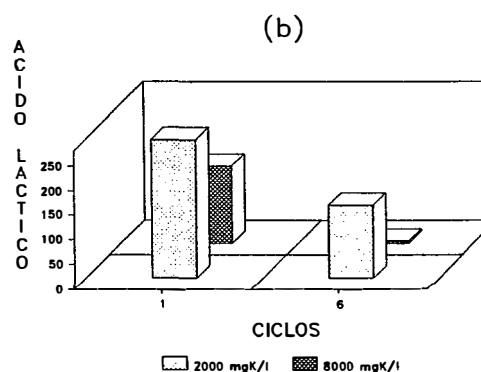
C.V. = 4.979% C.V. = 7.176%
D.M.S. 5% = 40.67877 D.M.S. 5% = 40.67877
D.M.S. 1% = 61.60599 D.M.S. 1% = 61.60599



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao nao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-----------|-----|----|----|-------|-----|----|----|
| 2000mgK/l | 213 | a | A | 1 | 218 | a | A |
| 8000mgK/l | 81 | b | B | 6 | 76 | b | B |

C.V. = 12.774% C.V. = 14.546%
D.M.S. 5% = 26.25754 D.M.S. 5% = 26.25754
D.M.S. 1% = 39.76575 D.M.S. 1% = 39.76575



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-----------|-----|----|----|-------|-----|----|----|
| 2000mgK/l | 255 | a | A | 6 | 178 | a | A |
| 8000mgK/l | 90 | b | B | 1 | 167 | a | A |

C.V. = 11.781% C.V. = 20.866%
D.M.S. 5% = 44.11041 D.M.S. 5% = 44.11041
D.M.S. 1% = 66.80304 D.M.S. 1% = 66.80304

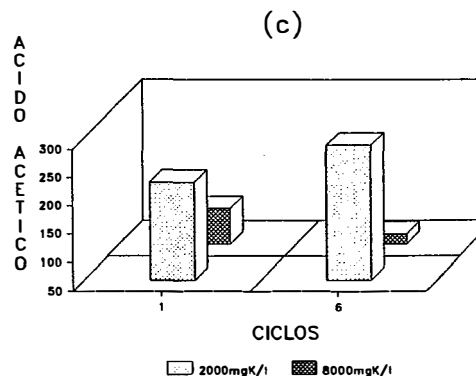


Figura 21. Efeito de diferentes concentrações de potássio (2000 e 8000 mgK/l) na forma de K_2SO_4 em meio de melão, em dois dos seis ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros:

(a) Formação de ácido succínico (mg/l vinho);

(b) Formação de ácido láctico (mg/l vinho);

(c) Formação de ácido acético (mg/l vinho);

À esquerda de cada gráfico, encontram-se as respectivas significâncias estatísticas.

Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao nao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-----------|------|----|----|-------|------|----|----|
| 8000mgK/l | 4.27 | a | A | 3 | 4.27 | a | A |
| 4000mgK/l | 4.24 | b | AB | 6 | 4.26 | ab | A |
| 2000mgK/l | 4.22 | b | B | 1 | 4.25 | ab | A |
| | | | | 2 | 4.24 | ab | A |
| | | | | 5 | 4.24 | ab | A |
| | | | | 4 | 4.22 | b | A |

C.V. = 0.358%

D.M.S. 5% = 0.02629

D.M.S. 1% = 0.03332

C.V. = 0.883%

D.M.S. 5% = 0.04565

D.M.S. 1% = 0.05506

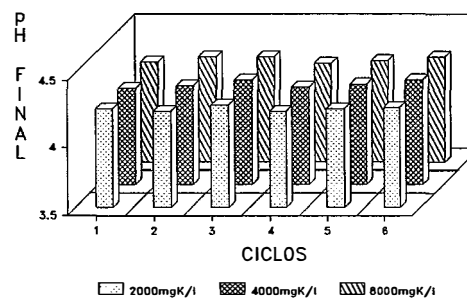


Figura 22. Efeito de diferentes concentrações de potássio (2000; 4000 e 8000 mgK/l) na forma de K_2SO_4 em meio de melaço, ao longo de seis ciclos fermentativos, sobre os valores de pH do vinho.

À esquerda do gráfico, encontram-se as respectivas significâncias estatísticas.

Esses aumentos das eficiências fermentativas foram acompanhados por uma relação inversa com os teores de glicerol (Figuras 15b e 19b). Esta constatação corrobora as informações da literatura, que a produção de glicerol afeta significativamente a eficiência fermentativa (OURA, 1977 e PANCHAL e STEWART, 1980). Embora não se tenha observado queda significativa na eficiência de fermentação pelo excesso de K^+ , a constatação dos aumentos na formação de glicerol permitem supor que haja um comprometimento da formação de etanol. Isto pelo fato da metodologia para dosagem de glicerol ser muito mais sensível do que aquela empregada para a eficiência fermentativa.

A produção de glicerol foi maior em todos os ciclos em ambos os ensaios nos tratamentos ao redor de $8000mgK^+/l$, o que concorda com a literatura, que considera esse poliol necessário à osmorregulação na levedura (LARSSON & GUSTAFSSON, 1987; BELLINGER *et alii*, 1990 e TOKUOKA, 1993).

Quanto ao crescimento e a viabilidade da levedura, os tratamentos com maiores teores de K^+ possibilitaram maiores crescimento e viabilidade em meio semi-sintético, porém ocorreu o contrário em meio de melaço (Figuras 15c, 16a, 19c e 20a). A viabilidade teve a tendência em ambos ensaios de cair ao longo dos ciclos em todos os tratamentos (Figuras 16a e 20a).

No meio de melaço, quanto maiores os teores de K^+ , menores foram os de trealose (Figura 20b) e no meio semi-sintético, os maiores teores de K^+ permitiram também maiores teores de trealose (Figura 16b). Pode-se observar que a variação dos teores de trealose, acompanha a viabilidade denotando uma resposta da trealose às condições estressantes.

A interpretação de tais resultados pode ser atribuída ao efeito protetor do K^+ contra a acidificação que é intensificada em meio semi-sintético, cujo poder tamponante é menor que o apresentado pelo meio de melão.

De acordo com os valores de pH final do vinho (Figuras 18 e 22), o meio semi-sintético apresenta uma maior acidez se comparada ao meio de melão, porém, em ambos ensaios houve uma tendência a um aumento nos valores de pH dos tratamentos com maiores níveis de K^+ . Isto pode ser explicado, pelo menos em parte, pelos menores teores dos três ácidos orgânicos nesses tratamentos (Figuras 17a, b, c, e 21a, b, c).

A contaminação bacteriana não variou significativamente nem em função dos tratamentos e nem dos ciclos em nenhum dos dois ensaios (Figuras 16c e 20c), porém, notam-se menores concentrações dos ácidos láctico e acético (que são principalmente produzidos pelas bactérias) nos tratamentos com maiores níveis de K^+ (Figuras 17b, c e 21b, c), o que pode demonstrar um possível efeito das altas concentrações de K^+ em inibir o metabolismo bacteriano.

Quanto aos teores de ácido succínico, estes caíram em ambos os ensaios, em relação aos respectivos teores dos primeiros ciclos, em todos os tratamentos. No entanto, as maiores concentrações de K^+ (tratamentos ao redor de $8000\text{mgK}^+/\text{l}$) foram responsáveis pelos menores teores de ácido succínico à um nível de 5% de significância. Essas constatações de diminuição do efluxo de ácido succínico na presença de K^+ já haviam sido feitas por CONWAY & BRADY (1950) e DURO & SERRANO (1981).

Analisando-se os efeitos do potássio de uma forma mais abrangente, percebe-se que com o aumento da concentração de potássio no meio, a excreção do succinato é diminuída, a despeito dos teores de glicerol mais elevados. Calculando-

se as estequiometrias entre esses dois produtos, em ambos ensaios, percebe-se que cerca de 5,5% do açúcar é desviado para síntese de glicerol, no meio semi-sintético e 6,5% no meio de melaço. A produção de succinato desvia 1,5% (meio semi-sintético) e 2,5% (meio de melaço) com os respectivos glicerois acoplados girando em torno de 20 a 25%. Como estas relações mantiveram-se relativamente próximas, e o crescimento caiu no meio de melaço, podendo-se relacionar neste caso, a formação de glicerol excedente com o efeito osmorregulador, enquanto no meio semi-sintético, parte é conectada ao crescimento e parte ao efeito osmorregulador.

Em função das intensidades desses fatores intrinsecamente relacionados, que variou de acordo com as condições de cada ensaio, a eficiência fermentativa pode ou não sofrer oscilações.

No cômputo geral, o potássio pode exercer um efeito protetor em meio ácido com baixa capacidade tamponante. No entanto, o efeito estressante é percebido no meio de melaço pela diminuição do crescimento, da viabilidade e do teor de trealose no fermento nas altas concentrações de potássio. Esse efeito também é percebido sobre o metabolismo bacteriano, que restringe a formação dos ácidos láctico e acético.

4.3.3. Efeito do sulfito

A presença do sulfito não chegou a afetar a eficiência fermentativa no presente experimento (Figura 23a). Segundo GUTIERREZ (1988) e HERRAIZ *et alii* (1989) a presença do sulfito não afetou a produção de etanol, enquanto que GIBBONS & WETBY (1987) perceberam uma queda na produção de etanol em mosto de beterraba sulfitado.

A produção de glicerol respondeu sendo maior quanto maiores os teores de sulfito, embora caísse gradativamente ao longo de todos os tratamentos (Figura 23b).

Esse resultado era esperado uma vez que, com a formação de compostos de adição como o acetaldeído-bissulfito (REED & PEPPLER, 1973), a produção de glicerol é favorecida (RANKINE & BRIDSON, 1973).

Embora houvesse uma tendência de crescimento ao longo dos ciclos em todos os tratamentos, a presença de sulfito (100 e 300 mgSO₂/l) prejudicou o crescimento, se comparados à testemunha (Figura 23c).

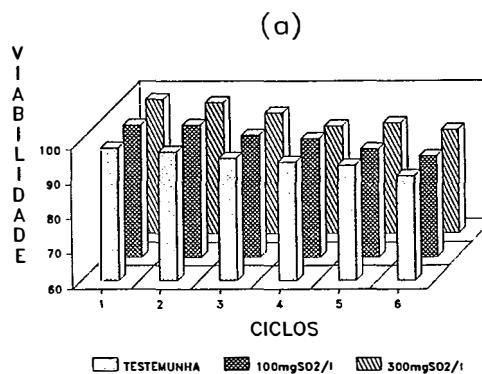
O sulfito não afetou a viabilidade (Figura 24a) e nem os teores de trealose (Figura 24b). Segundo REED & PEPPLER (1973) a levedura tem a capacidade de se adaptar à presença do sulfito, no entanto queda de viabilidade ou morte celular foi observada por vários autores (SCHIMZ & HOLZES, 1979; SCHIMZ, 1980; ANACLETO & van UDEN, 1982 e GIBONS & WESTBY, 1987). Possivelmente com o aumento do pH ao longo dos ciclos (Figura 26), houve uma diminuição do efeito tóxico do sulfito sobre a levedura, uma vez que em valores de pH mais baixos, é que a forma mais tóxica é predominante (ANACLETO & van UDEN, 1982).

O efeito tóxico do sulfito foi sentido na redução da contaminação bacteriana, observada pela redução do número de bactérias (Figura 24c), bem como na sensível redução dos teores dos ácidos láctico e acético (Figura 25b e c). O efeito bactericida do sulfito é citado por vários autores (REED & PEPPLER, 1973; CARR *et alii*, 1976 e SCHIMZ & HOLZER, 1979).

Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao nao foi significativa.

| Trai. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------------------------|------|----|----|-------|------|----|----|
| TEST. | 94.5 | a | A | 1 | 98.5 | a | A |
| 100mgSO ₂ /l | 94.5 | a | A | 2 | 97.6 | a | A |
| 300mgSO ₂ /l | 94.2 | a | A | 3 | 95.3 | b | B |
| | | | | 4 | 93.3 | c | C |
| | | | | 5 | 91.9 | c | C |
| | | | | 6 | 89.6 | d | D |

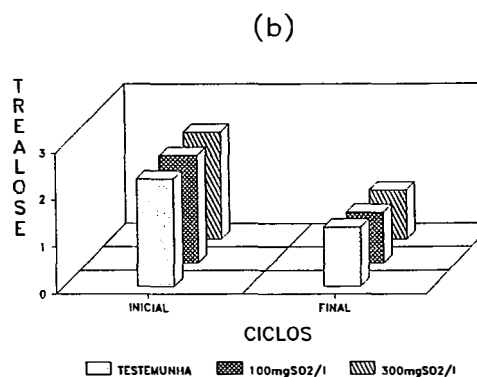
C.V. = 0.719% C.V. = 1.386%
D.M.S. 5% = 0.91658 D.M.S. 5% = 1.51996
D.M.S. 1% = 1.16176 D.M.S. 1% = 1.91980



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao nao foi significativa.

| Trai. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------------------------|------|----|----|---------|------|----|----|
| TEST. | 1.77 | a | A | INICIAL | 2.29 | a | A |
| 100mgSO ₂ /l | 1.68 | a | A | FINAL | 1.12 | b | B |
| 300mgSO ₂ /l | 1.67 | a | A | | | | |

C.V. = 14.629% C.V. = 20.083%
D.M.S. 5% = 0.48018 D.M.S. 5% = 0.31762
D.M.S. 1% = 0.66010 D.M.S. 1% = 0.45658



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trai. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------------------------|------|----|----|-------|------|----|----|
| TEST. | 11.9 | a | A | 6 | 13.7 | a | A |
| 100mgSO ₂ /l | 4.79 | b | B | 4 | 8.6 | b | B |
| 300mgSO ₂ /l | 2.96 | c | B | 2 | 5.3 | c | C |
| | | | | 3 | 5.2 | c | C |
| | | | | 5 | 4.1 | cd | C |
| | | | | 1 | 2.2 | d | C |

C.V. = 16.640% C.V. = 32.836%
D.M.S. 5% = 1.51307 D.M.S. 5% = 2.62797
D.M.S. 1% = 1.91780 D.M.S. 1% = 3.16916

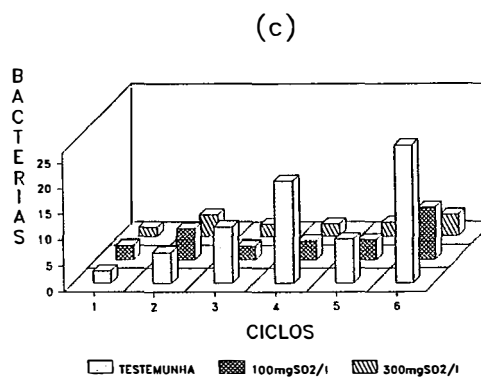


Figura 24. Efeito de diferentes concentrações de sulfito (0; 100 e 300 mg SO₂/l) em meio semi-sintético, ao longo de seis ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros:

(a) Viabilidade celular (%);

(b) Teor de trealose na célula (% MS) antes de iniciar a fermentação e ao final do último ciclo;

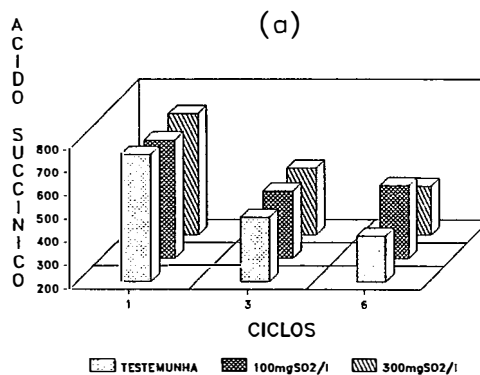
(c) Contaminação bacteriana (nº de bactérias x 10⁻⁶/ml vinho);

À esquerda de cada gráfico encontram-se as respectivas significâncias estatísticas.

Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------------------------|-----|----|----|-------|-----|----|----|
| 100mgSO ₂ /l | 570 | a | A | 1 | 725 | a | A |
| 300mgSO ₂ /l | 540 | ab | A | 3 | 457 | b | B |
| TEST. | 513 | b | A | 6 | 440 | b | B |

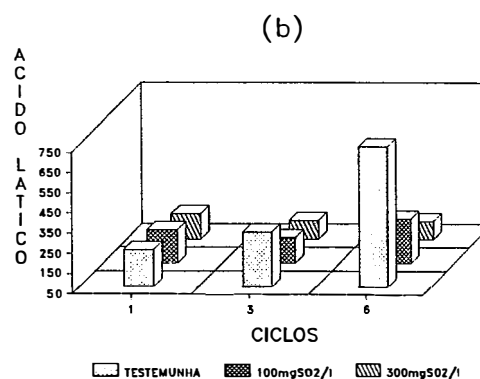
C.V. = 8.395% C.V.= 9.288%
D.M.S. 5% = 52.38897 D.M.S. 5% = 52.38897
D.M.S. 1% = 68.20275 D.M.S. 1% = 68.20275



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------------------------|-----|----|----|-------|-----|----|----|
| TEST. | 432 | a | A | 6 | 385 | a | A |
| 100mgSO ₂ /l | 219 | b | B | 3 | 213 | b | B |
| 300mgSO ₂ /l | 154 | c | C | 1 | 208 | b | B |

C.V. = 5.689% C.V. = 8.724%
D.M.S. 5% = 24.46881 D.M.S. 5% = 24.46881
D.M.S. 1% = 31.85689 D.M.S. 1% = 31.85689



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------------------------|-----|----|----|-------|-----|----|----|
| TEST. | 385 | a | A | 1 | 297 | a | A |
| 300mgSO ₂ /l | 145 | b | B | 6 | 269 | b | B |
| 100mgSO ₂ /l | 112 | c | C | 3 | 77 | c | C |

C.V. = 6.006% C.V. = 8.534%
D.M.S. 5% = 19.08442 D.M.S. 5% = 19.08442
D.M.S. 1% = 24.84675 D.M.S. 1% = 24.84675

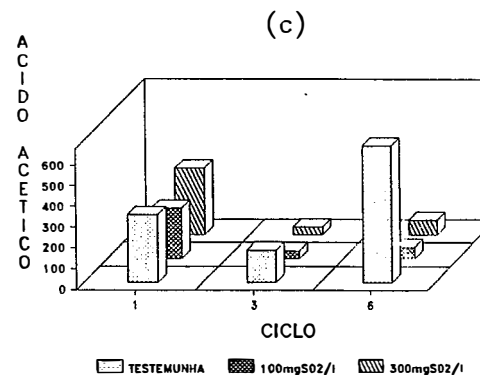


Figura 25. Efeito de diferentes concentrações de sulfito (0; 100 e 300 mg SO₂/l) em meio semissintético, em três dos seis ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros:

(a) Formação de ácido succínico (mg/l vinho);

(b) Formação de ácido láctico (mg/l vinho);

(c) Formação de ácido acético (mg/l vinho);

À esquerda de cada gráfico encontram-se as respectivas significâncias estatísticas.

Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------------------------|------|----|----|-------|------|----|----|
| 300mgSO ₂ /l | 3.78 | a | A | 4 | 3.93 | a | A |
| TEST. | 3.78 | a | A | 5 | 3.92 | a | A |
| 100mgSO ₂ /l | 3.68 | b | B | 6 | 3.91 | a | A |
| | | | | 3 | 3.66 | b | B |
| | | | | 2 | 3.60 | c | C |
| | | | | 1 | 3.48 | d | D |

C.V. = 0.515% C.V. = 0.800%
D.M.S. 5% = 0.02104 D.M.S.5% = 0.03654
D.M.S. 1% = 0.02667 D.M.S.1% = 0.04406

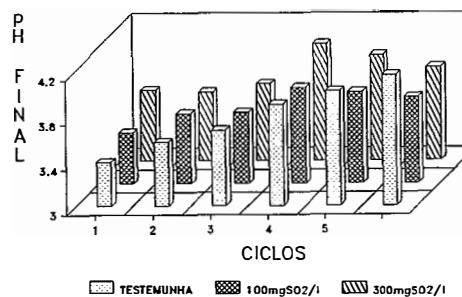


Figura 26. Efeito de diferentes concentrações de sulfito (0; 100 e 300 mg SO₂/l) em meio semi-sintético, ao longo de seis ciclos fermentativos, sobre os valores do pH do vinho.

À esquerda do gráfico encontram-se as respectivas significâncias estatísticas.

Quanto à produção do ácido succínico, esta foi maior no primeiro ciclo independentemente dos tratamentos, assim como maior que a testemunha nos tratamentos com sulfito a um nível de 5% de significância (Figura 25a), embora OURA (1977) não tivesse encontrado efeito do sulfito sobre o referido ácido. No presente trabalho, o ácido succínico desviou 3,0% do açúcar para sua produção. O glicerol desviou 5,5% do açúcar, dos quais, cerca de 35% estiveram conectados à síntese de succinato.

Pode-se considerar, portanto, que o sulfito neste presente ensaio, acabou por propiciar um efeito benéfico, na medida em que controlou a contaminação bacteriana sem causar estresse à levedura.

4.3.4. Efeito de diferentes concentrações de substrato

As diferentes concentrações de substrato (6, 12 e 18%) não afetaram a eficiência fermentativa, que tão pouco teve considerável alteração ao longo dos ciclos (Figura 27a), porém aumentou a velocidade da fermentação, como era de se esperar (Tabela 28, apêndice).

A formação de glicerol, se avaliada pelos teores no vinho mostra-se maior com o aumento da concentração de substrato, mas quando expressa em relação ao etanol produzido é sensivelmente diminuída com o aumento da concentração de açúcar (Figura 27b). Isto significa que o incremento na síntese do glicerol não seguiu a mesma proporcionalidade que o incremento na síntese do etanol propiciada pelo aumento da concentração de substrato.

Fato já observado por BRUMM & HEBEDA (1988), que sugeriram a partir dessa constatação, que o glicerol seria principalmente produzido quando a taxa de fermentação fosse alta, propiciada pelas altas concentrações de substrato, para regenerar o NADH a partir da triose-fosfato, no início da fermentação, quando a taxa de redução do acetaldeído é baixa, desviando-se assim, o fluxo glicolítico. Esse mecanismo, segundo os autores, seria o principal modulador da síntese de glicerol a altas concentrações de açúcar, sobrepondo-se ao efeito osmorregulador provocado pelo aumento da pressão osmótica na presença do açúcar.

O glicerol também esteve, no presente ensaio, acompanhado pelo crescimento (Figura 27c), que foi menor com as maiores concentrações de açúcar, embora aumentando em todos os tratamentos, ao longo dos ciclos, diminui em valores relativos.

A despeito da biomassa ter aumentado, a viabilidade celular caiu ao longo dos ciclos, prioritariamente com o aumento da concentração de açúcar (Figura 28a) a qual correlacionou-se diretamente com os teores de trealose (Figura 28b), denotando um efeito estressante das altas concentrações de açúcar sobre a levedura. Uma hipótese provável, que explica tal efeito, encontra-se nos relatos de PANCHAL & STEWART (1980) e D'AMORE *et alii* (1988), a cerca da toxidez pelo etanol ocasionada pelo acúmulo intracelular no início da fermentação, o qual é maior com as mais altas concentrações de substrato (NAGODAWITHANA *et alii*, 1974 e NAGODAWITHANA & STEINKRAUS, 1976).

Os ácidos succínico e acético apresentam-se em maiores quantidades no tratamento com maior concentração de substrato (Figura 29 a e c), muito embora, à semelhança do que ocorre com o glicerol, os incrementos na síntese desses ácidos (possibilitados pelos maiores teores de açúcar no meio), foram menores em teores relativos ao etanol produzido ou ao açúcar consumido. Tal efeito ficou evidenciado pelo cálculo estequiométrico. Na menor concentração de substrato, cerca de 8% do açúcar é desviado para síntese de glicerol, enquanto que na maior concentração, esse valor cai para quase metade (4,8%). Quanto ao succinato, cerca de 4% do açúcar no tratamento com menor ART, enquanto no de maior ART, cai para 2,7%. Em termos de glicerol acoplado, o ácido succínico responde por cerca de 40% da sua produção. A produção de ácido acético desvia 1,4% do açúcar, e com o aumento na concentração de substrato, esse valor cai para 0,6%, respondendo por 10% do glicerol produzido, considerando todo o acetado formado pela levedura.

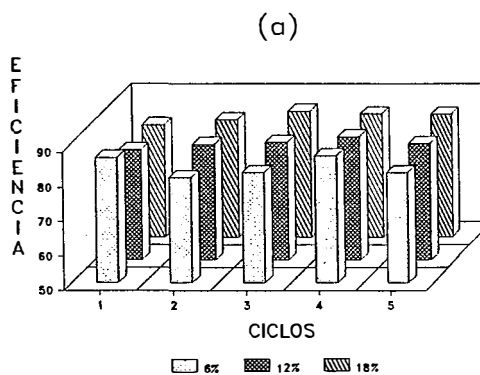
O pH final do vinho foi decaindo com o aumento da concentração de açúcar (Figura 30), o que era esperado, uma vez que há maior teor de ácidos succínico e acético presentes no vinho com maior teor de açúcar. O ácido láctico, entretanto não apresentou tendência definida (Figura 30b), assim como a contaminação bacteriana (Figura 28c).

Com base nos dados do presente ensaio, pode-se inferir que embora as altas concentrações de substrato permitissem menores desvios do açúcar para a síntese de glicerol e ácidos orgânicos, não chegou a aumentar significativamente a eficiência fermentativa, mas mostrou-se estressante, posto que permitiu a queda da trealose e da viabilidade.

Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|------|----|----|-------|------|----|----|
| 18% | 84.7 | a | A | 4 | 86.1 | a | A |
| 12% | 83.8 | a | A | 3 | 84.1 | ab | A |
| 6% | 83.5 | a | A | 5 | 83.7 | ab | A |
| | | | | 1 | 83.6 | ab | A |
| | | | | 2 | 82.5 | b | A |

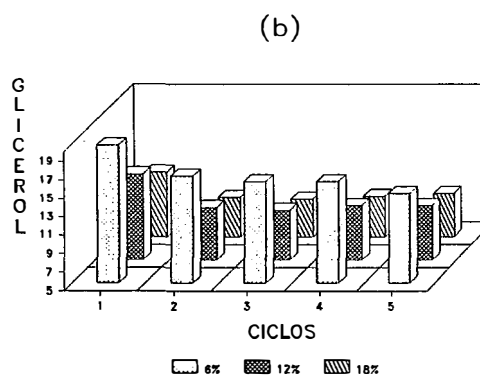
C.V. = 1.293% C.V. 2.909%
D.M.S. 5% = 1.89147 D.M.S. 5% = 2.86815
D.M.S. 1% = 2.40862 D.M.S. 1% = 3.51320



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|------|----|----|-------|------|----|----|
| 6% | 16.6 | a | A | 1 | 15.4 | a | A |
| 12% | 11.4 | b | B | 2 | 12.2 | b | B |
| 18% | 9.9 | c | C | 4 | 12.1 | bc | BC |
| | | | | 3 | 11.8 | cd | C |
| | | | | 5 | 11.7 | d | C |

C.V. = 1.403% C.V. = 1.792%
D.M.S. 5% = 0.17572 D.M.S. 5% = 0.26645
D.M.S. 1% = 0.22376 D.M.S. 1% = 0.32638



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|------|----|----|-------|------|----|----|
| 18% | 13.0 | a | A | 5 | 13.6 | a | A |
| 12% | 12.7 | b | B | 4 | 13.2 | b | B |
| 6% | 11.9 | c | C | 3 | 12.7 | c | C |
| | | | | 2 | 12.1 | d | D |
| | | | | 1 | 11.0 | e | E |

C.V. = 0.606% C.V. = 0.873%
D.M.S. 5% = 0.08496 D.M.S. 5% = 0.12882
D.M.S. 1% = 0.10818 D.M.S. 1% = 0.15779

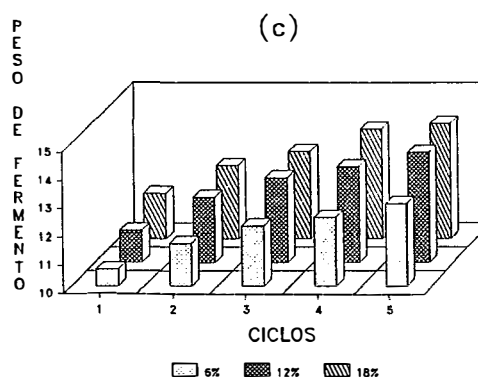


Figura 27. Efeito de diferentes concentrações de substrato (6; 12 e 18% ART) em meio de melação, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros:

- (a) Eficiência fermentativa;**
- (b) Formação de glicérol (g/100g Etanol);**
- (c) Peso de fermento (g);**

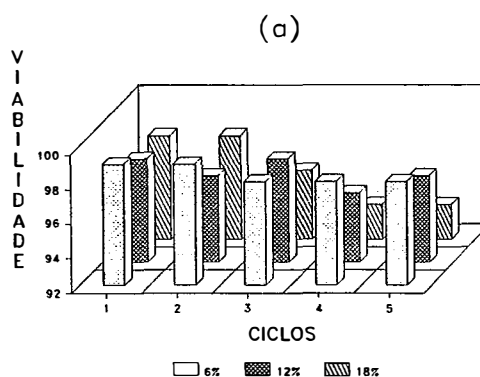
À esquerda de cada gráfico encontram-se as respectivas significâncias estatísticas.

Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.

A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|------|----|----|-------|------|----|----|
| 6% | 98.4 | a | A | 1 | 98.6 | a | A |
| 12% | 97.3 | b | B | 2 | 98.1 | a | A |
| 18% | 96.5 | b | B | 3 | 97.8 | a | AB |
| | | | | 5 | 96.5 | b | BC |
| | | | | 4 | 96.1 | b | C |

C.V. = 0.383% C.V. = 1.122%
 D.M.S. 5% = 0.84640 D.M.S. 5% = 1.28345
 D.M.S. 1% = 1.07782 D.M.S. 1% = 1.57210

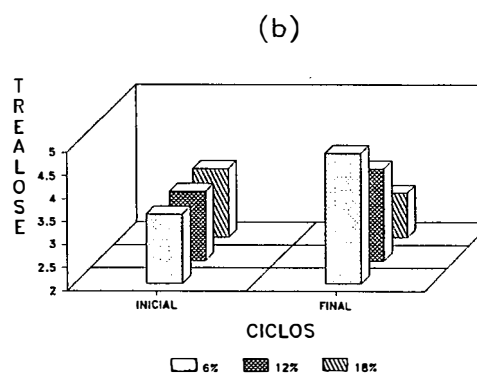


Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.

A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|------|----|----|---------|------|----|----|
| 6% | 4.83 | a | A | FINAL | 3.93 | a | A |
| 12% | 3.99 | b | B | INICIAL | 3.50 | b | B |
| 18% | 2.97 | c | C | | | | |

C.V. = 2.894% C.V. = 4.057%
 D.M.S. 5% = 0.29776 D.M.S. 5% = 0.13927
 D.M.S. 1% = 0.40933 D.M.S. 1% = 0.20020



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.

A interacao nao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|------|----|----|-------|------|----|----|
| 18% | 7.88 | a | A | 4 | 9.06 | a | A |
| 6% | 6.54 | a | A | 2 | 7.65 | a | A |
| 12% | 5.73 | a | A | 3 | 6.14 | a | A |
| | | | | 5 | 5.53 | a | A |
| | | | | 1 | 5.21 | a | A |

C.V. = 18.100% C.V. = 57.583%
 D.M.S. 5% = 2.99439 D.M.S. 5% = 4.54057
 D.M.S. 1% = 3.81308 D.M.S. 1% = 5.56175

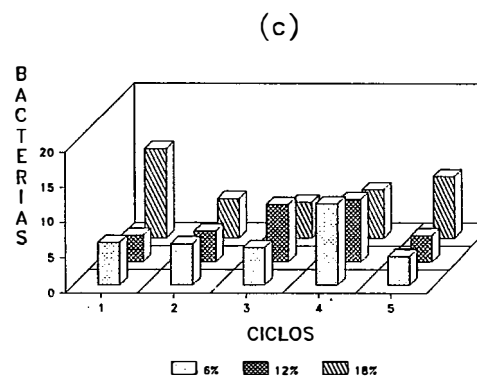


Figura 28. Efeito de diferentes concentrações de substrato (6; 12 e 18% ART) em meio de meloço, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros:

(a) Viabilidade celular (%);

(b) Teor de trealose na célula (% MS) antes de iniciar a fermentação e ao final do último ciclo;

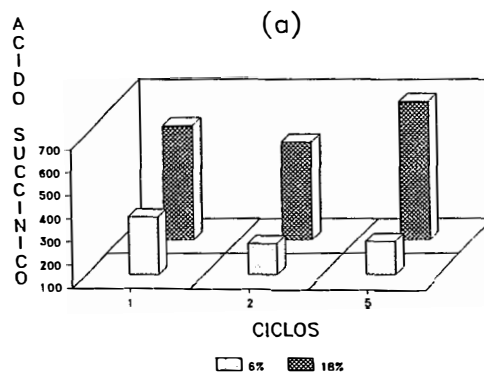
(c) Contaminação bacteriana (nº de bactérias x 10⁻⁶/ml vinho);

À esquerda de cada gráfico encontram-se as respectivas significâncias estatísticas.

Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|-----|----|----|-------|-----|----|----|
| 18% | 606 | a | A | 1 | 480 | a | A |
| 6% | 280 | b | B | 5 | 470 | a | A |
| | | | | 2 | 379 | b | B |

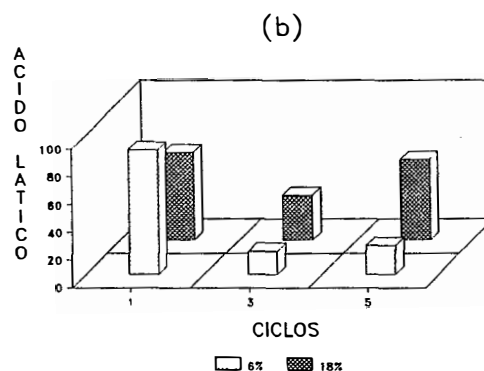
C.V. = 2.354% C.V. = 9.563%
D.M.S. 5% = 37.70380 D.M.S. 5% = 56.52250
D.M.S. 1% = 52.88325 D.M.S. 1% = 75.71317



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|------|----|----|-------|------|----|----|
| 18% | 51.2 | a | A | 1 | 76.8 | a | A |
| 6% | 42.9 | b | A | 5 | 39.7 | b | B |
| | | | | 2 | 24.6 | c | C |

C.V. = 7.309% C.V. = 14.291%
D.M.S. 5% = 5.98277 D.M.S. 5% = 8.96889
D.M.S. 1% = 8.39142 D.M.S. 1% = 12.01404



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao nao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|-----|----|----|-------|-----|----|----|
| 18% | 168 | a | A | 2 | 160 | a | A |
| 6% | 128 | b | B | 5 | 152 | a | A |
| | | | | 1 | 132 | a | A |

C.V. = 11.049% C.V. = 16.066%
D.M.S. 5% = 21.19534 D.M.S. 5% = 31.77435
D.M.S. 1% = 29.72853 D.M.S. 1% = 42.56246

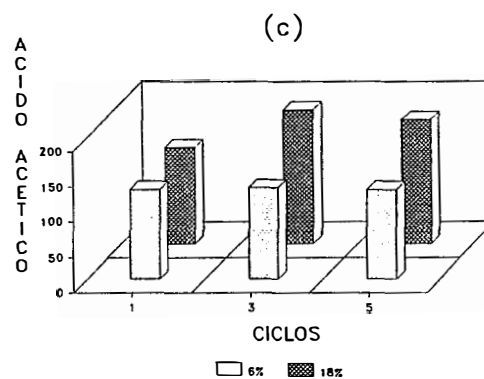


Figura 29. Efeito de diferentes concentrações de substrato (6 e 18% ART) em meio de melão, em três dos cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros:
(a) Formação de ácido succínico (mg/l vinho);
(b) Formação de ácido láctico (mg/l vinho);
(c) Formação de ácido acético (mg/l vinho);
À esquerda de cada gráfico encontram-se as respectivas significâncias estatísticas.

Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|------|----|----|-------|------|----|----|
| 6% | 4.03 | a | A | 4 | 3.93 | a | A |
| 12% | 3.84 | b | B | 5 | 3.93 | a | A |
| 18% | 3.74 | c | C | 3 | 3.87 | b | B |
| | | | | 2 | 3.83 | c | C |
| | | | | 1 | 3.79 | d | D |

C.V. = 0.348% C.V. = 0.620%
D.M.S. 5% = 0.01857 D.M.S. 5% = 0.02817
D.M.S. 1% = 0.02365 D.M.S. 1% = 0.03450

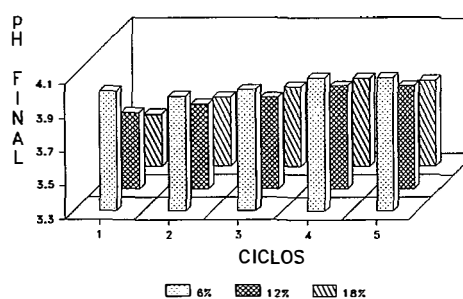


Figura 30. Efeito de diferentes concentrações de substrato (6, 12 e 18% ART) em meio de melão, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os valores do pH do vinho.

À esquerda do gráfico encontram-se as significâncias estatísticas.

4.3.5. Efeito dos diferentes valores de pH

Os diferentes valores de pH (3,45; 4,40 e 4,92) proporcionaram poucas variações sobre a eficiência fermentativa (Figura 31a). Houve uma tendência do tratamento com pH 4,92 permitir maior eficiência, mas essa tendência se alterou no quarto ciclo, quando a eficiência no tratamento com pH 3,45, subiu. Possivelmente, se houvessem ciclos subseqüentes essa tendência tornar-se-ia mais acentuada.

A produção de glicerol decaiu ao longo dos ciclos, em todos os tratamentos, sendo maior para o tratamento com menor pH (Figura 31b) e o crescimento também diminuiu com os ciclos e em função da acidez (Figura 31c).

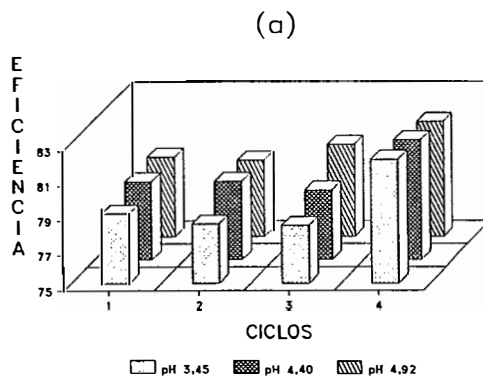
A viabilidade celular caiu ao longo dos ciclos, mais acentuadamente nos tratamentos de pH mais elevados (Figura 32a), que teve correlação direta com os teores de trealose (Figura 32b), e relacionando-se com a contaminação bacteriana, que foi maior (Figura 32c).

A contaminação bacteriana sofreu sensível redução com o aumento da acidez externa, permanecendo inalterada ao longo dos ciclos para o tratamento pH 3,45 e aumentando nos demais tratamentos (Figura 32c). O aumento da contaminação bacteriana ao longo dos ciclos com a menor acidez, foi acompanhado de perto pelo aumento nos teores dos ácidos láctico e acético (Figura 33b e c), enquanto que os teores de ácido succínico permaneceram inalterados (Figura 33a). O pH final do vinho manteve igual tendência do inicial (Figura 34).

Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|---------|------|----|----|-------|------|----|----|
| pH 4.92 | 80.2 | a | A | 4 | 81.9 | a | A |
| pH 4.40 | 79.9 | a | AB | 1 | 79.3 | b | B |
| pH 3.45 | 79.4 | b | B | 3 | 79.2 | b | B |
| | | | | 2 | 79.1 | b | B |

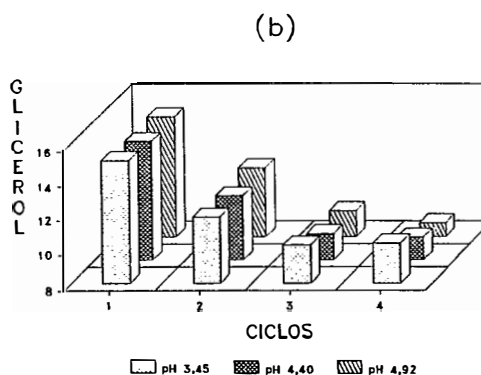
C.V. = 0.388% C.V. = 0.616%
D.M.S. 5% = 0.43180 D.M.S. 5% = 0.55044
D.M.S. 1% = 0.55420 D.M.S. 1% = 0.68965



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|---------|------|----|----|-------|------|----|----|
| pH 3.45 | 11.8 | a | A | 1 | 15.0 | a | A |
| pH 4.40 | 11.3 | b | B | 2 | 11.8 | b | B |
| pH 4.92 | 11.3 | b | B | 3 | 9.7 | c | C |
| | | | | 4 | 9.4 | d | D |

C.V. = 0.865% C.V. = 1.750%
D.M.S. 5% = 0.17676 D.M.S. 5% = 0.22534
D.M.S. 1% = 0.22687 D.M.S. 1% = 0.28232



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|---------|------|----|----|-------|------|----|----|
| pH 4.92 | 14.0 | a | A | 2 | 14.2 | a | A |
| pH 4.40 | 13.8 | b | B | 1 | 13.9 | b | B |
| pH 3.45 | 13.6 | c | C | 3 | 13.8 | b | B |
| | | | | 4 | 13.4 | c | C |

C.V. = 0.929% C.V. = 0.927%
D.M.S. 5% = 0.11279 D.M.S. 5% = 0.14378
D.M.S. 1% = 0.14476 D.M.S. 1% = 0.18014

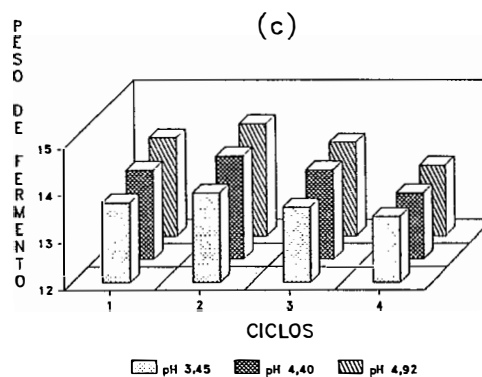


Figura 31. Efeito de diferentes valores de pH do meio semi-sintético (3,45; 4,40 e 4,92) ao longo de quatro ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros:

- (a) Eficiências fermentativa;**
- (b) Formação de glicerol (g/100g Etanol);**
- (c) Peso de fermento (g);**

À esquerda de cada gráfico encontram-se as respectivas significâncias estatísticas.

Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.

A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|---------|------|----|----|-------|------|----|----|
| pH 3.45 | 83.4 | a | A | 1 | 93.7 | a | A |
| pH 4.40 | 79.7 | b | B | 2 | 87.4 | b | B |
| pH 4.92 | 78.3 | b | B | 3 | 73.9 | c | C |
| | | | | 4 | 67.0 | d | D |

C.V. = 1.154%

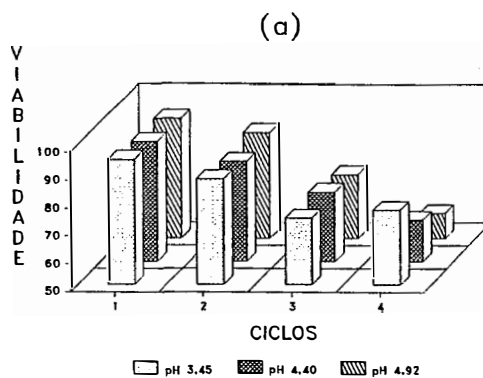
C.V. = 3.811%

D.M.S. 5% = 2.69384

D.M.S. 5% = 3.43405

D.M.S. 1% = 3.45748

D.M.S. 1% = 4.30253



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.

A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|---------|------|----|----|---------|------|----|----|
| pH 3.45 | 3.52 | a | A | INICIAL | 4.37 | a | A |
| pH 4.40 | 2.71 | b | AB | FINAL | 2.94 | b | B |
| pH 4.92 | 2.59 | b | B | | | | |

C.V. = 4.792%

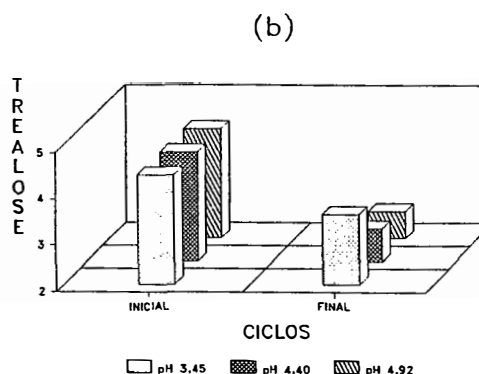
C.V. = 8.980%

D.M.S. 5% = 0.64837

D.M.S. 5% = 0.30326

D.M.S. 1% = 0.89130

D.M.S. 1% = 0.43593



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.

A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|---------|------|----|----|-------|------|----|----|
| pH 4.92 | 38.9 | a | A | 4 | 40.4 | a | A |
| pH 4.40 | 31.8 | b | B | 3 | 26.2 | b | B |
| pH 3.45 | 12.4 | c | C | 2 | 22.3 | b | B |
| | | | | 1 | 21.9 | b | B |

C.V. = 6.542%

C.V. = 19.737%

D.M.S. 5% = 0.48060

D.M.S. 5% = 0.61265

D.M.S. 1% = 0.61684

D.M.S. 1% = 0.76760

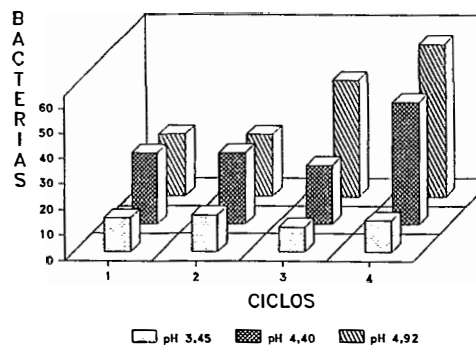


Figura 32. Efeito de diferentes valores de pH do meio semi-sintético (3,45; 4,40 e 4,92) ao longo de quatro ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros;

(a) Viabilidade celular (%);

(b) Teor de trealose na célula (% MS) antes de iniciar a fermentação e ao final do último ciclo;

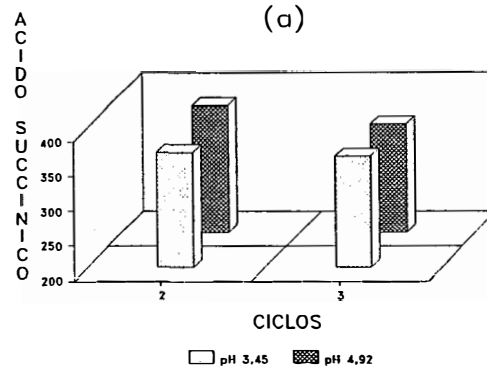
(c) Contaminação bacteriana (nº de bactérias x 10⁻⁶/ml vinho);

À esquerda de cada gráfico encontram-se as respectivas significâncias estatísticas.

Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao nao foi significativa.

| Trai. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|---------|-----|----|----|-------|-----|----|----|
| pH 3.45 | 373 | a | A | 2 | 385 | a | A |
| pH 4.92 | 370 | a | A | 3 | 358 | a | A |

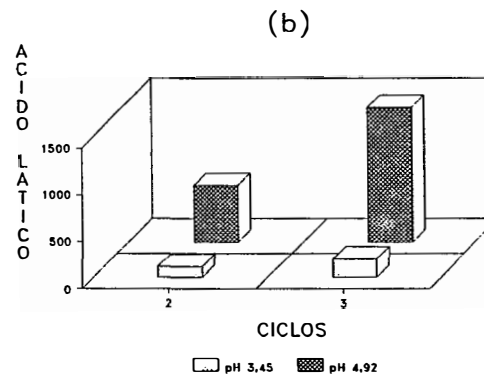
C.V. = 4.434% C.V. = 6.991%
D.M.S. 5% = 31.80468 D.M.S. 5% = 31.80468
D.M.S. 1% = 48.16663 D.M.S. 1% = 48.16663



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trai. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|---------|------|----|----|-------|-----|----|----|
| pH 4.92 | 1023 | a | A | 3 | 818 | a | A |
| pH 3.45 | 155 | b | B | 2 | 360 | b | B |

C.V. = 13.141% C.V. = 18.140%
D.M.S. 5% = 130.87229 D.M.S. 5% = 130.87229
D.M.S. 1% = 198.19965 D.M.S. 1% = 198.19965



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trai. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|---------|-----|----|----|-------|-----|----|----|
| pH 3.45 | 806 | a | A | 3 | 763 | a | A |
| pH 4.92 | 472 | b | B | 2 | 516 | b | B |

C.V. = 4.830% C.V. = 10.843%
D.M.S. 5% = 84.83011 D.M.S. 5% = 84.83011
D.M.S. 1% = 128.47103 D.M.S. 1% = 128.47103

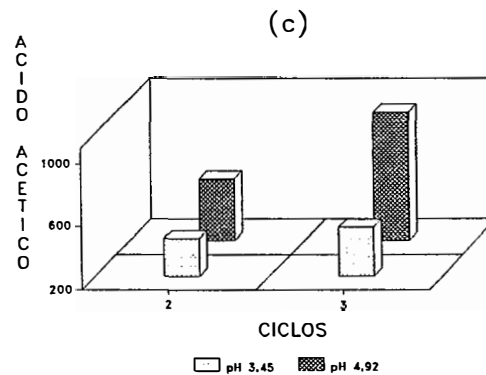


Figura 33. Efeito de diferentes valores de pH do meio semi-sintético (3,45 e 4,92) em dois dos quatro ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros:

(a) Formação de ácido succínico (mg/l vinho);

(b) Formação de ácido láctico (mg/l vinho);

(c) Formação de ácido acético (mg/l vinho);

À esquerda de cada gráfico encontram-se as respectivas significâncias estatísticas.

Ficou evidenciado o efeito benéfico que o pH do meio fermentativo exerce, sobretudo no controle da contaminação, reiterando o efeito do ácido, seja reduzindo o número de bactérias presente (GALLO, 1989), como inibindo o metabolismo bacteriano, o que ficou explicitado pelos níveis mínimos dos ácidos típicos da presença de bactérias (lático e acético), no tratamento mais ácido.

O ácido succínico mantendo-se inalterado, demonstra que a acidez não chegou a afetar significativamente o metabolismo da levedura. Isto porquê as leveduras têm capacidade de manterem sua homeostase, independentemente dos valores do pH do meio (ERASO & GANCEDO, 1987), mediante a expulsão dos prótons pela ATPase da membrana.

Mas mesmo assim, a acidez provocou uma redução no crescimento da levedura. Com a redução do crescimento era de se esperar que reduzisse também a produção de glicerol, o que contudo, não ocorreu. A redução dos teores de glicerol ocorreu nos tratamentos menos ácidos à semelhança da trealose e consequentemente da viabilidade. As diferenças encontradas podem ser principalmente devido à ação tóxica das bactérias do que ao tratamento em si.

Como os níveis de ácido succínico mantiveram-se estáveis e o teor de glicerol, que no tratamento mais ácido foi maior e não se correlacionou com o crescimento, que foi menor, nota-se que a produção de glicerol não guardou correlação com o equilíbrio de redox celular, pelo menos com os parâmetros conhecidos até o presente momento.

Segundo NORDSTRÖM (1966) o crescimento conduz a uma oxidação, desbalanceando o equilíbrio de redox. No tratamento com pH 3,45 não ocorreu crescimento ao longo dos ciclos. De acordo com OURA (1977), a produção

de ácido succínico aumentada está acoplada com um aumento quintuplicado em termos molares do teor de glicerol para a manutenção do redox. No presente ensaio, o ácido succínico não variou.

Cerca de 5% do açúcar foi desviado para produção de glicerol, e 1,8% para a produção de ácido succínico. A produção de ácido succínico respondeu por 26% do glicerol formado. O desvio de açúcar para a produção de ácido acético aumentou de 2% para 3,5% com o aumento do pH, decorrente principalmente da atividade bacteriana.

Além disso, a velocidade de fermentação foi menor no tratamento mais ácido, o que de acordo com BRUMM & HEBEDA (1988), era para proporcionar menor produção de glicerol.

Fica evidenciado, portanto, que a fração de glicerol que foi reduzida ao longo dos ciclos, não guarda correlação com o equilíbrio de redox, relacionado aos parâmetros conhecidos, nem tão pouco com o efeito osmorregulador (cujas características não se enquadram no presente ensaio).

Interessante notar que, embora o tratamento com pH 3,45 tenha provocado uma redução do teor de trealose em relação ao início do ensaio, as reduções maiores foram propiciadas pelos tratamentos menos ácidos, o que foi acompanhado também pela queda das viabilidades celulares.

Conclui-se que, a despeito do tratamento mais ácido (pH 3,45) induzir uma relativa perturbação no metabolismo da levedura, observado pelas reduções nas sínteses de glicerol, trealose e estagnação do crescimento, esse tratamento ainda exerce um efeito protetor levedura, por reduzir a proliferação

de bactérias, bem como seu metabolismo, onde estes sim, compreendem efeitos estressantes.

4.3.6. Efeito de diferentes temperaturas

As diferentes temperaturas estudadas no presente ensaio não afetaram a eficiência fermentativa ao nível de 1% de probabilidade. Ao nível de 5%, no entanto, a temperatura de 38 C proporcionou maior eficiência que a 27 C (Figura 35a). A temperatura mais baixa (27 C) provocou aumento no teor de glicerol (Figura 35b) em relação temperatura de 38 C, ficando conectado as menores eficiências com o aumento na síntese de glicerol.

Interessante correlação apresenta-se entre a produção de glicerol e o crescimento da levedura. A queda na produção de glicerol ao longo dos ciclos, que ocorre em todos os tratamentos é acompanhada pelo do crescimento nas temperaturas 27 e 33 C. Com a temperatura mais alta (38 C) ocorre uma relação inversa (Figura 35c). Incrementos na temperatura diminuem o crescimento e conseqüentemente a formação de glicerol, resultando em maior eficiência fermentativa.

A viabilidade celular cai, ao longo dos ciclos, bem como o aumento das temperaturas, tendência idêntica aos dos teores de trealose (Figuras 36a e b).

Uma estreita correlação ocorreu entre a contaminação bacteriana com os ácidos lático e acético. A contaminação bacteriana aumentou ao longo dos ciclos bem como o aumento da temperatura, semelhança dos teores dos ácidos lático e acético (Figuras 36c e 37b e c).

O pH final dos vinhos tendeu a aumentar ao longo dos ciclos (Figura 38), para as temperaturas inferiores (27 a 33 C), mas tendem a cair na temperatura maior (38 C), provavelmente por ter ocorrido maior contaminação e consequente maior excreção dos ácidos lático e acético. O ácido succínico caiu ao longo dos ciclos, independentemente da temperatura (Figura 37a). Cerca de 2% do açúcar foi desviado para síntese deste ácido, que respondeu pela formação do glicerol acoplado na amplitude de 25%. A formação de glicerol desviou 5,5% do açúcar.

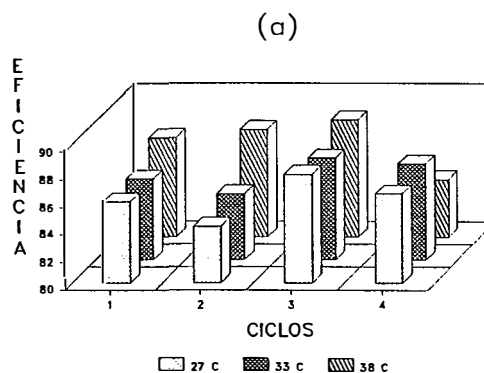
A evolução da fermentação foi maior com o aumento da temperatura, porém diminuiu ao longo dos ciclos na temperatura mais elevada (Tabela 38, apêndice), pois a viabilidade foi diminuindo neste tratamento.

A partir dos resultados obtidos, percebe-se os efeitos negativos da alta temperatura. Provavelmente, a aceleração do consumo de substrato, propiciada pela ativação metabólica determinada pelo aumento da temperatura, levou a uma maior toxidez pelo etanol, que nessas condições, pode acumular-se internamente no início da fermentação (D'AMORE *et alii*, 1986)

Os distúrbios foram percebidos com a queda na viabilidade, e consequente diminuição do crescimento. Como o parâmetro crescimento é determinado indiretamente pelas diferenças de peso no transcorrer da fermentação, quando este diminui ocorre autólise de células. O suco celular é liberado no meio fermentativo, cujo pH e poder tamponante aumentam o pH do vinho. Com o pH favorável e acrescido de nutrientes do suco celular da levedura, o meio externo torna-se um meio de cultivo favorável proliferação bacteriana. Da atividade metabólica das bactérias são excretados os ácidos lático e acético, este em efeito sinérgico com o etanol, (PAMPULHA & LOUREIRO, 1989), exacerba ainda mais o mecanismo de toxidez pelo etanol, conhecido por acelerar a morte térmica (LEÃO & van UDEN, 1982).

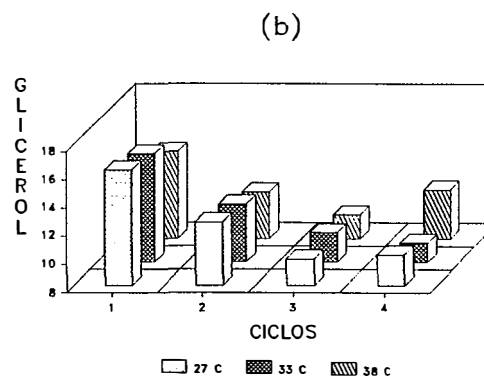
Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Treat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|---------------------|------|----|----|---------------------|------|----|----|
| 38 C | 86.9 | a | A | 3 | 87.9 | a | A |
| 33 C | 86.2 | ab | A | 1 | 86.3 | b | B |
| 27 C | 86.0 | b | A | 4 | 85.8 | b | B |
| | | | | 2 | 85.5 | b | B |
| C.V. = 0.490% | | | | C.V. = 0.899% | | | |
| D.M.S. 5% = 0.68167 | | | | D.M.S. 5% = 0.98897 | | | |
| D.M.S. 1% = 0.87490 | | | | D.M.S. 1% = 1.08875 | | | |



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Treat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|---------------------|------|----|----|---------------------|------|----|----|
| 27 C | 12.2 | a | A | 1 | 15.4 | a | A |
| 33 C | 11.8 | b | B | 2 | 12.0 | b | B |
| 38 C | 11.6 | b | B | 4 | 10.3 | c | C |
| | | | | 3 | 9.8 | d | D |
| C.V. = 1.691% | | | | C.V. = 2.266% | | | |
| D.M.S. 5% = 0.23695 | | | | D.M.S. 5% = 0.30206 | | | |
| D.M.S. 1% = 0.30412 | | | | D.M.S. 1% = 0.37845 | | | |



Teste de Tukey para as medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Treat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|--------|------|----|----|-------|------|----|----|
| 27 C | 15.8 | a | A | 2 | 14.5 | a | A |
| 33 C | 14.8 | b | B | 3 | 14.5 | a | A |
| 38 C | 12.7 | c | C | 4 | 14.4 | ab | AB |
| | | | | 1 | 14.3 | b | B |

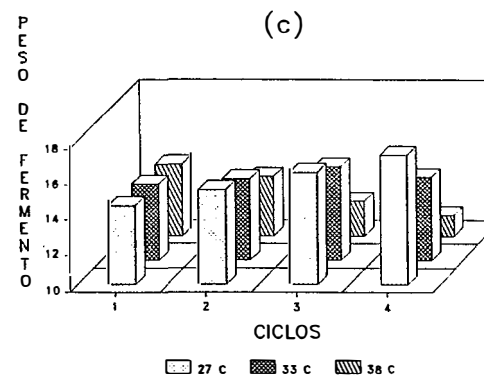


Figura 35. Efeito de diferentes temperaturas de incubação (27; 33 e 38°C) em meio semi-sintético, ao longo de quatro ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros:

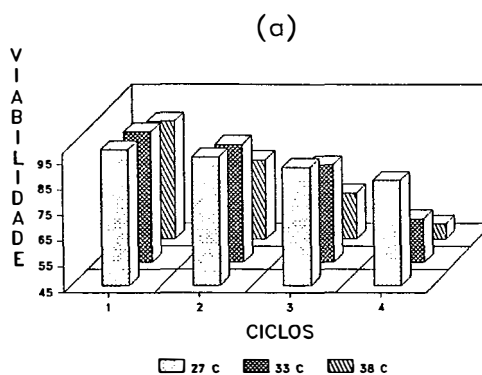
- (a) Eficiência fermentativa;**
- (b) Formação de glicerol (g/100g Etanol);**
- (c) Peso de fermento (g);**

À esquerda de cada gráfico encontram-se as respectivas significâncias estatísticas.

Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|------|----|----|-------|------|----|----|
| 27 C | 92.7 | a | A | 1 | 94.9 | a | A |
| 33 C | 83.0 | b | B | 2 | 87.4 | b | B |
| 38 C | 70.2 | c | C | 3 | 79.2 | c | C |
| | | | | 4 | 66.4 | d | D |

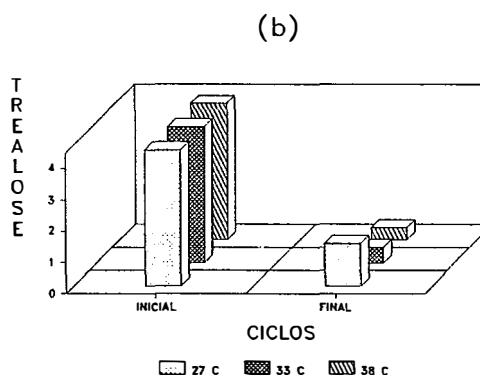
C.V. = 3.047% C.V. = 4.976%
D.M.S. 5% = 3.518131 D.M.S. 5% = 4.56537
D.M.S. 1% = 4.59653 D.M.S. 1% = 5.71997



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|------|----|----|---------|------|----|----|
| 27 C | 2.87 | a | A | INICIAL | 4.37 | a | A |
| 33 C | 2.44 | b | B | FINAL | 0.76 | b | B |
| 38 C | 2.38 | b | B | | | | |

C.V. = 7.411% C.V. = 7.979%
D.M.S. 5% = 0.28591 D.M.S. 5% = 0.18912
D.M.S. 1% = 0.39304 D.M.S. 1% = 0.27186



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|------|----|----|-------|------|----|----|
| 38 C | 5.42 | a | A | 3 | 5.60 | a | A |
| 33 C | 4.53 | b | B | 4 | 5.07 | ab | AB |
| 27 C | 4.06 | b | B | 1 | 4.27 | bc | BC |
| | | | | 2 | 3.74 | c | C |

C.V. = 7.603% C.V. = 16.416%
D.M.S. 5% = 0.67340 D.M.S. 5% = 0.85843
D.M.S. 1% = 0.86429 D.M.S. 1% = 1.07553

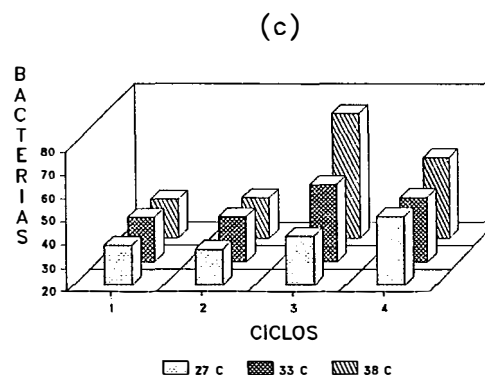


Figura 36. Efeito de diferentes temperaturas de incubação (27; 33 e 38°C) em meio semi-sintético ao longo de quatro ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros:

(a) Viabilidade celular (%);

(b) Teor de trealose na célula (% MS) antes de iniciar a fermentação e ao final do último ciclo;

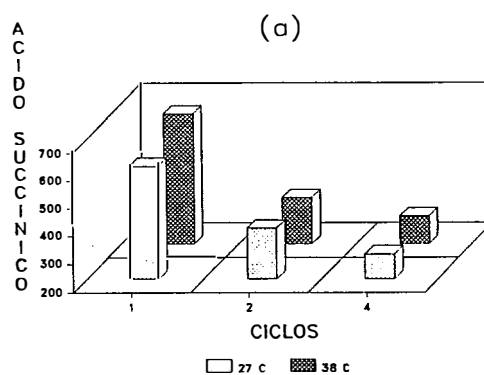
(c) Contaminação bacteriana (nº de bactérias x 10⁻⁶/ml vinho);

À esquerda de cada gráfico encontram-se as respectivas significâncias estatísticas.

Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|-----|----|----|-------|-----|----|----|
| 38 C | 428 | a | A | 1 | 638 | a | A |
| 27 C | 426 | a | A | 2 | 374 | b | B |
| | | | | 4 | 269 | c | C |

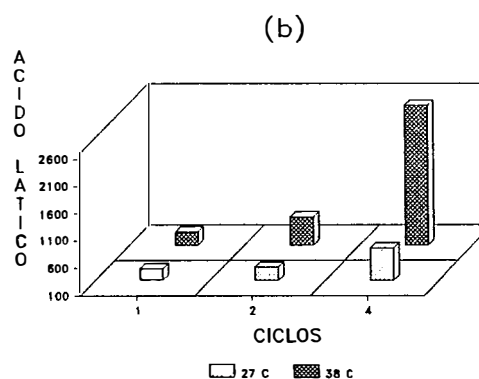
C.V. = 7.173% C.V. = 8.294%
D.M.S. 5% = 31.50768 D.M.S. 5% = 47.23379
D.M.S. 1% = 44.19260 D.M.S. 1% = 63.27072



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|------|----|----|-------|------|----|----|
| 38 C | 1207 | a | A | 4 | 1681 | a | A |
| 27 C | 447 | b | B | 2 | 478 | b | B |
| | | | | 1 | 323 | c | C |

C.V. = 4.118% C.V. = 6.856%
D.M.S. 5% = 50.45530 D.M.S. 5% = 75.63852
D.M.S. 1% = 70.76847 D.M.S. 1% = 101.31950



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|-----|----|----|-------|------|----|----|
| 38 C | 797 | a | A | 4 | 1085 | a | A |
| 27 C | 497 | b | B | 2 | 494 | b | B |
| | | | | 1 | 363 | c | C |

C.V. = 3.204% C.V. = 4.689%
D.M.S. 5% = 27.00982 D.M.S. 5% = 40.49095
D.M.S. 1% = 37.88391 D.M.S. 1% = 54.23854

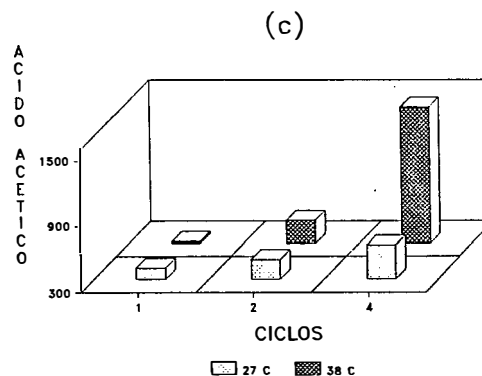


Figura 37. Efeito de diferentes temperaturas de incubação (27 e 38°C) em meio semi-sintético, em três dos quatro ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros:

(a) Formação de ácido succínico (mg/l vinho);

(b) Formação de ácido láctico (mg/l vinho);

(c) Formação de ácido acético (mg/l vinho).

À esquerda de cada gráfico encontram-se as respectivas significâncias estatísticas.

Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|------|----|----|-------|------|----|----|
| 38 C | 3.95 | a | A | 3 | 3.92 | a | A |
| 33 C | 3.86 | b | B | 2 | 3.89 | b | B |
| 27 C | 3.79 | c | C | 4 | 3.83 | c | C |
| | | | | 1 | 3.80 | d | D |

C.V. = 0.313%

D.M.S. 5% = 0.01544

D.M.S. 1% = 0.01982

C.V. = 0.455%

D.M.S. 5% = 0.01969

D.M.S. 1% = 0.02467

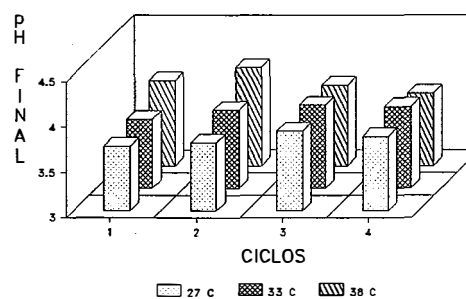


Figura 38. Efeito de diferentes temperaturas de incubação (27; 33 e 38°C) em meio semi-sintético, e ao longo de quatro ciclos fermentativos, sobre os valores de pH do vinho.

À esquerda do gráfico encontram-se as significâncias estatísticas.

4.3.7. Efeito de diferentes concentrações de inóculo

As diferentes concentrações de levedura inoculadas para fermentação (6, 11 e 16%, peso úmido), afetaram a eficiência fermentativa, principalmente nos ciclos iniciais, estabilizando após o terceiro ciclo. Nos três primeiros ciclos, a eficiência é menor com a menor concentração de inóculo (Figura 39a). A evolução da fermentação foi maior com o aumento do inóculo (Tabela 43, apêndice).

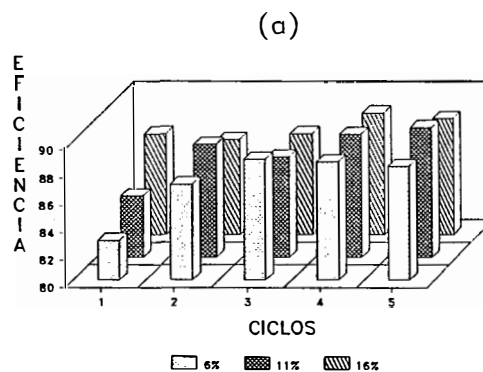
O glicerol decaiu ao longo dos ciclos, à medida em que a eficiência aumentou (Figura 39b), mas não variou significativamente com os tratamentos. Obviamente os pesos de fermento diferenciaram entre os tratamentos, posto que começaram com valores diferentes (Figura 39c). O aumento da biomassa ocorreu nos três tratamentos, ao longo dos ciclos, mas o maior incremento foi com a menor concentração de inóculo (6%) e o menor com a maior concentração (16%). Isto corrobora a constatação que altas concentrações iniciais de células ocasionam menor crescimento (NAGODAWITHANA *et alii*, 1974 e STREHAIANO *et alii*, 1983.)

A viabilidade foi maior nos tratamentos com as maiores concentrações de inóculo, enquanto caiu, ao longo dos ciclos, em todos os tratamentos, porém, mais acentuadamente no inóculo menor (Figura 40a). Ao que parece, o aumento da concentração de inóculo diminuiu o efeito prejudicial e estressante da fermentação, atribuído à toxidez pelo etanol. Segundo VEGA *et alii* (1987) altas concentrações de inóculo diminuem a inibição da fermentação causada pelo etanol, que sugeriram que essa variável fosse incluída nos estudos cinéticos de inibição pelo etanol, substituindo o cálculo da sua concentração intracelular. Interessante é que os três tratamentos permitiram acúmulo de trealose em relação ao início do ensaio, mas o acúmulo foi maior com o inóculo de 6%, a um nível de 5% de probabilidade.

Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|------|----|----|-------|------|----|----|
| 16% | 87.7 | a | A | 4 | 88.8 | a | A |
| 11% | 87.6 | a | A | 5 | 88.7 | a | AB |
| 6% | 87.1 | a | A | 3 | 87.7 | ab | AB |
| | | | | 2 | 87.3 | b | B |
| | | | | 1 | 84.9 | c | C |

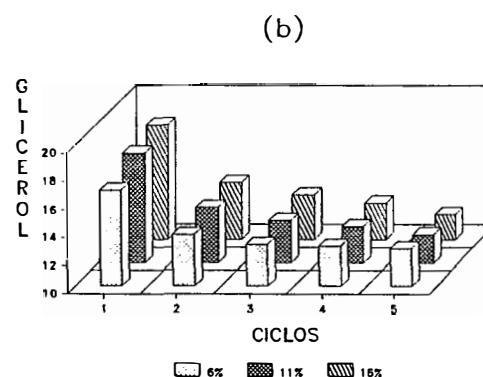
C.V. = 0.771% C.V. = 1.079%
D.M.S. 5% = 0.73057 D.M.S. 5% = 1.10780
D.M.S. 1% = 0.93031 D.M.S. 1% = 1.35695



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|------|----|----|-------|------|----|----|
| 16% | 13.9 | a | A | 1 | 17.6 | a | A |
| 11% | 13.8 | a | A | 2 | 13.8 | b | B |
| 6% | 13.8 | a | A | 3 | 13.1 | c | C |
| | | | | 4 | 12.6 | c | CD |
| | | | | 5 | 12.1 | d | D |

C.V. = 1.763% C.V. = 3.018%
D.M.S. 5% = 0.32436 D.M.S. 5% = 0.49184
D.M.S. 1% = 0.41304 D.M.S. 1% = 0.60246



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|------|----|----|-------|------|----|----|
| 16% | 22.2 | a | A | 5 | 16.6 | a | A |
| 11% | 15.8 | b | B | 4 | 16.3 | b | A |
| 6% | 9.4 | c | C | 3 | 15.8 | c | B |
| | | | | 2 | 15.4 | d | C |
| | | | | 1 | 14.7 | e | D |

C.V. = 1.875% C.V. = 1.809%
D.M.S. 5% = 0.22124 D.M.S. 5% = 0.33548
D.M.S. 1% = 0.28173 D.M.S. 1% = 0.41093

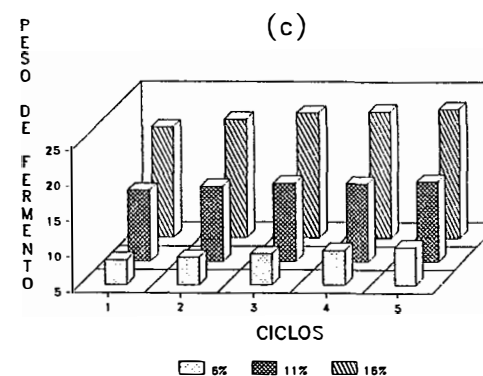


Figura 39. Efeito de diferentes concentrações de inóculo (6, 11 e 16% em peso úmido) em meio de melação, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros:

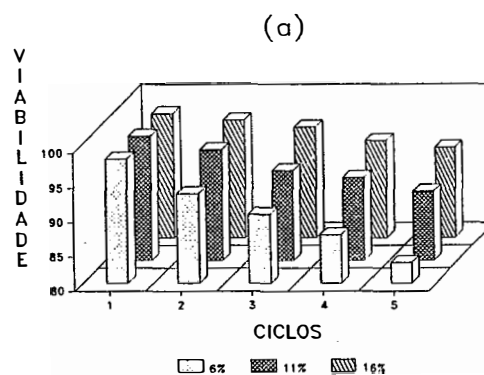
- (a) Eficiência fermentativa;**
- (b) Formação de glicerol (g/100g Etanol);**
- (c) Peso de fermento (g);**

À esquerda de cada gráfico encontram-se as respectivas significâncias estatísticas.

Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|------|----|----|-------|------|----|----|
| 16% | 95.6 | a | A | 1 | 98.4 | a | A |
| 11% | 94.3 | b | A | 2 | 95.6 | b | B |
| 6% | 90.5 | c | B | 3 | 93.2 | c | C |
| | | | | 4 | 91.2 | d | C |
| | | | | 5 | 89.0 | e | D |

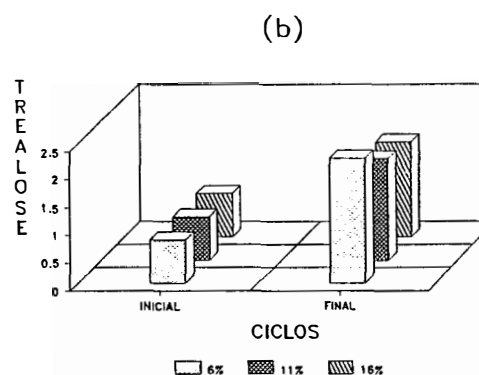
C.V. = 0.761% C.V. = 1.546%
D.M.S. 5% = 1.11829 D.M.S. 5% = 1.69574
D.M.S. 1% = 1.42405 D.M.S. 1% = 2.07711



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao nao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|------|----|----|---------|------|----|----|
| 6% | 2.25 | a | A | FINAL | 1.93 | a | A |
| 11% | 1.83 | ab | A | INICIAL | 0.83 | b | B |
| 16% | 1.70 | b | A | | | | |

C.V. = 19.050% C.V. = 24.648%
D.M.S. 5% = 0.47516 D.M.S. 5% = 0.31430
D.M.S. 1% = 0.65320 D.M.S. 1% = 0.45181



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|------|----|----|-------|------|----|----|
| 6% | 2.65 | a | A | 5 | 2.82 | a | A |
| 16% | 1.84 | b | B | 4 | 2.71 | a | A |
| 11% | 1.75 | b | B | 3 | 2.18 | b | B |
| | | | | 1 | 1.47 | c | C |
| | | | | 2 | 1.22 | d | D |

C.V. = 3.787% C.V. = 7.351%
D.M.S. 5% = 0.11839 D.M.S. 5% = 0.17952
D.M.S. 1% = 0.15076 D.M.S. 1% = 0.21990

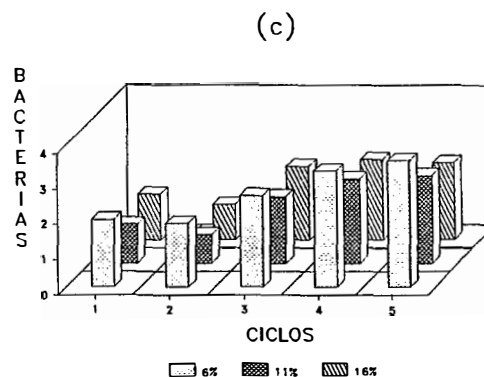


Figura 40. Efeito de diferentes concentrações de inóculo (6, 11 e 16% em peso úmido) em meio de melão, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros:

(a) Viabilidade celular (%);

(b) Teor de trealose na célula (% M.S.) antes de iniciar a fermentação e ao final do último ciclo;

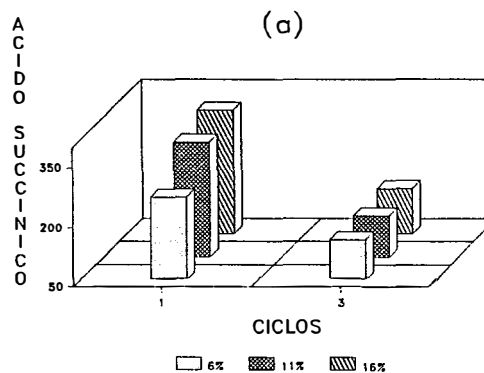
(c) Contaminação bacteriana (nº de bactérias x 10⁻⁶/ml vinho);

À esquerda de cada gráfico encontram-se as respectivas significâncias estatísticas.

Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|-----|----|----|-------|-----|----|----|
| 16% | 263 | a | A | 1 | 319 | a | A |
| 11% | 236 | b | A | 3 | 150 | b | B |
| 6% | 205 | c | B | | | | |

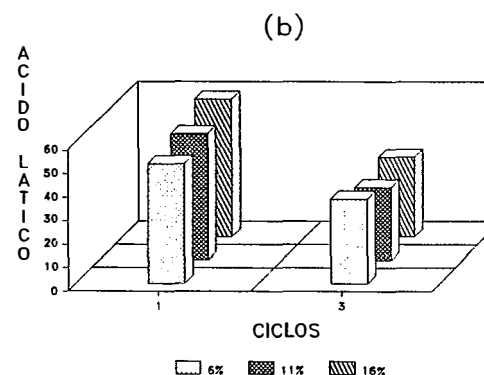
C.V. = 8.851% C.V. = 6.731%
D.M.S. 5% = 22.07810 D.M.S. 5% = 14.60391
D.M.S. 1% = 30.35041 D.M.S. 1% = 20.99312



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao nao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|------|----|----|-------|------|----|----|
| 16% | 46.5 | a | A | 1 | 54.7 | a | A |
| 6% | 43.5 | a | A | 3 | 33.7 | b | B |
| 11% | 42.7 | a | A | | | | |

C.V. = 19.669% C.V. = 16.658%
D.M.S. 5% = 10.29403 D.M.S. 5% = 6.80914
D.M.S. 1% = 14.15103 D.M.S. 1% = 9.78814



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao nao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|------|----|----|-------|------|----|----|
| 11% | 93.0 | a | A | 3 | 89.3 | a | A |
| 16% | 87.4 | a | A | 1 | 74.0 | b | A |
| 6% | 64.6 | b | B | | | | |

C.V. = 20.087% C.V. = 14.293%
D.M.S. 5% = 16.30123 D.M.S. 5% = 10.78270
D.M.S. 1% = 22.40903 D.M.S. 1% = 15.50013

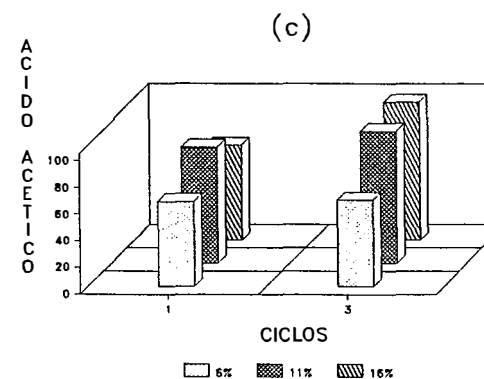


Figura 41. Efeito de diferentes concentrações de inóculo (6, 11 e 16% em peso úmido) em meio de melaço, em dois dos cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros:

(a) Formação de ácido succínico (mg/l vinho);

(b) Formação de ácido láctico (mg/l vinho);

(c) Formação de ácido acético (mg/l vinho);

À esquerda de cada gráfico encontram-se as respectivas significâncias estatísticas.

Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|------|----|----|-------|------|----|----|
| 16% | 4.04 | a | A | 5 | 4.20 | a | A |
| 11% | 4.03 | ab | AB | 4 | 4.06 | b | B |
| 6% | 4.01 | b | B | 3 | 4.03 | c | B |
| | | | | 1 | 3.97 | d | C |
| | | | | 2 | 3.86 | e | D |

C.V. = 0.482% C.V. = 0.783%
D.M.S. 5% = 0.02441 D.M.S. 5% = 0.03701
D.M.S. 1% = 0.03108 D.M.S. 1% = 0.04534

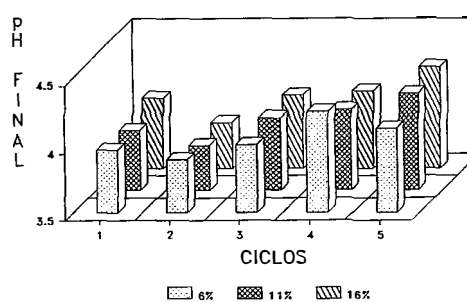


Figura 42. Efeito de diferentes concentrações de inóculo (6, 11 e 16% em peso úmido) em meio de melaço, ao longo de cinco ciclos fermentativos sobre os valores de pH do vinho.

À esquerda do gráfico encontram-se as significâncias estatísticas.

A contaminação bacteriana aumentou ao longo dos ciclos nos três tratamentos, e foi maior no tratamento com inóculo menor (Figura 40c), possivelmente devido a uma menor competição pelo substrato juntamente com as leveduras, que são mais eficientes na utilização do açúcar.

Quanto aos ácidos orgânicos, estes apresentaram comportamentos distintos. O ácido succínico, no primeiro ciclo aumentou, com o aumento da concentração de inóculo (Figura 41a), sugerindo um possível conteúdo endógeno de succinato que seria excretado no início da fermentação, conforme o sugerido por DURO & SERRANO (1981).

A excreção do ácido láctico foi maior no primeiro ciclo e menor no terceiro, indistintamente aos tratamentos (Figura 41b), embora os teores tivessem se mantido bem baixos (ao redor de 40mg/l), pois a contaminação também foi mantida baixa devido ao tratamento ácido no início da fermentação. O ácido acético foi produzido em menor quantidade pelo inóculo menor, e no terceiro ciclo, subiu, com o aumento de inóculo (Figura 41c), evidenciando a produção de ácido acético pelas leveduras. O pH do vinho tendeu a subir ao longo dos ciclos (Figura 42), sendo maior com o aumento do inóculo.

O tratamento ácido no presente ensaio foi realizado com o intuito de diminuir a contaminação bacteriana que acompanha o inóculo de leveduras. Porém, as leveduras propiciaram um efeito tamponante ao meio (SIGLER *et alii*, 1981), necessitando adicionar-se mais ácido sulfúrico para obter-se o mesmo valor de pH (2,5). Esse tratamento foi efetivo no controle bacteriano, à semelhança do efeito descrito por GALLO (1989), e também nas excreções dos ácidos orgânicos, como o láctico que manteve-se ao redor de 40mg/l, mas o ácido sulfúrico adicionado

em maiores quantidades nos tratamentos 11 e 16% provocaram uma redução no teor de trealose, se comparados ao tratamento de 6% de inóculo.

A mobilização da trealose, possivelmente foi a razão dos tratamentos com maiores porcentagens de inóculo apresentarem maiores eficiências, mas a viabilidade ainda se manteve maior nesses tratamentos, supostamente devido ao efeito protetor das altas concentrações de inóculo sobre a toxidez pelo etanol (VEGA *et alii*, 1987).

4.3.8. Efeito de diferentes leveduras

Na fermentação conduzida com as leveduras IZ-1904, Fleischmann e TA (M-300-A), a maior eficiência fermentativa foi propiciada pela levedura IZ-1904, seguida pela TA e Fleischmann. A variação durante os ciclos fermentativos foi grande, não obedecendo uma tendência definida (Figura 43a).

O glicerol aumentou ao longo dos ciclos com as três leveduras (Figura 43b) mas foi maior com IZ-1904, intermediário com Fleischmann e menor com TA (M-300-A).

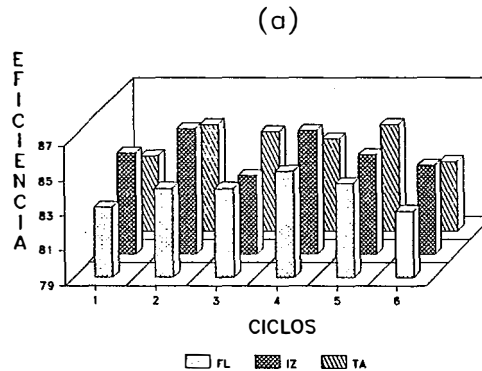
Enquanto as leveduras Fleischmann e TA (M-300-A) cresceram, ao longo dos ciclos, com a mesma intensidade, o IZ-1904, não cresceu, mantendo o mesmo peso ao longo dos ciclos (Figura 43c).

A viabilidade celular, que foi a mesma para TA (M-300-A) e Fleischmann sem variar ao longo dos ciclos, foi menor na IZ-1904, com queda na viabilidade ao longo dos ciclos (Figura 44a). Estreita correlação ocorreu entre a viabilidade e a trealose (Figura 44b). A trealose inicial da levedura TA (M-300-A) foi a maior, seguida pela Fleischmann e sensivelmente maiores que a da IZ-1904.

Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Traf. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|------|----|----|-------|------|-----|-----|
| IZ | 84.9 | a | A | 4 | 85.1 | a | A |
| TA | 84.2 | b | AB | 2 | 85.1 | ab | A |
| FL | 83.9 | b | B | 5 | 84.7 | abc | AB |
| | | | | 3 | 84.1 | bcd | ABC |
| | | | | 1 | 83.7 | cd | BC |
| | | | | 6 | 83.3 | d | C |

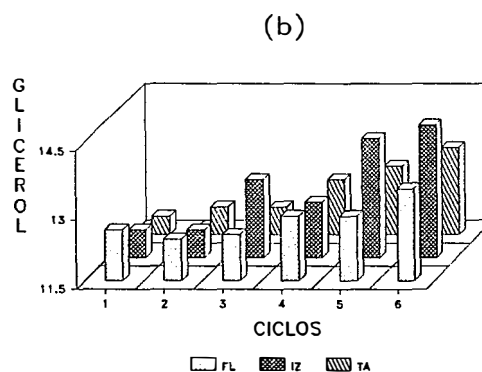
C.V. = 0.364% C.V. = 1.044%
D.M.S. 5% = 0.61690 D.M.S. 5% = 1.07146
D.M.S. 1% = 0.78191 D.M.S. 1% = 1.29211



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Traf. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|------|----|----|-------|------|----|----|
| IZ | 13.1 | a | A | 6 | 13.7 | a | A |
| FL | 12.8 | b | B | 5 | 13.3 | b | B |
| TA | 12.5 | c | C | 4 | 12.8 | c | C |
| | | | | 3 | 12.5 | d | C |
| | | | | 2 | 12.2 | e | D |
| | | | | 1 | 12.2 | e | D |

C.V. = 0.528% C.V. = 1.259%
D.M.S. 5% = 0.11302 D.M.S. 5% = 0.19629
D.M.S. 1% = 0.14325 D.M.S. 1% = 0.23671



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Traf. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|------|----|----|-------|------|-----|-----|
| TA | 13.8 | a | A | 6 | 12.7 | a | A |
| FL | 12.7 | a | A | 5 | 12.4 | ab | AB |
| IZ | 9.6 | b | B | 4 | 11.8 | bc | ABC |
| | | | | 3 | 11.6 | bcd | BC |
| | | | | 2 | 11.2 | cd | C |
| | | | | 1 | 11.0 | d | C |

C.V. = 1.939% C.V. = 5.442%
D.M.S. 5% = 0.45085 D.M.S. 5% = 0.78305
D.M.S. 1% = 0.57144 D.M.S. 1% = 0.94431

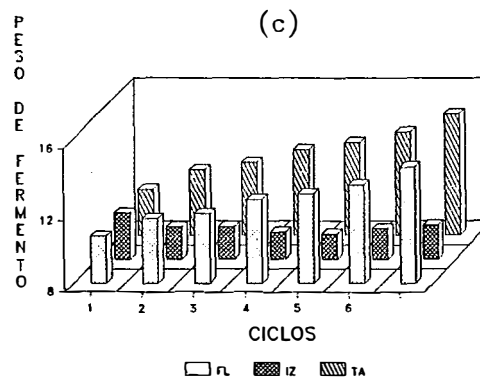


Figura 43. Efeito de diferentes leveduras [Fleischmann, IZ-1904 e TA (M-300-A)] inoculadas em meio de melaço, ao longo de seis ciclos fermentativos sobre os seguintes parâmetros:

- (a) Eficiência fermentativa;**
- (b) Formação de glicerol (g/100g Etanol);**
- (c) Peso de fermento (g);**

À esquerda de cada gráfico encontram-se as respectivas significâncias estatísticas.

Com as três leveduras houve acúmulo da trealose, porém mínimo no IZ-1904 e significativamente maiores com TA (M-300-A) e Fleischmann.

A deficiência na biossíntese de trealose traduz a incapacidade de manutenção da viabilidade nas condições extressantes da fermentação alcoólica, e isso é evidenciado com a levedura IZ-1904. A menor síntese de trealose por essa levedura já havia sido descrita por GUTIERREZ (1989) e (1990) e por DELGADO (1993). Talvez a explicação para tal fragilidade, resida no fato desta levedura pertencer à classe das atuais *S. cerevisiae (uvarum)*, sendo *S. uvarum* anteriormente descrita como levedura de cervejaria (WHITING, 1986), pouco tolerante às condições adversas do ambiente industrial conforme relatado por JONES *et alii* (1981).

A produção de ácido succínico não variou entre as leveduras estudadas e não teve tendência definida ao longo dos ciclos (Figura 45a), sendo difícil correlacioná-lo ao glicerol.

O ácido acético é formado em maior quantidade pelas leveduras IZ-1904, seguida pela TA (M-300-A) e Fleischmann (Figura 45c). No quinto ciclo, há um aumento na síntese de acetato pelas leveduras TA(M-300-A) e Fleischmann, inexplicável, diante dos demais parâmetros em questão.

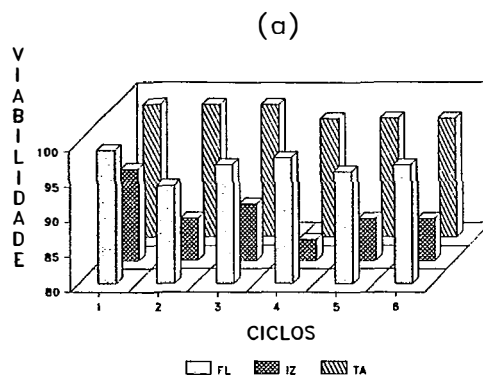
O pH final dos vinhos foi maior para a IZ-1904, seguidos pelos valores da TA (M-300-A) e da Fleischmann (Figura 46), possivelmente pelo efeito da maior autólise decorrente da queda de viabilidade que ocorreu com a IZ-1904.

A contaminação bacteriana não se diferenciou em nenhum dos tratamentos (Figura 45c), bem como a produção de ácido lático, que não teve alterações significativas.

Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao nao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|------|----|----|-------|------|----|----|
| TA | 98.2 | a | A | 1 | 97.1 | a | A |
| FL | 97.2 | a | A | 3 | 94.7 | ab | A |
| IZ | 85.8 | b | B | 6 | 93.8 | ab | A |
| | | | | 5 | 93.6 | ab | A |
| | | | | 4 | 92.9 | ab | A |
| | | | | 2 | 90.2 | b | A |

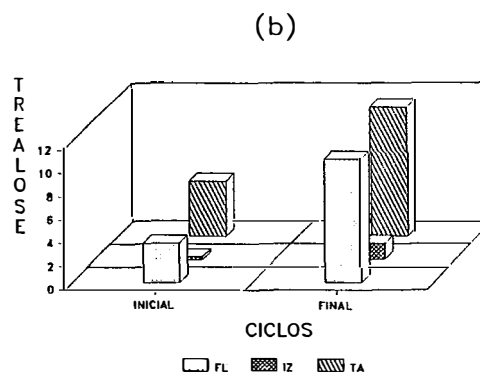
C.V. = 1.689% C.V. = 5.620%
D.M.S. 5% = 3.68921 D.M.S. 5% = 6.40759
D.M.S. 1% = 4.67605 D.M.S. 1% = 7.72713



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|------|----|----|---------|------|----|----|
| TA | 7.96 | a | A | FINAL | 7.73 | a | A |
| FL | 7.03 | b | B | INICIAL | 2.80 | b | B |
| IZ | 0.81 | c | C | | | | |

C.V. = 1.766% C.V. = 2.498%
D.M.S. 5% = 0.18383 D.M.S. 5% = 0.12159
D.M.S. 1% = 0.25270 D.M.S. 1% = 1.17479



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao nao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|------|----|----|-------|------|----|----|
| TA | 3.59 | a | A | 2 | 3.97 | a | A |
| IZ | 3.27 | a | A | 6 | 3.97 | a | A |
| FL | 2.55 | a | A | 1 | 3.43 | a | A |
| | | | | 5 | 2.72 | a | A |
| | | | | 4 | 2.54 | a | A |
| | | | | 3 | 2.19 | a | A |

C.V. = 24.211% C.V. = 59.020%
D.M.S. 5% = 1.29736 D.M.S. 5% = 2.25331
D.M.S. 1% = 1.64440 D.M.S. 1% = 2.71735

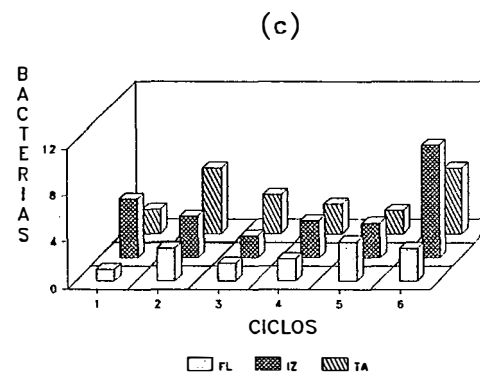
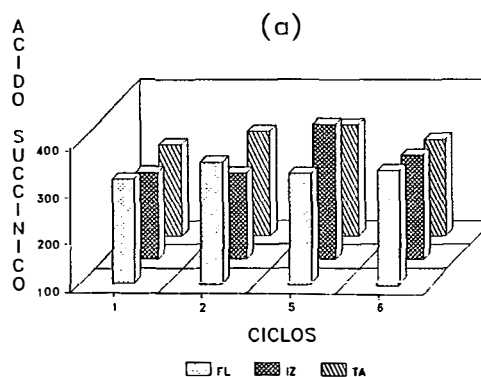


Figura 44. Efeito de diferentes leveduras [Fleischmann, IZ-1904 e TA (M-300-A)] inoculadas em meio de meloço, ao longo de seis ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros;
(a) Viabilidade celular (%);
(b) Teor de trealose na célula (% M.S.) antes de iniciar a fermentação e ao final do último ciclo;
(c) Contaminação bacterinana (nº de bactérias x 10⁻⁶/ml vinho);
 À esquerda de cada gráfico encontram-se as respectivas significâncias estatísticas.

Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|-----|----|----|-------|-----|----|----|
| IZ | 331 | a | A | 5 | 352 | a | A |
| FL | 330 | a | A | 6 | 322 | b | AB |
| TA | 312 | a | A | 1 | 299 | b | B |

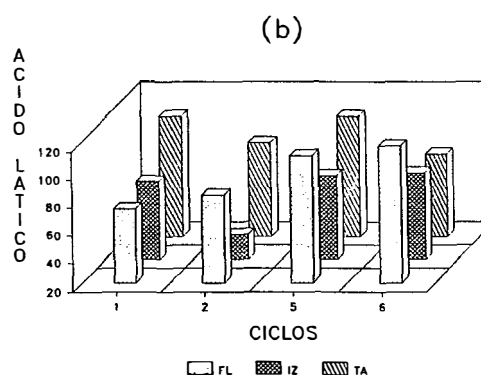
C.V. = 6.893% C.V. = 7.792%
D.M.S. 5% = 26.36543 D.M.S. 5% = 26.36543
D.M.S. 1% = 34.32618 D.M.S. 1% = 34.36543



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|-----|----|----|-------|------|----|----|
| FL | 100 | a | A | 5 | 99.1 | a | A |
| TA | 96 | ab | A | 6 | 92.2 | a | A |
| IZ | 79 | b | A | 1 | 85.0 | a | A |

C.V. = 9.130% C.V. = 20.742%
D.M.S. 5% = 19.92199 D.M.S. 5% = 19.92199
D.M.S. 1% = 25.93722 D.M.S. 1% = 25.93722



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|-----|----|----|-------|-----|----|----|
| FL | 396 | a | A | 5 | 480 | a | A |
| TA | 320 | b | B | 6 | 275 | b | B |
| IZ | 198 | c | C | 1 | 158 | c | C |

C.V. = 6.312% C.V. = 12.840%
D.M.S. 5% = 40.78126 D.M.S. 5% = 40.78126
D.M.S. 1% = 53.09471 D.M.S. 1% = 53.09471

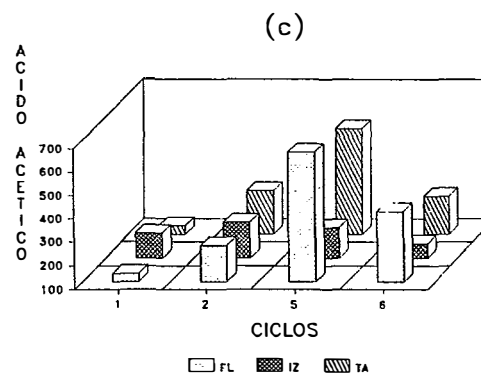


Figura 45. Efeito de diferentes leveduras [Fleischmann, IZ-1904, e TA (M-300-A)] inoculadas em meio de meloço, em quatro dos seis ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros:

(a) Formação de ácido succínico (mg/l vinho);

(b) Formação de ácido láctico (mg/l vinho);

(c) Formação de ácido acético (mg/l vinho);

À esquerda de cada gráfico encontram-se as respectivas significâncias estatísticas.

Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|-------|------|----|----|-------|------|----|----|
| IZ | 4.52 | a | A | 6 | 4.53 | a | A |
| TA | 4.34 | b | B | 5 | 4.41 | b | B |
| FL | 4.32 | c | C | 3 | 4.37 | c | C |
| | | | | 4 | 4.36 | cd | CD |
| | | | | 1 | 4.35 | de | DE |
| | | | | 2 | 4.34 | e | E |

C.V. = 0.200% C.V. = 0.339%
D.M.S. 5% = 0.01043 D.M.S. 5% = 0.01811
D.M.S. 1% = 0.01322 D.M.S. 1% = 0.02184

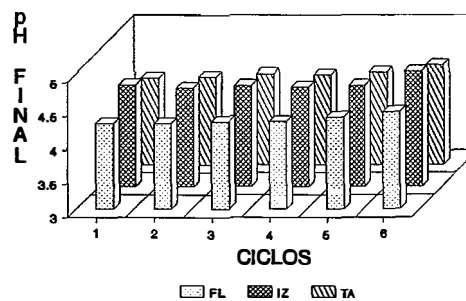


Figura 46. Efeito de diferentes leveduras [Fleischmann, IZ-1904 e TA (M-300-A)] inoculadas em meio de meloço, ao longo de seis ciclos fermentativos, sobre os valores do pH do vinho.

À esquerda do gráfico encontram-se as significâncias estatísticas.

A análise estequiométrica demonstrou não ter havido diferenças nas conversões de açúcar para o glicerol entre os tratamentos, onde foram desviados cerca de 5% do açúcar para sua produção, nem para a produção de ácido succínico, que desviou 1,5% do açúcar para sua síntese, sendo este responsável por cerca de 17% do glicerol acoplado. Esta relação denotou uma certa correspondência metabólica entre as três leveduras.

Pode-se depreender do presente ensaio que a levedura IZ-1904 não consegue manter sua viabilidade, conquanto seu teor de trealose, que inicialmente já é baixo, exaure-se durante a fermentação. Motivo pelo qual esta levedura apresenta maiores eficiências, às custas da própria biomassa. Não ficou evidenciado alterações de comportamento entre as leveduras TA (M-300-A) e Fleischmann.

4.3.9. Efeito da contaminação bacteriana

A contaminação bacteriana deliberada provocou sensível queda na eficiência fermentativa, cujo efeito foi revertido pela adição de antibióticos (Figura 47a). A queda na eficiência conectou-se com maior produção de glicerol (Figura 47 b).

O crescimento tendeu a aumentar ao longo dos ciclos, cuja tendência foi menos acentuada no tratamento com meio contaminado (Figura 47c). Ao contrário do crescimento, a viabilidade caiu ao longo dos ciclos e embora tivesse uma tendência de ser menor no meio contaminado; essa tendência não foi significativa a nível de 5% de probabilidade (Figura 48a). O teor de trealose final foi aumentado em relação ao inicial, em todos os tratamentos, porém foi maior no tratamento contaminado (Figura 48b).

Note-se que o aumento da contaminação, foi ligeiramente reduzido nos dois primeiros ciclos com adição de penicilina (10mg/l) e virginiamicina (10mg/l), doses estas, maiores que as recomendadas (Figura 49c). Mas a adição de cloranfenicol (100mg/l) foi efetiva para o controle das bactérias. O cloranfenicol, que inibe a síntese dos ribossomos procarióticos 70S e mitocondriais, sem afetar a síntese extra-mitocondrial nos eucariotos (LEHNINGER, 1984), não afetou o metabolismo da levedura, posto que não alterou as tendências da produção de glicerol, da eficiência fermentativa, do crescimento, da viabilidade, trealose e ácido succínico.

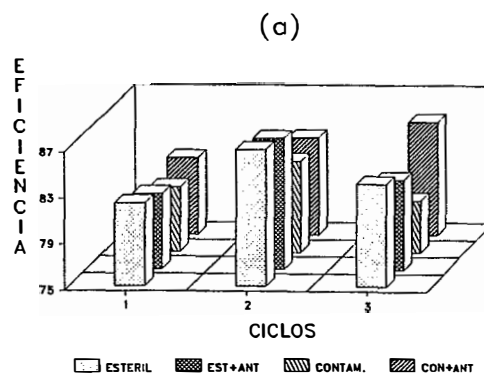
Assim, depreende-se que a presença do cloranfenicol, que induziria a inibição mitocondrial, proporcionando uma deficiência respiratória e utilização anaeróbica do substrato, não propiciou comportamento diferenciado, em relação à hipoxia induzida pela alta concentração de açúcar.

A determinação dos ácidos orgânicos formados nos meios contaminados revestiu-se de uma certa dificuldade, devido ao fato de ter havido uma intensa síntese de ácido oxaloacético por parte das bactérias. O ácido oxaloacético decompôs-se na coluna, semelhante ao descrito por BELLS *et alii* (1991). Com a descarboxilação ocasionada, o gás carbônico formou bolhas na coluna, percebidas pela desestabilização da linha base nos cromatogramas; mediante diluições e repetidas injeções, esse problema foi contornado. O ácido succínico teve sua produção diminuída ao longo dos ciclos, em todos os tratamentos (Figura 49a). No entanto, a presença de antibióticos no meio esterilizado estimulou sua maior síntese, que não proporcionou aumento na produção de glicerol.

Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|---------|------|----|----|-------|------|----|----|
| ESTERIL | 84.2 | a | A | 2 | 84.8 | a | A |
| EST+ANT | 83.6 | ab | A | 3 | 82.7 | b | B |
| CON+ANT | 83.3 | b | A | 1 | 81.5 | c | C |
| CONTAM. | 81.0 | c | B | | | | |

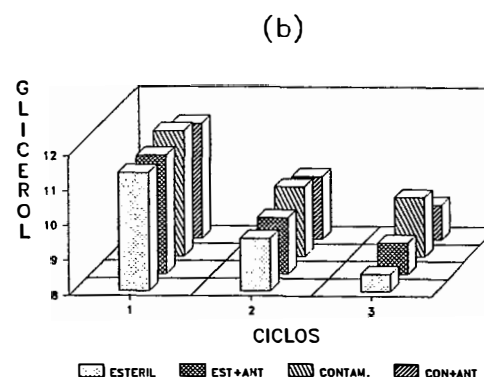
C.V. = 0.436% C.V. = 0.669%
D.M.S. 5% = 0.75059 D.M.S. 5% = 0.58583
D.M.S. 1% = 0.96187 D.M.S. 1% = 0.76880



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|---------|------|----|----|-------|------|----|----|
| CONTAM | 10.4 | a | A | 1 | 11.4 | a | A |
| CON+ANT | 10.0 | b | B | 2 | 9.7 | b | B |
| EST+ANT | 9.9 | bc | B | 3 | 9.0 | c | C |
| ESTERIL | 9.8 | c | B | | | | |

C.V. = 1.447% C.V. = 1.356%
D.M.S. 5% = 0.18417 D.M.S. 5% = 0.14374
D.M.S. 1% = 0.23601 D.M.S. 1% = 0.18864



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao nao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|---------|------|----|----|-------|------|----|----|
| ESTERIL | 13.3 | a | A | 3 | 13.4 | a | A |
| EST+ANT | 13.2 | a | A | 2 | 12.9 | b | B |
| CONTAM. | 12.6 | b | B | 1 | 12.4 | c | C |
| CON+ANT | 12.5 | b | B | | | | |

C.V. = 0.320% C.V. = 0.593%
D.M.S. 5% = 0.10368 D.M.S. 5% = 0.08092
D.M.S. 1% = 0.13287 D.M.S. 1% = 0.10620

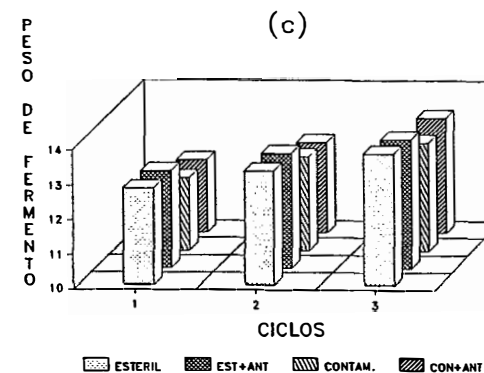


Figura 47. Efeito da contaminação bacteriana em meio semi-sintético (estéril; estéril + antibiótico; contaminado e contaminado + antibiótico), ao longo de três ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros:

(a) Eficiência fermentativa;

(b) Formação de glicerol (g/100g Etanol);

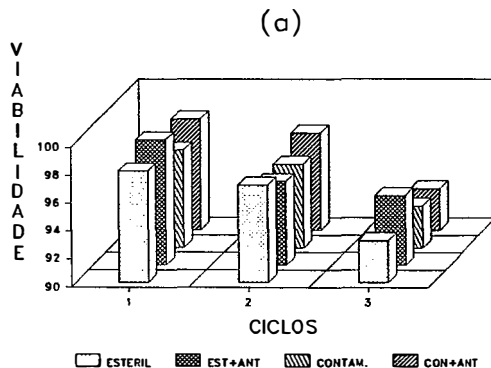
(c) Peso de fermento (g);

À esquerda de cada gráfico encontram-se as respectivas significâncias estatísticas.

Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao nao foi significativa.

| Tra. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|---------|------|----|----|-------|------|----|----|
| EST+ANT | 96.4 | a | A | 1 | 98.1 | a | A |
| CON+ANT | 96.1 | a | A | 2 | 96.1 | b | B |
| ESTERIL | 95.8 | a | A | 3 | 93.7 | c | C |
| CONTAM | 95.6 | a | A | | | | |

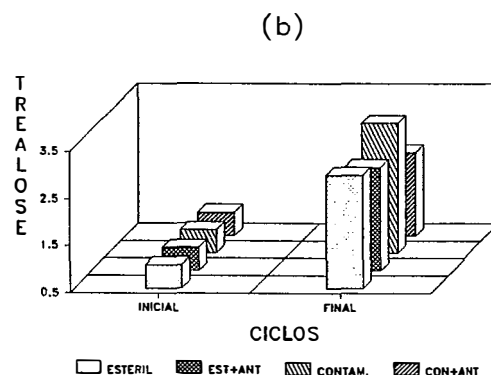
C.V. = 0.837% C.V. = 1.259%
D.M.S. 5% = 1.63168 D.M.S. 5% = 1.27351
D.M.S. 1% = 2.09096 D.M.S. 1% = 1.67126



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao nao foi significativa.

| Tra. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|---------|------|----|----|---------|------|----|----|
| CONTAM | 3.29 | a | A | FINAL | 2.80 | a | A |
| ESTERIL | 2.92 | ab | A | INICIAL | 1.00 | b | B |
| EST+ANT | 2.70 | ab | A | | | | |
| CON+ANT | 2.28 | b | B | | | | |

C.V. = 13.287% C.V. = 19.442%
D.M.S. 5% = 0.68316 D.M.S. 5% = 0.34764
D.M.S. 1% = 0.93501 D.M.S. 1% = 0.50653



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Tra. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|---------|------|----|----|-------|-----|----|----|
| CONTAM. | 511 | a | A | 2 | 251 | a | A |
| CON+ANT | 298 | b | B | 1 | 226 | a | A |
| ESTERIL | 16.1 | c | C | 3 | 146 | b | B |
| EST+ANT | 7.4 | c | C | | | | |

C.V. = 11.419% C.V. = 21.788%
D.M.S. 5% = 61.29252 D.M.S. 5% = 47.83833
D.M.S. 1% = 78.54523 D.M.S. 1% = 62.77961

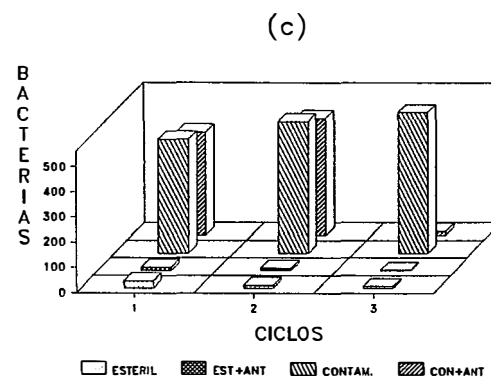


Figura 48. Efeito da contaminação bacteriana em meio semi-sintético (estéril; estéril + antibiótico; contaminado e contaminado + antibiótico), ao longo de três ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros;

(a) Viabilidade celular (%);

(b) Teor de trealose na célula (% M.S.) antes de iniciar a fermentação e ao final do último ciclo;

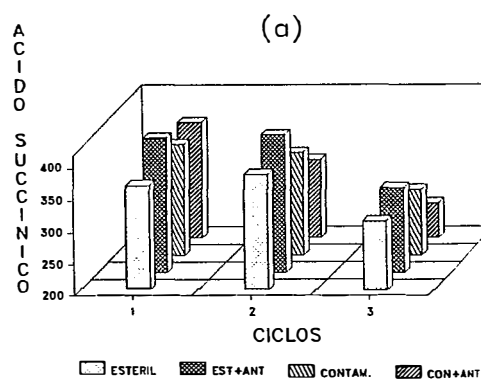
(c) Contaminação bacteriana (n^0 de bactérias $\times 10^{-6}$ /ml vinho) ;

À esquerda de cada gráfico encontram-se as respectivas significâncias estatísticas.

Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|---------|-----|----|----|-------|-----|----|----|
| EST+ANT | 385 | a | A | 1 | 381 | a | A |
| ESTERIL | 350 | b | B | 2 | 369 | a | A |
| CONTAM | 345 | b | B | 3 | 299 | b | B |
| CON+ANT | 318 | c | B | | | | |

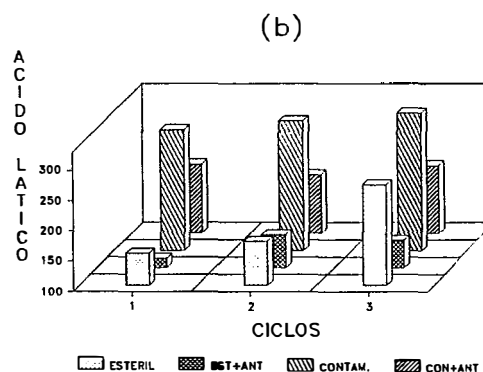
C.V. = 3.836% C.V. = 5.544%
D.M.S. 5% = 26.21371 D.M.S. 5% = 20.45959
D.M.S. 1% = 33.59238 D.M.S. 1% = 26.84971



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|---------|-----|----|----|-------|-----|----|----|
| CONTAM | 315 | a | A | 3 | 241 | a | A |
| CON+ANT | 208 | b | AB | 2 | 210 | a | A |
| ESTERIL | 200 | b | B | 1 | 196 | a | A |
| EST+ANT | 139 | b | B | | | | |

C.V. = 24.561% C.V. = 30.669%
D.M.S. 5% = 89.38378 D.M.S. 5% = 69.76333
D.M.S. 1% = 114.54366 D.M.S. 1% = 91.55242



Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|---------|-----|----|----|-------|-----|----|----|
| ESTERIL | 282 | a | A | 3 | 292 | a | A |
| EST+ANT | 267 | ab | A | 1 | 280 | a | A |
| CONTAM. | 264 | ab | A | 2 | 205 | b | B |
| CON+ANT | 224 | b | A | | | | |

C.V. = 6.384% C.V. = 13.875%
D.M.S. 5% = 48.58672 D.M.S. 5% = 37.92155
D.M.S. 1% = 62.26298 D.M.S. 1% = 49.76553

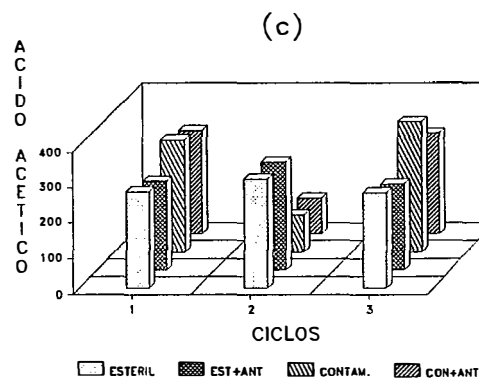


Figura 49. Efeito da contaminação bacteriana em meio semi-sintético (estéril, estéril + antibiótico; contaminado e contaminado + antibiótico), ao longo de três ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros:

(a) Formação de ácido succínico (mg/l vinho);

(b) Formação de ácido láctico (mg/l vinho);

(c) Formação de ácido acético (mg/l vinho);

À esquerda de cada gráfico encontram-se as respectivas significâncias estatísticas.

Teste de Tukey para medias de tratamento e ciclo.
A interacao foi significativa.

| Trat. | M | 5% | 1% | Ciclo | M | 5% | 1% |
|---------|------|----|----|-------|------|----|----|
| ESTERIL | 3.97 | a | A | 3 | 3.89 | a | A |
| EST+ANT | 3.89 | b | B | 2 | 3.80 | b | B |
| CON+ANT | 3.65 | c | C | 1 | 3.66 | c | C |
| CONTAM | 3.62 | c | C | | | | |

C.V. = 0.659% C.V. = 0.595%
D.M.S. 5% = 0.03044 D.M.S. 5% = 0.02376
D.M.S. 1% = 0.03900 D.M.S. 1% = 0.03118

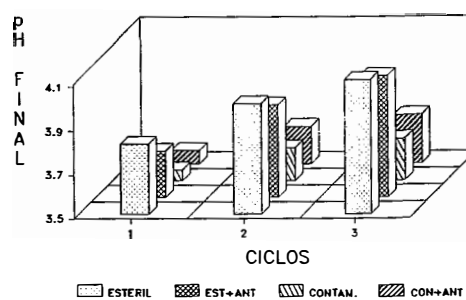


Figura 50. Efeito da contaminação bacteriana em meio semi-sintético (estéril; estéril + antibiótico; contaminado, contaminado + antibiótico) ao longo de três ciclos fermentativos, sobre os valores de pH do vinho. À esquerda do gráfico encontram-se as significâncias estatísticas.

A produção de ácido láctico, seguiu a mesma tendência da contaminação bacteriana, aumentou ao longo dos ciclos no meio esterilizado, embora se mantivesse baixa em relação aos tratamentos contaminado com e sem antibióticos (Figura 49b). A presença de antibióticos, estabilizou os teores de ácido láctico, enquanto que no meio contaminado, os teores foram sensivelmente mais elevados, à semelhança do ácido acético, este porém com uma tendência mais discreta, acompanha a contaminação (Figura 49b).

O pH final dos vinhos foi perceptivelmente menor nos meios contaminados com e sem antibióticos e decaiu ao longo dos três ciclos (Figura 50). A presença de antibióticos no meio esterilizado provocou uma acidificação, se comparado ao esterilizado sem adição de antibióticos.

Pode-se concluir, a partir do presente ensaio, que a contaminação bacteriana provoca sensíveis prejuízos a fermentação, o que é revertido pela aplicação de antibióticos. Estes porém, atrasam a fermentação. Outro fato a ressaltar, é que as bactérias inoculadas no presente ensaio, não produziram ácido succínico, cujos teores não foram incrementados na presença das bactérias.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente capítulo, são considerados alguns parâmetros avaliados, analisados sob um aspecto global, na medida em que compreenderam certas tendências.

5.1. Formação de alguns produtos no transcorrer da fermentação alcoólica

Na modalidade de fermentação empregada, a formação de etanol segue uma função hiperbólica quadrática, tendo na segunda hora 50% do etanol produzido, em estreita concordância com o consumo de substrato.

A formação do succinato ocorre em maior velocidade que o etanol até a primeira hora, quando 60% do total é produzido, seguida de uma redução na velocidade de formação até a segunda hora. Tal decréscimo na velocidade de formação de succinato coincide com a ocasião de maior acúmulo de piruvato, este sendo posteriormente reabsorvido. Esta reabsorção não coincide com o incremento na síntese do acetato, conforme descrevem LAFON-LAFOURCADE & PEYNAUD (1966), que ao contrário, é reabsorvido.

Com relação à trealose, a intensa degradação verificada nos primeiros 30 minutos está relacionada ao efeito glicose, e com a ressíntese da mesma chegou-se ao final da fermentação com um teor mais elevado que o inicial, conforme foi verificado no presente ensaio.

5.2. Eficiência fermentativa

Ficou evidente em alguns ensaios que este parâmetro embora apresentando tendências perceptíveis, essas tendências não chegaram a tornar-se significativas, dentro do rigor estatístico empregado. Nomeadamente, quando a síntese de alguns subprodutos é aumentada, tais como glicerol e ácidos orgânicos que desviam o açúcar da síntese do etanol, esperava-se encontrar a queda na eficiência fermentativa.

Exemplificando, nos ensaios cujos tratamentos permitiram maiores sínteses de glicerol, tais como nas maiores concentrações de potássio, seja em meio semi-sintético, seja em meio de melaço, ou mesmo na presença de sulfito, a variação de eficiência não foi significativa, embora a constatação da elevação dos teores de glicerol permitissem supor o comprometimento na formação do etanol.

O que ocorre é que as metodologias empregadas às determinações dos subprodutos, em especial do glicerol, são muito mais sensíveis do que aquela empregada para a eficiência fermentativa. Fica sugerido, a partir destas constatações, que uma análise mais criteriosa do desempenho fermentativo baseie-se no comportamento concernente às sínteses de glicerol, ácidos orgânicos, bem como da trealose.

5.3. Relações estequiométricas entre o glicerol e o ácido succínico

Com o objetivo de se estimar os desvios percentuais do açúcar para a formação dos principais metabólitos, em termos quantitativos, que não o etanol, nomeadamente o glicerol e ácido succínico formados na fermentação alcoólica, procedeu-se a uma análise estequiométrica desses parâmetros.

Para tal, lançou-se mão das relações molares apresentadas nos esquemas metabólicos das Figuras 1 e 2, bem como nas relações obtidas experimentalmente e descritas por GENEVOIS (1950), as quais foram correlacionadas ao metabolismo oxidativo por OURA (1977) e que constam na Equação 1.

Infelizmente, por não se ter determinado o parâmetro biomassa seca, com a precisão requerida não se pôde calcular a contribuição da biomassa na síntese do glicerol acoplado. Uma aproximação, no entanto, foi feita por uma estimativa a partir dos diferenciais de peso úmido, considerando 25% de matéria seca. Contudo, esse cálculo ainda poderia redundar em maiores erros, se fosse levado em conta no cálculo, a relação descrita por OURA (1977) onde 1,4 moles de glicerol são produzidos por grama de biomassa seca. Isto porquê, o referido valor foi obtido experimentalmente pelo autor, cujas condições podem ser distintas às descritas no presente trabalho. Necessitar-se-ia, conseqüentemente, calcular-se um fator para as condições do presente trabalho.

OURA (1977) relata que cerca de 4 a 5% do açúcar é desviado da produção de etanol para atender a formação de subprodutos, aos quais incluiu, além do glicerol e do ácido succínico, butilenoglicol, acetoina, e os álcoois superiores.

No presente trabalho dentro das condições assumidas, ficou constatado que só o glicerol e o ácido succínico, em alguns casos, respondem por 10% do açúcar desviado!

No cômputo geral, foram desviados cerca de 5,5% do açúcar para a síntese do glicerol, valor relativamente constante para os ensaios. Porém, na menor concentração de substrato (6%) esse valor chegou a ser aumentado para 8%, enquanto que na maior concentração de substrato (18%), o desvio do açúcar se

reduziu para 4,8% para a síntese do glicerol. A estes valores, de uma maneira geral, o ácido succínico produzido foi responsável por cerca de 40% do glicerol acoplado para o equilíbrio de redox.

Os desvios do açúcar para a produção do ácido succínico encontram-se ao redor dos valores de 1,5 a 2,5%. No entanto, chegou a 4% no tratamento testemunha do ensaio sobre o efeito de fontes nitrogenadas, que foi responsável por cerca de 57% do glicerol acoplado. Num valor próximo chegou o tratamento com menor concentração de substrato (6%) que permitiu 4% do desvio do açúcar para síntese do ácido em questão, que respondeu por cerca de 40% do glicerol.

Relações interessantes foram as obtidas entre os dois experimentos com doses crescentes de potássio, sob condições experimentais distintas, que permitiram maiores elucubrações à respeito do desvio de açúcar para síntese de glicerol. Num ensaio, altas concentrações de potássio, permitiram o crescimento (em meio semi-sintético) e em outro restringiram (em meio de melão). Além do que, ao glicerol se atribui um efeito osmorregulador, que ficou evidenciado no ensaio de potássio em meio de melão. Com a restrição do crescimento, praticamente isolou-se o efeito da formação de biomassa no desequilíbrio de redox, que geraria poder redutor para que, segundo NORDSTRÖM, (1966), fosse formado o glicerol acoplado ao crescimento. Sem glicerol acoplado ao crescimento, e com o ácido succínico respondendo por 25% do glicerol acoplado à sua síntese, os restantes 75% (após descontados os valores subprodutos de menor expressão quantitativa) não estando acoplados aos parâmetros conhecidos para o equilíbrio de oxidorredução, podem responder pelo efeito osmorregulador.

Nas relações estequiométricas, evitou-se considerar o ácido acético, posto que, o referido ácido é produto tanto do metabolismo das leveduras, quanto das bactérias.

5.4. Ácidos láctico e acético

Nos ensaios cujos tratamentos proporcionaram maiores contaminações bacterianas, nomeadamente, valores mais altos de pH (presentes no ensaio de pH, bem como no de fontes nitrogenadas), temperaturas mais elevadas, e obviamente, com a inoculação de bactérias, a contaminação travou uma estreita correlação com o aumento na síntese dos ácidos láctico e acético.

Analogamente, os tratamentos dos ensaios que proporcionaram menores proliferações bacterianas, tais como, a presença de sulfito, altas concentrações de potássio, baixos valores de pH e aplicação de antibióticos, permitiram menores produções dos ácidos láctico e acético.

Fica sugerido, portanto, considerar o ácido láctico (principalmente) como um indicador, não apenas da presença de bactérias, mas também, fundamentalmente, da atividade metabólica desses microrganismos. Mesmo que a literatura atribua o efeito tóxico das bactérias a produtos outros, que não apenas o ácido láctico, este se constitui num preciso parâmetro para detectar-se a extensão da contaminação, a partir da atividade metabólica bacteriana, pois o ácido láctico, se produzido pelas leveduras é insignificante em relação àquele produzido pelas bactérias.

5.5. Trealose

A trealose atualmente é considerada mais que um carboidrato de reserva, é um carboidrato que permite uma proteção contra agentes estressantes. Altos teores citoplasmáticos são necessários à termotolerância e crioproteção. Moléculas arranjadas no interior hidrofóbico das membranas são requisitadas à manutenção de células viáveis após a desidratação. Todavia, não há na literatura referências concernentes aos teores, bem como à localização deste dissacarídeo

necessários ao efeito protetor apresentado para uma levedura adequada à fermentação de etanol combustível.

A fermentação alcoólica, da forma como é desenvolvida no Brasil, é *per se* um conjunto de situações estressantes. E a literatura descreve as características necessárias a essa levedura: termotolerância, tolerância ao etanol, tolerância à acidez, entre outras. Mas todas essas tolerâncias guardam certos pontos em comum, focalizando-se o metabolismo das leveduras.

O que separa a levedura do meio externo, individualizando-a num ser vivo, são as suas membranas. É primaz que estas mantenham-se íntegras, característica que é atribuída à trealose e também à composição adequada dos seus ácidos graxos.

A literatura descreve o acúmulo de trealose, frente às situações estressantes. É interessante ressaltar que a intensidade e o tempo em que as leveduras ficam expostas a essas situações, determina a grandeza da resposta. Assim, o acúmulo descrito na literatura é induzido por "flashes" do agente estressante, haja visto a distinção entre tratamento térmico e choque térmico.

No tratamento térmico (exposição da levedura a 40°C durante 1 hora), a levedura acumula trealose. Já no choque térmico (exposição da levedura a 51°C durante 10 minutos), a levedura se degrada, relacionando-se com a queda de viabilidade. Assim, quando submetida a agentes estressantes, a levedura é induzida a acumular trealose, para tornar-se menos vulnerável. Entretanto, com a persistência do agente estressante, a trealose tende a ser mobilizada.

O que ocorreu nos experimentos desenvolvidos no presente trabalho, foi uma exposição continuada da levedura frente ao conjunto de situações estressantes. Quando os valores de trealose foram determinados, ao final dos ciclos fermentativos, as quedas das viabilidades, concomitantemente às quedas dos teores de trealose, decorrentes do metabolismo catabólico, precediam a própria autólise celular.

É vital, portanto, que a levedura mantenha seu nível de trealose adequado à respectiva função protetora, evitando a mobilização que é decorrente, entre outros fatores, de uma acidificação do meio interno.

Vários fatores estressantes (etanol, temperatura, acidez, altas concentrações salinas, etc.) comprovadamente ativam a ATPase da membrana plasmática, o que permite a correlação entre a tolerância a estresses e uma adequada atividade da ATPase plasmática.

Tal atividade, seria aquela que permitisse o equilíbrio do pH_i, garantindo o funcionamento das enzimas glicolíticas imprimindo dessa forma, um fluxo prioritário ao etanol, com mínimos desvios (os permitidos pelas necessidades metabólicas dessa levedura), para a formação dos subprodutos, sendo esse talvez parte de um mecanismo correlato ao conjunto de tolerâncias necessárias a uma levedura adequada à fermentação de etanol combustível.

6. CONCLUSÕES

Os dados coletados no presente trabalho dentro das condições em que foram conduzidos os experimentos, permitem as seguintes conclusões:

- 1. Incrementos na eficiência fermentativa, em algumas condições, vêm a ser a resposta a agentes estressantes, ocasião em que incrementos na formação de etanol ocorre às custas da biomassa e da trealose.**
- 2. Em geral, cerca de 5 a 8% do açúcar metabolizado pela levedura foi transformado em glicerol, dos quais 20 a 57% encontram-se acoplados à formação de ácido succínico, que por sua vez consome de 1,5 a 4% do açúcar processado.**
- 3. Evidenciada pela estequiometria, uma ampla parcela do glicerol pode estar acoplada à biomassa, donde se infere que aumentos na eficiência fermentativa poderiam ser obtidos pelos decréscimos das sínteses de ácido succínico e biomassa.**
- 4. O ácido succínico é produzido predominantemente pela levedura, enquanto que o lático pelas bactérias estudadas. Já o acetato é produzido pelos dois microrganismos.**

5. Os teores de ácido lático podem ser considerados um parâmetro adequado à avaliação da contaminação bacteriana, posto que traduzem a atividade metabólica das bactérias.
6. Os teores de trealose mostraram-se diretamente relacionados com a tolerância por parte da levedura aos agentes estressantes.
7. O nitrogênio amoniacal presente no meio fermentativo restringe a formação do succinato.
8. O excesso de potássio no meio fermentativo é estressante tanto à levedura quanto às bactérias mas exerce um efeito protetor para as leveduras contra a acidez do meio.
9. A presença do sulfito pode exercer um efeito benéfico à fermentação, quando restringe a proliferação bacteriana.
10. Elevadas concentrações de açúcar constituem-se em fatores estressantes às leveduras e às bactérias, embora propiciem menor formação de glicerol e ácido succínico, em valores relativos ao açúcar processado ou ao etanol produzido.

11. **A acidez do meio fermentativo é estressante ao fermento mas pode se constituir num efeito benéfico, conquanto controla a contaminação bacteriana que é na realidade, um fator mais estressante que a própria acidez.**
12. **A produção de succinato é pouco afetada pela acidificação do meio fermentativo.**
13. **Elevadas temperaturas demonstram ser estressantes por terem um efeito deletério sobre a levedura, bem como favorecendo a proliferação bacteriana.**
14. **As fermentações conduzidas por três diferentes leveduras apresentaram uma estequiometria muito semelhante, muito embora a IZ-1904 demonstrou ter menor tolerância ao processo fermentativo desenvolvido.**
15. **A aplicação de antibióticos comerciais, reverteram a ação deletéria das bactérias sobre a fermentação.**
16. **Elevadas concentrações de potássio, hidrogênio iônico, açúcar, bem como as temperaturas elevadas mostraram-se estressantes à levedura, sendo a contaminação bacteriana a de melhor correlação e responsável pelo maior efeito estressante.**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTERTHUM, F.; CRUZ, M. R.M.; JAIRO, M.L. e GAMBASSI, D.M. Efeito dos microrganismos contaminantes da fermentação alcoólica nas microdestilarias. STAB, Piracicaba, **3(1): 42-49. 1984.**

ALTERTHUM, F. & CRUZ, M.C.M. Aumento do rendimento da fermentação alcoólica pela adição de óleo de soja. Revista de Microbiologia, São Paulo, **18(1): 52-7,1987.**

AMIN, G.; VAN den EYNDE, E.; VERACHTERT, H. Determination of by-products formed during the ethanolic fermentation, using batch and immobilized cells system of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces bayanus*. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, **18: 1-5, 1983.**

AMIN, G.; STANDAERT, P.; VERACHTERT, H. Effects of metabolic inhibition on the alcoholic fermentation by several yeasts in batch or in immobilized cell systems. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, **19: 91-9, 1984.**

AMORIM, H.V. Introdução à bioquímica da fermentação alcoólica. Araras, Planalsucar, 1977. 95p.

- AMORIM, H.V.** Nutrição mineral de leveduras. Aspectos teóricos e práticos. *IN: SEMANA DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA "JAIME ROCHA DE ALMEIDA", 4, Piracicaba, Anais . ESALQ/STAB. p. 44-48, 1985.*
- AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A. J. e CAMPOS, H.** Infecção, problema sério na produção de álcool. 2º Congresso Nacional da Sociedade de Técnicos Açúcareiros do Brasil, vol IV: 158-168, 1982.
- AMORIM, H.Z.; ZAGO, E.A.; OLIVEIRA, A.J.** Novos métodos analíticos para o controle da fermentação alcoólica. Ciência e Tecnologia. Sociedade Brasileira de Microbiologia, São Paulo, 1982. 57p.
- AMORIM, H.V. & OLIVEIRA, A.J.** Infecção na fermentação: como evitá-la. Álcool e Açúcar, São Paulo, 5: 12-18. 1982.
- AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; ZAGO, E.A.** Fermentação descontínua: otimização do processo Melle-Boinot. *In: SEMANA DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA "JAIME ROCHA DE ALMEIDA", 4, Piracicaba, Anais, ESALQ/STAB. P. 114-21, 1985.*
- AMORIM, H.V. & BASSO, L.C.** Pedido de Privilégio de Propriedade Industrial junto ao Instituto de Propriedade Industrial, em 28/06/91 sob o número de Depósito 9102738, para o processo denominado "Processo para Aumentar os teores alcoólico do vinho e protéico da levedura após o término da Fermentação". 1991.
- ANACLETO, J. & van UDEN, N.** Kinetics and activation energetics of death in *Saccharomyces cerevisiae* induced by sulphur dioxide. Biotechnology and Bioengineering, New York, 34: 2477-86, 1982.

- ARMSTRONG, W. M. & ROTHSTEIN, A.** Discrimination between alkali metal cations by yeast. I. Effect of pH on uptake. Journal of General Physiology, Baltimore, **48(1)**: 61-71, 1964.
- ARTHUR, H. & WATSON, K.** Thermal adaptation in yeast: growth temperatures, membrane lipid, and cytochrome composition of psychrophilic, mesophilic, and thermophilic yeasts. The Journal of Bacteriology, Baltimore, **128(1)**: 56-68, 1976.
- ATTIFIELD, P.V.** Trehalose accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* during exposure to agents that induce heat shock responses. FEBS Letters, Amsterdam, **225(12)**: 259-63, 1987.
- BACILA, M. & HORII, J.** Improving the efficiency of alcohol production with respiration deficient yeasts mutants. Trends in Biochemical Science, Amsterdam, **4**: 59-61, 1979.
- BAJPAI, P.; SHARMA, A.; RAGHURAM, N.; BAJPAI, P.K.** Rapid production of ethanol in high concentration by immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* through soya flour supplementation. Biotechnology Letters, Kew, **11(4)**: 217-20, 1988.
- BASSO, L.C.; OLIVEIRA, A.J.; ORELLI, V.F.D.M.; CAMPOS, A.A.; GALLO, C.R. e AMORIM, H.V.** Dominância das leveduras contaminantes sobre linhagens industriais avaliada pela técnica da cariotipagem. STAB, Piracicaba. No prelo.

BATTLE, E.H. Growth-Reactions Equations for *Saccharomyces cerevisiae*. Physiologia Plantarum, New York, 13: 192-203, 1960.

BEAUVOIT, B.; RIGOULET, M.; RAFFARD, G.; CANIONI, P.; GUÉRIN, B. Differential sensitivity of the cellular compartments of *Saccharomyces cerevisiae* to protonophoric uncoupler under fermentative and respiratory energy supply. Biochemistry, Baltimore, 30: 11212-20, 1991.

BELL, D.J.; BLAKE, J.D.; PRAZAK, M.; ROWELL, D.; WILSON, P.N. Studies on yeast differentiation using organic acid metabolites. Part 1. Development of methodology using high performance liquid Chromatography. The Journal of the Institute of Brewing, London, 97(4): 297-305, 1991a.

BELL, D.J.; BLAKE, J.D.; PRAZAK, M.; ROWELL, D.; WILSON, P.N. Studies on yeast differentiation using organic acid metabolites. Part 2. Studies on the organic acid metabolites produced by yeast growth on glucose. The Journal of the Institute of Brewing, London, 97(4):307-15. 1991b.

BELL, D.J.; BLAKE, J.D.; PRAZAK, M.; WILSON, P.N. Studies on yeast differentiation using organic acid metabolites. Part 3. Studies on the metabolites produced by yeasts growth on a selection of single carbon substrates. The Journal of the Institute of Brewing, London, 97(14): 317-22, 1991c.

BELLINGER, Y.; LEMARCHAL, P.; LARHER, F. Relations entre la tolérance à la salinité de *Saccharomyces cerevisiae* et L'efficiencia des conversions de

- glucose en biomasse, en glycérol et en lipides. Science des Aliments, Paris, 10(3): 679-95, 1990.
- BERTOLINI, M.C.; ERNANDES, J.R.; LALUCE, C.** New Yeast strains for alcoholic fermentation at higher sugar concentration. Biotechnology Letters, Kew, 13(3): 197-202, 1991.
- BLANPAIN, J.P.; RONJAT, M.; SUPPLY, P.; DUFOUR, J.P.; GOFFEAU, A.; DUPONT, Y.** The yeast plasma membrane H⁺-ATPase. The Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 267(6):3735-40, 1992.
- BORAM, F.; FAID, m.; larpent, J.P.; BRETON, A.** Lactic of membranes and yeast associated with tradicional moroccan sour-dough bread fermentation. Sciences des Aliments, Paris, (13(3):509-9, 1993.
- BRAUNBECK, M.D.W.** Efeito de biocidas sobre o comportamento de leveduras e o rendimento da fermentação. 1988. 156p. (Dissertação de Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP). Piracicaba, SP.
- BRECHOT, P.; CROSON, M.; MATSURA, S.** Fermentation and respiration of yeasts in presence of sulphur dioxide. Antonie van Leeuwenhoek, 35: G21-22, 1969.
- BROWN, C.M. & ROSE, A.H.** Fatty-acid composition of *Candida utilis* as affected by growth temperature and dissolved oxygen tension. The Journal of Bacteriology, Baltimore, 99(2): 371-8, 1969.
- 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, Berlin, 11: 151-55, 1981.

BRUMM, P.I. & HEBEDA, R.E. Glycerol production in industrial alcohol fermentations. Biotechnology Letters, Kew, 10(9): 677-82, 1988.

CABEÇA-SILVA, C.; MADEIRA-LOPES, A.; van UDEN, N. Temperature relations of ethanol-enhanced petite mutation in *Saccharomyces cerevisiae*: Mitochondria as targets of termical death. FEMS Microbiology Letters, Amsterdam, 15: 149-51, 1982.

CALAHORRA, M.; RAMIREZ, J.; CLEMENTE, S.M.; PEÑA, A. Electrochemical potential and ion transport in vesicles of yeasts plasma membrane. Biochemical et Biophysica Acta, Amsterdam, 899(2): 229-38, 1987.

CACHOT, T.; MÜLLER, M.; PONS, M.N. Kinetics of volatiles metabolites during alcoholic fermentation of cane molases by *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Microbiology and Bioengineering, Berlin, 35: 450-4, 1991.

CARR, J.G.; PATRICIA, A.D.; SPARKS, A.H. The toxicity of sulphur dioxide towards certain lactic acid bacteria from fermented apple juice. The Journal of Applied Bacteriology London, (40)2: 201-12, 1976.

- CARTWRIGHT, C.P.; ROSE, A.H.; CALDERBANK, J.; KEENAN, M.H.J.**
Solute transport. *In: ROSE, A.H. & HARRISON, J.S. The Yeast*, 2nd ed.
Academic Press, London, 1989. vol. 3, cap. 2, p. 5-56.
- CASEY, G.P.; MAGNUS, C.A.; INGLEDEW, W.M.** High-growth brewing: effect
of nutrition on yeast composition, fermentation ability, and alcohol
production. *Applied Environmental Microbiology*, Baltimore, **48(3)**: 639-46,
1984.
- CASSIO, F.; LEÃO, C.; van UDEN, N.** Transport of lactate and other short-
chain monocarboxylates in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and
Environmental Microbiology*, New York, **53(3)**: 509-13, 1987.
- CAZZULO, J.J. & STOPPANI, A.O.M.** Enzyme reactions for carbon dioxide
fixation in baker's yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, **100**:
276-80, 1965.
- CAZZULLO, J.J. & STOPPANI, A.O.M.** The regulation of yeast pyruvate
carboxilase by acetyl-coenzyme A and L-aspartate. *Archives of Biochemistry
and Biophysics*, New York, **127**: 563-7, 1968.
- CHAPMAN, C. & BARTLEY, W.** The kinetics of enzyme changes in yeast under
conditions that cause the loss of mitochondria. *Biochemical Journal*,
London, **107**: 455-65, 1968.
- COLE, R.D.** Sulfitolysis. *In: Methods in Enzymology*, San Diego, **11**: 206-208,
1967.

- CONWAY, E.J. & BRADY, T. G. Biological production of acid an alkali. Biochemical Journal, Cambridge, 47(2): 360-74, 1950.
- CONWAY, E.J. & DOWNEY, M. An outer metabolic region of the yeast cell. Biochemical Journal, Cambridge, 47(2): 247-551, 1950a.
- CONWAY, E.J. & DOWNEY, M. pH values on the yeast cell. Biochemical Journal, Cambridge, 47(2): 355-60, 1950b.
- CONWAY, E.J. & DUGGAN, F. A cation carrier in the yeast cell wall. Biochemical Journal, Cambridge, 69(2): 265-74, 1958.
- CONWAY, E.J. & KERNAN, R.P. The effect of redox dyes on the active transport of hydrogen, potassium and sodium ions across the yeast cell membrane. Biochemical Journal, Cambridge, 61(1):32-6, 1955.
- COOPER, T.G. & BENEDICT, C.R. The participation of acetyl-CoA in piruvate carboxilase. Biochemical and Biophysical Research Communications, New York, 22(3): 285-90, 1966.
- COOPER, T.G. Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. In: STRATHERN, J .N.; JONES, E.W.; BROACH, J.R. The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces. Metabolism and gene expression. ed Cold Spring Harbour, New York, p. 39-99, 1982.

of pyruvate in beer. Journal of the Institute of Brewing, London, 79: 298-304, 1973.

COOTE, N. & KIRSOP, B.H. The content of some organic acids in beer and other fermented media. Journal of the Institute of Brewing, London, 80: 474-83, 1974.

COOTE, N. & KIRSOP, B.H. Factors responsible for the decrease in pH during beer fermentations. The Journal of the Institute of Brewing, London, 82: 149-52, 1976.

COOTE, P.J.; COLE, M.P.; JONES, M.V. Introduction of increased thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* may be triggered by a mechanism involving intracellular pH. The Journal of General Microbiology, London, 137: 1701-8, 1991.

CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; CHAPMAN, D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms. The role of trehalose. Science, Washington, 233: 701-3, 1984.

CROWE, J.H.; PANEK, A.D.; CROWE, L.M.; PANEK, A.C.; ARAUJO, P.S. Trehalose transport in yeast cell. Biochemistry International, Marrickville, 24(4):721-30, 1991.

CROWE, L.M.; MOURADIAN, R.; CROWE, J.H.; JACKSON, S.A.; WOMERLEY, C. Effect of carbohydrates on membrane stability at low water activities. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, **769**: 141-50, 1984.

CRUZ, M.R.M.; VAIRO, M.L.; GAMBASSI, D.M.; ALTERTHUM, F. Influência da penicilina V-ácida no controle das infecções bacterianas na fermentação alcoólica. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, **16(2)**: 138-42, 1985.

D'AMORE, T.; PANCHAL, C.J.; STEWART, G.G. The effect of osmotic pressure on the intracellular accumulation of ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation in wort. *The Journal of the Institute of Brewing*, London, **93**:472-76, 1987.

D'AMORE, T.; PANCHAL, C.J.; STEWART, G.G. Intracellular ethanol accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, New York, **54(1)**: 110-14, 1988.

D'AMORE, T.; CELOTTO, G.; RUSSEL, I.; STEWART, G.G. Selection and optimization of yeast suitable for ethanol production at 40° C. *Enzyme and Microbial Technology*, Guilford, **6(2)**:78-80, 1989.

D'AMORE, T.; CRUMPLEN, R.; STEWART, G.G. The environment of trehalose in yeast stress tolerance. *Journal of Industrial Microbiology*, Amsterdam, **7(3)**: 191-5, 1991.

DELGADO, D.A. Acúmulo de trealose em linhagens de *Saccharomyces*

termotolerantes. Piracicaba, 1993. 123p. (Dissertação de Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"-USP).

DE MARTIN, V.F. Efeito da remoção de células sobre o rendimento da fermentação alcoólica por leveduras. Piracicaba, 1987. 190p. (Dissertação de Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"-USP).

DE VIRGILIO, C.; PIPER, P.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Acquisition of thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* without heat shock protein HSP 104 and in the absence of protein synthesis. FEBS Letters, Amsterdam, **288(1/2): 86-90, 1991.**

DOMBEK, K.M. & INGRAM, L.O. Magnesium limitation and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation. Applied Environmental Microbiology, Baltimore, **52(5): 975-81, 1986.**

DRYSDALE, G.S. & FLEET, G.H. The effect of acetic bacteria upon the growth and metabolism of yeast during the fermentation of grape juice. The Journal of Applied Bacteriology, London, **64: 471-81, 1989.**

DUNTZE, W.; NEWMANN, D.; GANCEDO, T.M.; ATZPODIEN, W.; HOLZER, H. Studies on regulation and localization of the glyoxylate cycle enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. European Journal of Biochemistry, Berlin, **10: 83-9, 1969.**

- DURO, A.F. & SERRANO, R.** Inhibition of succinate production during yeast fermentation by deenergization of the plasma membrane. Current Microbiology, New York, **6**: 111-13, 1981.
- EKUNSANMI, T.I. & ODUNFA, S.A.** Ethanol tolerance, sugar tolerance and invertase activities of some yeasts strain isolated from steep water of fermentating cassava tubers. Journal of Applied Bacteriology, London, **67**: 672-75, 1990.
- ELEUTHERIO, E.C.A.; ARAUJO, P.S.; PANEK, A.D.** Productive role of trehalose during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*. Criobiology, London, **30**: 591-96, 1993.
- ELEUTHERIO, E.C.A.; DE ARAÚJO, P.S.; P.A.** Role of the trehalose carrier in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. Biochimica et Biophysica Acta, Amsterdam, **1156**: 263-6, 1993a.
- ERASO, P. & GANCEDO, C.** Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. FEBS Letters, Amsterdam, **224(1)**: 187-92, 1987.
- ESSER, K.; SCHIMIDT, U.; STHAL, U.** Ethanol and biomass production of wild strains and respiratory deficient mutants of *Saccharomyces* under anaerobic and aerobic conditions. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, **16**: 161-4, 1982.

FINGUERUT, J.; LUCREDI, H.A.; LEIMER, K.H.; ROSSEL, C.E.V.

Estequiometria da fermentação alcoólica a partir do caldo de cana. Boletim Técnico Coopersucar, Piracicaba, 33: 45-48, 1985.

FINGUERUT, J.; LUCREDI, H.; FURCO, M.A.; ALTOMARI, R.; ROSSEL,

C.E.V. Controle operacional da fermentação. Boletim Técnico Coopersucar, Piracicaba, 38: 19-23, 1987.

FRANCOIS, J.; NEVES, M.J.; HERS, H.G. The control of trehalose biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: Evidence for a Catabolite Inactivation and Repression of Trehalose-6-phosphate phosphatase. Yeast, New York, 7: 575-87, 1991.

FREITAS-VALLE, A.B.; MENEZES, R.R.; PANEK, A.D.; MATTON, J.R.

Relationship between succinate excretion and cytochrome levels in *Saccharomyces cerevisiae*. Cellular & Molecular Biology, Elmsford, 27(5): 467-71.

GAILIUSIS, J.; RINNE, R.W.; BENEDICT, C.R. Pyruvate-oxaloacetate exchange

reaction in baker's yeast. Biochimica et Biophysica Acta, Amsterdam, 92: 595-601, 1964.

GALLO, C.R. Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica. 1989. 338p. (Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP), Campinas, SP.

- GANCEDO, C.; GANCEDO, J.M.; SOLS, A.** Glycerol metabolism in yeasts. Pathways of utilization and Production. European Journal of Biochemistry, London, **5**: 165-172.1968.
- GANCEDO, C. & SERRANO, R.** Energy-yielding Metabolism. *In: The Yeasts*, 2nd ed. Academic Press, London, 1989. vol. 3. cap. 6, p. 205-59.
- GAO, C. & FLEET, G.H.** The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. Journal of Applied Bacteriology, Baltimore, **65**: 405-9, 1988.
- GASPARINI, N.R.** Estudo da fermentação alcoólica por leveduras mutantes deficientes respiratórias de *Saccharomyces cerevisiae* IZ-270 e *Saccharomyces uvarum* IZ-1904. 1986. 82p. (Dissertação de Mestrado, ESALQ/USP) Piracicaba, SP.
- GENEVOIS, L.** Essais de bilans de la fermentation alcoolique due aux cellules de levures. Biochimica et Biophysica Acta, Amsterdam, **4**: 179-92, 1950.
- GIBBONS, W.R. & WESTBY, C.A.** Effects of sodium meta bisulfite on diffusion fermentation of fodder beets fuel ethanol production. Biotechnology and Bioengineering, New York, **30**:906-16, 1987.

- GOMES, E.** Efeito do tratamento ácido da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação alcoólica. Piracicaba, 1988. 206 p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- GOTTSCHALK, G.** Bacterial Metabolism. 2nd. ed Springer-Verlay, New York, 1985. 359p.
- GRBA, S; OURA, E.; SUOMALAINEN, H.** On the formation of glycogen and trehalose in baker's yeast. European Journal Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, 2: 29-37, 1975.
- GROSZ, R. & STEPHANOPOULOS, G.** Physiological, Biochemical, and Mathematical studies of Micro-Aerobic Continuous Ethanol Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. II Intracellular Metabolite and Enzyme Assays at Steady state Chemostat cultures. Biotechnology and Bioengineering, New York, 36: 1020-29, 1990.
- GUIJARRO, J.M. & LAGUNAS, R.** *Saccharomyces cerevisiae* does not accumulate ethanol against a concentration gradient. The Journal of Bacteriology, Baltimore, 160: 874-878. 1984.
- GUTIERREZ, L.E.** Efeito da adição de sulfito sobre a produção de alcóois superiores durante a fermentação alcólica. Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 45(2): 359-68, 1988.

GUTIERREZ, L.E. Estudo comparativo da fermentação alcoólica por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces uvarum*. Piracicaba, 1989 160p. (Livre-Docência - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

GUTIERREZ, L.E. Efeito da adição de sulfato de amônio sobre a produção de ácido succínico durante a fermentação alcoólica. Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 47(2): 597-608, 1990.

GUTIERREZ, L.E. Acúmulo de trealose em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação alcoólica. Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 47(2): 597-608, 1990.

GUTIERREZ, L.E.; ANNICHINO, A.V.K.O.; LUCATTI, L. Capacidade fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* enriquecida com ácidos graxos. Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 47(2): 575-95, 1990.

GUTIERREZ, L.E.; ANNICHINO, A.V.K.O.; LUCATTI, L.; STIPP, J.M.S. Efeitos do ácido acético sobre a fermentação alcoólica. Arquivos de Biologia e Tecnologia, 34(2): 235-42. 1991.

GUTIERREZ, L.E. Composição de ácidos graxos e viabilidade celular em *Saccharomyces cerevisiae*. STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos, Piracicaba, 9(6) 31-4, 1991a.

- GUTIERREZ, L.E.** Produção de glicerol por linhagens de *Saccharomyces* durante fermentação alcoólica. Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, **48**: 55-69, 1991b.
- HACKING, A.J.; TAYLOR, J.W.F.; HANAS, C.M.** Selection of yeast able to produce ethanol from glucose at 40° C. Applied Microbiology Biotechnology, Berlin, **19**: 361-3, 1984.
- HAJNY, G.J.; HENDERSHOT, W.F.; PETERSON, W.H.** Factors Affecting Glycerol Production by a Newly isolated osmophilic yeast. Applied Microbiology, New York, **8**: 5-11, 1960.
- HAUBER, J. & SINGER, T.P.** Studies on succinate dehydrogenase. 14. Intracellular distribution, catalytic Properties and Regulation of fumarate reductases in yeast. European Journal of Biochemistry, London, **3**: 107-16, 1967.
- HAYATZU, H. & MILLER Jr., R.C.** The cleavage of DNA by the oxygen dependent reaction of bisulfite. Biochemical and Biophysical Research Communications, New York, **46(1)**: 120-24, 1972.
- HEERDE, E. & RADLER, F.** Metabolism of the anaerobic formation of succinic acid by *Saccharomyces cerevisiae*. Archives of Microbiology, Berlin, **117**: 269, 1978.

HERRAIZ, T. Production of volatile compounds by *Saccharomyces cerevisiae* during the alcoholic fermentation of grape must in presence or absence of SO₂. Belgian Journal of Food Chemistry and Biotechnology, Brussels, **45(2)**: 57-62, 1990.

HERRAIZ, T.; MARTIN-ALVAREZ, P.J.; GUILLERMO, R.; HERRAIZ, M.; CABEZUDO, M.D. Differences between vines fermented with and without sulphur dioxide using various selected yeasts. Journal of the Science Food and Agriculture, London, **49(2)**:249-58, 1989.

HINZE, H.B. & HOLZER, H. Analysis of the energy metabolism after incubation of *Saccharomyces cerevisiae* with sulfite or nitrite. Archives of Microbiology, Berlin, **145**: 27-31, 1986.

HOLCBERG, I.B. & MARGALITH, P. Alcoholic fermentation by immobilized yeast at high sugar concentrations. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, **13**: 133-140, 1981.

HOMMES, F.A. Effect of glucose on the level of glycolytic enzymes in yeast. Archives of Biochemistry and Biophysics, London, **114**: 231-33, 1966.

HOPPE, G.K. & HANSFORD, G.S. Ethanol inhibition of continuous anaerobic yeast growths. Biotechnology Letters, Kew, **4(1)**: 39-44, 1982.

HORII, J. Contribuição ao estudo do metabolismo da glicose em *Saccharanomyces carlbergensis* Hansen. 86p. 1972 (Tese de Doutorado - ESALQ/USP). Piracicaba.

- HORII, J.** Condução de processos fermentativos. *In: SEMINÁRIO SOBRE TECNOLOGIA E ECONOMIA DO ÁLCOOL*; 1, Piracicaba, p. 37-41. Anais. São Paulo, Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, 1980.
- HOTTINGER, T.; SCHUTZ, P.; WIEMKEN, A.** Heat-induced accumulation and futile cycling of trehalose in *Sacharomyces cerevisiae*. The Journal of Bacteriology, Baltimore, 169(12) 5518-22, 1987.
- HUNTER, K. & ROSE, A.H.** Lipid composition of *Saccharomyces cerevisiae* as influenced by growth temperature. Biochimica et Biophysica Acta, Amsterdam, 260: 639-53, 1972.
- IDRIS, EL SHERT, E.T.A. & BERRY, D.R.** Effect of temperature on the protein and nucleic acid content of thermotolerant yeasts. Biotechnology Letters, Kew, 2(3):105-10, 1980.
- INFANTES, M. & TOURNEUR, C.** Survey on the lactic flora of natural sourdoughs located in various french areas. Science des Aliments, Paris, 11(3): 527-45. 1991.
- INGRAM, L.O.** Adaptation of membrane lipids to alcohols. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, London, 35B:235-8, 1985.
- JENNINGS, D.H.** Polyol metabolism in Fungy. Advances in Microbial Physiology, London, 25: 149-93, 1984.

- JOVALL, P.; TUNBLAD-JOHANSSON, I; ADLER, L.** ^{13}C NMR analysis of production and accumulation of osmoregulatory metabolites in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. Archives of Microbiology, Berlin, **154**: 209-14, 1990.
- JOHNSON, S.L. & SMITH, K.W.** The interaction of borate and sulfite with pyridine nucleotides. Biochemistry, New York, **15**: 553-559, 1976.
- JOHANSON, M. & SJÖSTRÖM, J.E.** Enhanced production of glycerol in an alcohol dehydrogenase (ADH I) deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology Letters, Kew, **6**: 49-54, 1984a.
- JOHANSON, M. & SJÖSTRÖM, J.E.** Ethanol and glycerol production under aerobic conditions by wild-type, respiratory deficient mutants and a fusion product of *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, **20**: 105-10, 1984b.
- JONES, R.P.; PAMMENT, N.; GREENFIELD, P.F.** Alcohol fermentation by yeasts: The effect of environmental and other variables. Process Biochemistry, London, **16**: 42-9, 1981.
- JONES, R.P.** Effect of the relative concentration of species on yeast growth and ethanol production. Process Biochemistry, London, **21**(6): 183-87, 1986.
- KANE, S.M. & ROTH, R.** Carbohydrate metabolism during ascospore development in yeast. The Journal of Bacteriology, Baltimore, **118**: 8-14, 1974.

- KANEUCHI, C.; SEKI, M. and KOMAGATA, JK.** Production of succinic acid from citric acid and related acids by *Lactobacillus* strains. Applied and Environmental Microbiology, New York, 54(12): 3053-3056, 1988.
- KENNES, C.; VEIGA, M.C.; DUBOURGUIER, H.C.; TOUZEL, J.P.; ALBAGNAC, G.; NAVEAU, H. and NYNS, E.J.** Trophic relationships between *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* and their metabolism of glucose and citrate. Applied Environmental Microbiology, New York, 57(4): 1046-1051. 1991a.
- KENNES, C.; DUBOURGUIER, H.C.; ALBAGNAC, G.; NAVEAU, H.; VEIGA, M.C.; and NYNS, E.J.** Fermentation of citrate by *Lactobacillus plantarum* in the presence of a yeast under acid conditions. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, 35: 369-372, 1991b.
- KELLER, F.; SCHELLEMBER, M.; WIEMKEN, A.** Localization of trehalose in vacuoles in the cytosol of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Archives of Microbiology, Berlin, 131: 298-301, 1982.
- KENYON, C.P.; PRIOR, B.A.; HENDRIK, J.J.V.** Water relations of ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: glycerol production under solute stress. Enzyme and Microbiology and Technology, Guildford, 8: 461-4, 1986.
- KOTYK, A.** Proton extrusion in yeast. *In*: Methods in Enzymology, San Diego, 174: 592-603. 1989.

KLOPPER, W.J.; ANGELINO, S.A.G.F.; TUNING, B.; VERMEIRE, H.A.
Organic acids and glycerol in beer. The Journal of Institute of Brewing,
London, 92: 225-28, 1986.

KREGGER-van RIJ, N.J.W. The Yeasts. A taxonomic study, 3ed. Elsevier,
Groningen, 1984.

KROUWEL, P.G. & BRABER, L. Ethanol production by yeast at supraoptimal
temperatures. Biotechnology Letters, Kew, 1(10): 403-8, 1979.

LAFON-LAFOURCADE, S. & PEYNAUD, E. Sur les taux des acides cetoniques
formés au cours de la fermentation alcoolique. Annales de l'Institute Pasteur,
Paris, 110(5): 766-78, 1966.

LAFON-LAFOURCADE, S.; LARUE, F.; RIBÉREAU-GAYON, P. Evidence for
the existence of "survival factors" as an explanation for some peculiarities of
yeast growth, especially in grape must of high sugar concentration. Applied
Environmental Microbiology, London, 38(6):1069-73, 1979.

LAFON-LAFOURCADE, S.; GENEI, C.; RIBÉREAU-GAYON, P. Inhibition of
alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeasts and
their elimination by yeast ghosts. Applied and Environmental Microbiology,
London, 47(6): 1246-49, 1984.

LAGUNAS, R. & GANCEDO, J.M. Reduced pyridine-nucleotides balance in glucose-growing *Saccharomyces cerevisiae*. European Journal of Biochemistry, Berlin, **37**: 90-4, 1973.

LALUCE, C.; PALMIERI, M.C.; CRUZ, C.L. Growth and fermentation characteristics of new selected strains of *Saccharomyces* at high temperatures and high cell densities. Biotechnology and Bioengineering, New York, **37**: 528-36, 1990.

LARSEN, P.; SYDNES, L.K.; LANDFALD, B.; STROM, A.R. Osmoregulation in *Escherichia coli* by accumulation of organic osmolytes: betaines, glutamic acid and trehalose. Archives of Microbiology, Berlin, **147**: 1-7, 1987.

LARSSON, C. & GUSTAFSSON, L. Glycerol production in relation to the ATP pool and heat production rate of the yeast *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* during salt stress. Archives of Microbiology, Berlin, **147**: 358-63, 1987.

LEÃO, C. & van UDEN, N. Effects of ethanol and other alkanols on the kinetics and activation parameters of thermal death in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering, New York, **24**: 1581-90, 1982.

LEÃO, C. & van UDEN, N. Effects of ethanol and other alkanols on the general aminoacid permease of *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering, New York, **26**: 403-405., 1984a.

- LEÃO, C. & van UDEN, N. Effects of ethanol and other alkanols on passive proton influx in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biochimica et Biophysica Acta, Amsterdam, 774: 43-48, 1984b.
- LEÃO, C.& van UDEN, N. Transport of lactate and other short-chain monocarboxylase in the yeast *Candida utilis*. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, 23:229-393, 1986.
- LEE, T.C. & LEWIS, M.J. Mechanism of release of nucleotidic material by fermenting brewer's yeast. Journal of Food Science, New York, 33: 124-128, 1987.
- LEHNINGER, A.L. Princípios de Bioquímica, Sarvier, São Paulo, 1984. 725p.
- LEITE, S.G.F. & FRANÇA, F.P. Intracellular ethanol and cellular viability of *Saccharomyces cerevisiae*. Revista de Microbiologia, São Paulo, 21(2): 163-5, 1990.
- LEWIS, M.J. & RAINBOW, C. Transamination and the liberation of 2-oxoglutarate by yeast. The Journal of the Institute of Brewing, London, 69:39-45, 1963.
- LILLIE, S.H. & PRINGLE, J.R. Reserve carbohydrate metabolism in *Sacharomyces cerevisiae* responses to nutrient limitation. The Journal of Bacteriology, Baltimore, 143: 1384-94, 1980.

LOUREIRO-DIAS, M.C. & PEINADO, J.M. Effect of ethanol and other alkanols on the maltose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. Biotecnology Letters, Kew, **4**:721-724. 1982.

LOUREIRO-DIAS, M.C. & PEINADO, J.M. Transport of maltose in *Saccharomyces cerevisiae*. Effect of pH and potassium ions. Biochemical Journal, Cambridge, **222**: 293-298, 1984.

LOUREIRO, V. & FERREIRA, H.G. On the intracellular accumulation of ethanol in yeast. Biotecnology and Bioengineering, New York, **25**: 2263-2269, 1983.

LOW, C. & PARKS, L.W. Sterol and phospholipid acyl chain alterations in *Saccharomyces cerevisiae* responses to nutrient limitation. The Journal of Bacteriology, Baltimore, **143**: 1384-94, 1980.

LUPIAÑES, J.A.; MACHADO, A.; NUÑEZ DE CASTRO, I.; MAYOR, F. Succinic acid production by yeasts grown under different hypoxic conditions. Molecular & Cellular Biochemistry, Gravenhaga, **3**(2): 113-16, 1974.

MACHADO, A.; NUÑEZ DE CASTRO, I.; MAYOR, F. Isocitrate dehydrogenases and oxoglutarate dehydrogenase activities of baker's yeast growth in a variety of hypoxic conditions. Molecular & Cellular Biochemistry, Gravenhaga, **6**(2): 93-100. 1975.

- MAIER, K., HINZE, H.; LEUSCHEL, L.** Mechanism of sulfite action on the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. Biochimica et Biophysica Acta, Amsterdam, **848**: 120-30, 1986.
- MACKENZIE, K.F.; SINGH, K.K.; BROWN, A.D.** Water stress plating hypersensitivity of yeasts: protective role of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of General Microbiology, New York, **134(1)**: 64-67, 1983.
- MAIORELLA, B.; BLANCH, H.W.; WILKE, C.R.** By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering, New York, **25**: 103-121, 1983.
- MAIORELLA, B.L.; BLANCH, H.W.; WILKE, L.R.** Feed component inhibition in ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering, New York, **XXVI**: 1155-66, 1984.
- MARQUES, T. A.** Influência de dois níveis de temperatura e reciclo de células na fermentação alcoólica. 1991. 164p. (Dissertação de Mestrado, ESALQ/USP) Piracicaba, SP.
- MEIKLE, A.J.; CHUDEK, J.A.; REED, R.H.; GADD, G.M.** Natural abundance ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopic analysis of acyclic polyol and trehalose accumulation by several yeasts species in response to salt stress. FEMS Microbiology Letters, Amsterdam, **82**:163-8, 1991.

- MILLAN, C. & ORTEGA, J.M.** Fermentation of "Pedro Ximenez" grape musts by different yeasts races: correlation between fermented sugars, acetaldehyde, acetic acid ethanol yielded. Belgian Journal of Food Chemistry and Biotechnology, Brussels, 43(3): 79-83, 1988.
- MILLER, A.L. & ATKINSON, D.E.** Response of yeast pyruvate carboxylase to the adenylate energy charge and other regulatory parameters. Archives of Biochemistry and Biophysics, London, 152: 531-38, 1972.
- MISHRA, P. & PRASAD, R.** Relationship between ethanol tolerance and fatty acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Environmental Microbiology, Baltimore, 54(10): 2439-46, 1988.
- MONK, P.R. & COWLEY, P.J.** Effect of nicotinic acid and sugar concentration of grape juice and temperature on accumulation of acetic acid during yeast fermentation. Journal of Fermentation Technology, Osaka, 62(6): 515-21, 1984.
- MÜLLER, F. & MASSEY, V.** Sulfite interaction with free and protein bound flavin. *In*: Methods in Enzymology. San Diego, Vol. 18B, 468-473, 1971.
- NABAIS, R.C.; CORREIA, I.S.; VIEGAS, C.A.; NOVAIS, J.M.** Influence of calcium ion on ethanol tolerance of *Saccharomyces bayanus* and alcoholic fermentation by yeasts. Applied Environmental Microbiology. Baltimore, 54(10):2439-46, 1988.

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, Baltimore, **28(3)**: 383-91, 1974.

NAGODAWITHANA, T.W. & STEINKRAUS, K.H. Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of *Saccharomyces cerevisiae cerevisiae* in the presence of acetic acid. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, **34**: 375-80, 1990.

NAVARRO, J.M. & DURAND, G. Fermentation alcoolique: influence de la temperature sur l' accumulation d'alcool dans le cellules de levure. Annales de Microbiologie, Paris, **129B**: 215-21, 1978.

NAVARRO, J.M. Fermentation alcoolique: Influence des conditions de culture sur l'inhibition par l'ethanol. Cellular & Molecular Biology, Elmsford, **26**: 241-46, 1980.

NG, H. Factors affecting organic acid production by sour dough (San Francisco) bacteria. Applied Microbiology, New York, **23**: 1153-9, 1972.

NORDSTRÖM, K. Formation of ethyl acetate in fermentation with brewer's yeast. The Journal of the Institute of Brewing, London, **67**: 173-81, 1961.

- NORDSTRÖM, K.** Formation of ethyl acetate in fermentation with brewer's yeast. VI. Metabolism of acetyl-coenzyme A. The Journal of the Institute of Brewing, London, 69: 142-53, 1963.
- NORDSTRÖM, K.** Yeast growth and glycerol formation. Acta Chemica Scandinavica, Copenhagen, 20(4): 1016-25, 1966.
- O'CONNOR-COX, E.S.C.; PIK, J.; INGLEDEW, W.M.** Improved ethanol yields through supplementation with excess assimilable nitrogen. Journal of Industrial Microbiology, Groningen, 8: 45-52, 1991.
- OURA, E.** Reaction products of yeast fermentation. Process Biochemistry, London, 12(3): 644-51, 1983.
- PAMPULHA, M.E.F.S.** Efeito do ácido acético na fermentação e nos parâmetros de crescimento em *Saccharomyces cerevisiae*. Lisboa, 1989. 222p. (Tese de Doutoramento -Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa).
- PAMPULHA, M.E.F.S. & LOUREIRO-DIAS, M.C.** Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, 31: 547-50, 1989.
- PAMPULHA, M.E.F.S. & LOUREIRO-DIAS, M.C.** Activity of glycolytic enzymes of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of acetic acid. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, 34: 375-80, 1990.

- PAMPULHA, M.E.F.S. & LOUREIRO, V. Interaction of the effects of acetic acid and ethanol on inhibition of fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology Letters, Kew, 11:269-74, 1989.
- PANCHAL, C.J.; PEACOCK, L.; STEWART, G.G. Increased osmotolerance of genetically modified ethanol producing strains of *Saccharomyces* sp. Biotechnology Letters, Kew, 4(10): 639-44, 1982.
- PANCHAL, C.J. TAVARES, F.C.A. Yeast strain selection for fuel ethanol production. *In*: PANCHAL, C.J. Yeast strain selection ed. Marcel Dekker, New York, 1990. cap. 8, p. 225-43.
- PANCHAL, C.J. & STEWART, G.G. Regulatory factors in alcohol fermentations. Advances in Biotechnology, 4, 1989.
- PANCHAL, C.J.; PEACOCK, L.; STEWART, G.G. Increased osmotolerance of genetically modified ethanol producing strains of *Saccharomyces* sp. Biotechnology Letters, Kew, 4(10): 639-44, 1982.
- PANCHAL, C.J. TAVARES, F.C.A. Yeast strain selection for fuel ethanol production. *In*: PANCHAL, C.J. Yeast strain selection ed. Marcel Dekker, New York, 1990. cap. 8, p. 225-43.
- PANEK, A.D. Function of trehalose in baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Archives of Biochemistry and Biophysics, London, 100: 402-25, 1963.

- PANEK, A.D.** Energy requirements for trehalose synthesis. Ciência e Cultura, São Paulo, 23(1): 75-9, 1971.
- PANEK, A.D.** Trehalose synthesis during starvation of baker's yeast. European Journal of Applied Microbiology, London, 2(1): 39-46, 1975a.
- PANEK, A.D.** Metabolismo de trealose em *Saccharomyces cerevisiae*. 1975b. 115p. (Tese de Professor Titular. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química).
- PANEK, A.D.; SILVA, J.T.; FERREIRA-FILHO, R.; PANEK, A.C.** Fructose 2,6-bisphosphate and trehalose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Ribeirão Preto, 22(2): 171-77, 1989.
- PANEK, A.C.; MANSURE, J.J.A.; PASCHOALIN., M.F.; PANEK, D.** Regulation of trehalose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* mutants during temperatures shifts. Biochimie, Paris, 72: 77-9, 1990.
- PANEK, A.** Storage carbohydrates. *In*: ROSE, A.H. & HARRISON, J. S. The yeasts. 2nd ed. Academic Press, London, 1991, vol. 4, cap.13, p. 655-78.
- PARADA, G. & ACEVEDO, F.** On the relation of temperature and RNA content to the specific growth rate in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering, New York, 25: 2785-8, 1983.

- PARKKINEN, E. & OURA, E.** Ammonia formation in cultures of baker's yeast grown on urea. Proceedings of the Fourth International Symposium on Yeasts, Vienna, part I. 35-6, 1974.
- PARSON, R.V.; McDUFFIE, N.G.; DIN, G.A.** pH inhibition of yeasts ethanol fermentation in continuous culture. Biotechnology Letters, Kew, 10(6): 677-80. 1984.
- PASCUAL, C.; ALONSO, A.; GARCIA, I.; ROMAY, C.; KOTYK, A.** Effect of ethanol on glucose transport, key glycolytic enzymes, and proton extrusion in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering, New York, 32: 374-8, 1988.
- PEÑA, A.** Studies on the mechanism of K^+ transport in yeast. Archives of Biochemistry and Biophysics, London, 167: 397-409, 1975.
- PEÑA, A.; CINCO, G.; PUYOU, A.G.; TUENA, M.** Studies on the mechanism of the stimulation of glycolysis and respiration by K^+ in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemica et Biophysica Acta, Amsterdam, 180: 1-8, 1969.
- PERLOT, P.** Influence of culture medium, composition on the kinetics of yeast growth and ethanol production. International Conference on (fuel) Alcohols & Chemicals from Biomass, Guadalajara, 2: 1-12, 1989.
- PERLMAN, P.S. & MAHLER, H.R.** Derepression of mitochondria and their aspects. Archives of Biochemistry and Biophysics, New York, 162: 248-71, 1984.

- PINTO, I.; CARDOSO, H.; LEÃO, C.; van UDEN, N.** High enthalpy and low enthalpy death in *Saccharomyces cerevisiae* induced by acetic acid. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, **33**: 1350-52, 1989.
- PRIEST, F.G.** Contamination. *In*: **RAINBOW, C. and FLOAT G.E.S.** (ed) **Brewing Science and Technology**. part II. The Institute of Brewing. 1981. 23-31p.
- RADLER, F. & SCHÜTZ, H.** Glycerol production of various strains of *Saccharomyces*. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, Barking, **33(1)**: 36-40, 1982.
- RAMOS, M.T. & MADEIRA-LOPES, A.** Effects of acetic acid on temperature profile of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, Kew, **12(3)**: 229-34, 1990.
- RANKINE, B.C.** Factos influencing the pyruvic acid content wines. **Journal of Sience Food and Agriculture**, London, **16**: 394-98, 1965.
- RANKINE, B.C.** Influence of yeast strain and pH on pyruvic acid content of wines. **Journal of Science Food and Agriculture**, London, **18**: 41-4, 1967.
- RANKINE, B.C. & BRIDSON, A.** Glycerol in australian wines and factors influencing its formation. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, **22**: 6-12, 1971.

RATLEDGE, C. & EVANS, C.T. Lipids and their metabolism. *In: ROSE, A.H. & HARRISON, J.S. The Yeasts*, 2nd ed. Academic Press, London, 1989. vol. 3, cap. 10, p. 367-455.

REED, G. & PEPPLER, H. Yeast Technology, The Avi Publishing Company, Inc. Westport, Connecticut, 1973. 378p.

RIBEIRO, M.J.S. Estudo do metabolismo de trealose durante o choque térmico a 36°C em *Saccharomyces cerevisiae*. Rio de Janeiro, 1993. 87 p. (Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio de Janeiro).

ROSA, M.F. & SÁ-CORREIA, I. *In vivo* activation by ethanol of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. Applied and Environmental Microbiology, New York, 57(3): 830-35, 1991.

RODRIGUEZ-NAVARRO, A. & RAMOS, J. Dual system of potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. The Journal of Bacteriology, Baltimore, 59(3): 940-5, 1984.

RONDINI, M.A.T. Isolamento, caracterização e identificação de bactérias contaminantes de dornas de fermentação nas destilarias de etanol. 1985. 92p. (Tese de Mestrado, ESALQ/USP), Piracicaba, SP.

ROTHSTEIN, A. & DEMIS, C. The relation of the cell surface to metabolism. The stimulation of fermentation by extracellular potassium. Archives of Biochemistry and Biophysics, London, 44: 18-29, 1953.

- RUIZ-AMIL, M.; TORRONTEGUI, G.; PALACIAN, E.; CATALINA, L; LOSADA, M.** Properties and function of yeast pyruvate carboxylase. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 240(9): 3485-3492. 1965a.
- RUIZ-AMIL, G.; FERNANDEZ, M.J.; MEDRANO, L.; LOSADA, M.** Cellular distribution of yeast pyruvate decarboxylase and its induction by glucose. Archiv für Mikrobiologie, Berlin, 55: 46-53, 1965b.
- RUSSEL, J.B.** Another explanation for toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. The Journal of Applied Bacteriology, London, 73: 363-70, 1992.
- RYAN, J.P. & RYAN, H.** The role of intracellular pH in the regulation of cation exchanges in yeasts. Biochemical Journal, London, 128(1): 139-46, 1972.
- SÁ-CORREIA, I. & van UDEN, N.** Effects of ethanol on thermal death and on the maximum temperature for growth of the yeast *Kluyveromyces fragilis*. Biotechnology Letters, Kew, 4: 805-808, 1982.
- SÁ-CORREIA, I. & van UDEN, N.** Temperature profiles on ethanol tolerance: effects of ethanol on the minimum and maximum temperatures for growth of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces fragilis*. Biotechnology and Bioengineering, New York, 25: 1665-7, 1983.
- SÁ-CORREIA, I.** Synergistic effects of ethanol octanoic and decanoic acids on the kinetics and the activation parameter of thermal death in *Saccharomyces bayanus*. Biotechnology and Bioengineering, New York, 28: 761-63, 1986.

- SAIGAL, D. & VISWANATHAN, L.** Effect of oils and fatty acids in the tolerance of distiller's yeast to alcohol and temperatures. International Sugar Journal, London, **85**(1017): 266-9, 1983.
- SALGUEIRO, S.P.; SÁ-CORREIA, I.; NOVAIS, J.M.** Ethanol-induced leakage in *Saccharomyces cerevisiae*: kinetics and relationship to yeast ethanol tolerance and alcohol fermentation productivity. Applied and Environmental Microbiology, New York, **54**: 903-909, 1988.
- SLAVIK, J. KOTYK, A.** Intracellular pH distribution and transmembrane pH profile of yeast cells. Biochimica et Biophysica Acta, Amsterdam, **766**:679-84, 1984.
- SAMPAIO, I, P. & SPENCER-MARTINS, I.** Adaptative growth at high temperatures of the lactose-fermentating yeast *Kluyveromyces marxianus* var *marxianus*. Journal of Basic Microbiology, **29**(1): 61-4, 1989.
- SANTOS, M.N.G.** Seleção de leveduras termotolerantes para a produção de etanol. Viçosa, 1988. 45p. (Tese de Mestrado - Universidade Federal de Viçosa - MG).
- SCHIMZ, K.L. & HOLZER, H.** Rapid decrease of ATP-content in intact cell of *Sacharomyces cerevisiae* after incubation with low concentrations of sulfite. Archives of Microbiology, Berlin, **121**: 225-293, 1979.

- SCHIMZ, K.L. The effect of sulfite on the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Archives of Microbiology, Berlin, 125: 89-95, 1980.
- SCOTT, G.; JACOBSON, M.A.; RICE, M.E. The influence of glycolytic factors on the potassium and sodium content of *Saccharomyces cerevisiae*. Archives of Biochemistry, New York, 30(2): 282-91, 1951.
- SCRUTTON, M.C. & UTTER, M.F. Pyruvate carboxylase. III. Some physical and chemical properties of the highly purified enzymes. The Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 240(1): 1-9, 1965.
- SCRUTTON, M.C.; KEECH, D.B.; UTTER, M.F. Pyruvate carboxylase, IV. Partial reactions and the locus of activation by acetyl-CoA. The Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 240(2): 574-81. 1965.
- SEASTON, A.; CARR, G.; EDDY, A.A. The concentration of glycine by preparations of the yeast *Saccharomyces carlsbergensis* depleted of adenosine triphosphate: Effects of proton gradients and uncoupling agents. Biochemical Journal, Cambridge, 154(3): 669-76, 1976.
- SHARMA, S. & TAURO, P. Control of ethanol production by yeast: pyruvate accumulation in slow ethanol producing *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology Letters, Kew, 9(8): 585-86, 1987.
- SHIMAZU, Y. & WATANABE, M. Effects of yeast strains and environmental conditions on formation of organic acids in must during fermentation. Journal of Fermentation Technology, Osaka, 59(11): 27-32, 1981.

SHINDO, S.; SAHARA, H.; KOSHINO, S. Relationship of production of succinic acid and methyl citric acid pathway during alcohol fermentation with immobilized yeast. *Biotechnology Letters*, **15(10)**: 51-6, 1993.

SIGLER, K.; KOTYK, A.; KNOTKOVA, A.; OPEKAROVA, M. Process involved in the creation of buffering capacity and in substrate induced proton extrusion in the yeast. *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, **643(3)**: 583-92, 1981.

STOPPANI, A.O.M.; CONCHES, L.; FAVELUKES, S.L.S.; SACERDOTE, F.L. Assimilation of carbon dioxide by yeasts. *Biochemical Journal*, Cambridge, **70**: 438-455, 1958.

STOPPANI, A.O.M.; FAVELUKES, S.L.S.; CONCHES, L. Formation of succinic acid in baker's yeast through the citric acid cycle. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, New York, **75**: 453-64, 1958.

STREHAIANO, N.; MOTA, M.; GOMA, G. Effects of inoculum level on kinetics of alcoholic fermentation. *Biotechnology Letters*, Kew, **5(2)**: 135-40, 1981.

STUPIELLO, J.P. & HOHII, J. Fundo de dorna de fermentação: um fator de eficiência industrial. *STAB*, Piracicaba, **1(1)**: 34-6, 1982.

SUOMALAINEN, H. & PFAFFLI, S. Changes in the carbohydrate reserves of baker's yeast during growth and on standing. *The Journal of the Institute of Brewing*, London, **67**: 249-54, 1961.

- SUUTARI, M.; LIUKKONEN, K.; LAAKSO, S.** Temperature adaptation in yeasts: the role of fatty acids. Journal of General Microbiology, London, **136**: 1469-74, 1990.
- SZCZODRAK, I. & TARGONSKI, Z.** Selection of thermotolerant yeast strains for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose. Biotechnology and Bioengineering, New York, **31**: 300-3, 1988.
- THEVELEIN, J.M.** Regulation of trehalose mobilization in fungi. Microbiological Reviews, Washington, **48**(1): 42-59, 1984.
- THOUKIS, G.; UEDA, M.; WRIGHT, D.** The formation of succinic acid during fermentation. American Journal of Enology and Viticulture, Davis, **16**: 1-8, 1965.
- TILBURY, R.G.** Occurrence and effects of acid bacteria in the sugar industry. *In*: CARR, J.G.; CUTTING, C.V.; WHITING, G.O. Lactic acid bacteria in beverages and foods. ed Academic Press, London, p. 177-191, 1975.
- TISDALE, H.; HAUBER, J.; PRAGER, G.; TURINI, P.; SINGER, T.P.** Studies on succinate dehydrogenase. 15. Isolation, molecular properties and isoenzymes of fumarate reductase. European Journal of Biochemistry, London, **4**: 472-77, 1968.
- TOKUOKA, K.** A Review. Sugar - and salt - tolerant yeasts. Journal of Applied Bacteriology, London, **74**: 101-10, 1993.

TUAZON, P.T. & JOHNSON, S.L. Free radical and ionic reaction of bisulfite with NADH and its analogues. Biochemistry, New York, **16**: 1183-1188, 1977.

UTTER, M. & KEECH Formation of oxaloacetate from pyruvate and CO₂. The Journal of Biological Chemistry, Baltimore, **235(5)**: PC17-18, 1960.

VALLE, E.; BERGILLOS, L.; RAMOS, S. External K⁺ affects the internal acidification caused by the addition of glucose to yeast cells. Journal of General Microbiology, London, **133(3)**: 535-38, 1987.

van UDEN, N. Ethanol toxicity and ethanol tolerance in yeast. *In*: TSAO, G.T. Annual Reports on Fermentation Process, ed. Academic Press, New York, 1985, vol. 8, cap. 2, p. 11-58.

van UDEN, N. Alcohol toxicity in yeasts and bacteria. CRC Press, Boca Raton, 1989. 300p.

VAVRA, J.J. & JOHNSON, M.J. Aerobic and Anaerobic biosynthesis of aminoacids by baker's yeast. The Journal of Biological Chemistry, Baltimore, **220**: 33-42, 1956.

VIEGAS, C.A.; SÁ-CORREIA, I.; NOVAIS, J.M. Nutrient enhanced production of remarkably high concentrations of ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* through soy flour supplementation. Applied and Environmental Microbiology, Berlin, **50**: 1333-1335. 1985a

- VIEGAS, C.A.; SÁ-CORREIA, I.; NOVAIS, J.M. Synergistic inhibition of growth of *Saccharomyces bayanus* by ethanol and octanoic or decanoic acids. Biotecnology Letters, Kew, 7: 611-14, 1985b.
- VIEGAS, C.A.; ROSA, M.F.; CORREIA, I.S.; NOVAIS, J.M. Inhibition of yeast growth by octanoic and decanoic acids produced during ethanolic fermentation. Applied and Environmental Microbiology, London, 55(1): 21-28. 1989.
- VIEGAS, C.A. & SÁ-CORREIA, I. Activation of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* by octanoic acid. Journal of General Microbiology, London, 137: 645-51, 1991.
- VILLALOBO, A. Energy dependent and potassium translocations by the reconstitute yeast plasma membrane ATPase. Canadian Journal of Cellular Biology, New York, 62(9): 865-77, 1984. Apud Chemical Abstracts, Columbus, 101(17): 282, dec., 1984.
- WACH, A. & GRÄBER, P. The plasma membrane H⁺-ATPase from yeast. European Journal of Biochemistry, Amsterdam, 201: 91-97, 1991.
- WALSH, R.M. & MARTIN, P.A. Growth of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* in a temperature gradient incubator. The Journal of the Institute of Brewing, London, 83: 169-172, 1977.

WALKSMAN, S.A. Microbial Antagonism and Antibiotic Substances. The Commonwealth Fund, New York, p. 38-215, 1945.

WATANABE, Y.; YAMAGUCHI, M.; SANEMITSU, Y.; TAMAI, Y. Characterization of plasma membrane proton-ATPase from salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* cell. Yeast, New York, **7**:599-606, 1991.

WATSON, K.; DUNLOP, G.; CAVICCHIOLI, R. Mitochondrial and cytoplasmic protein synthesis are not required for heat shock acquisition of ethanol and thermotolerance in yeast. FEBS Letters, Amsterdam, **172(2)**: 299-302, 1984.

WATSON, K. Temperature relations. *In*: ROSE, A.H. & HARRISON, J.S. The Yeasts. 2nd ed. Academic Press, London, 1987. vol. 2, cap. 3, p. 41-71.

WHITING, G.C. & COGGINS, R.A. Organic acid metabolism in cider and perry fermentations. II Non-volatile organic acids of cider-apple juices and sulphited ciders. Journal of Science Food and Agriculture, London, **11**: 337-44, 1960a.

WHITING, G.C. & COGGINS, R.A. Organic acid metabolism in cider and perry fermentations. III Keto-acids in cider-apple juice and ciders. Journal of Science Food and Agriculture, London, **11**: 705-9, 1960b.

WHITING, G.C. Acetification in ciders and perries. Journal of the Institute of Brewing, London, **79**: 218-26, 1973.

WHITING, G.C. Organic acid metabolism of yeast during fermentation of alcoholic beverages. A review. Journal of the Institute of Brewing, London, **82**: 84-92, 1976.

WIEMKEN, A. Trehalose in yeast, stress protection rather than reserve carbohydrate. Antonie van Leeuwenhoek, Amsterdam, **58**:209-17, 1990.

WILLIAMS, R.R., WATERMAN, R.E., KERESZTESY, J.C., BUCHMAN, E.R. Studies of crystalline vitamin B₁. III. Cleavage of vitamin with sulfite. Journal of American Chemical Society, New York, **57**: 536-537, 1935.

WINKLER, K.; KIENLE, I.; BURGET, M.; WAGNER, J.C.; HOLZER, N. Metabolic regulation of the trehalose content of vegetative yeast. FEBS Letters, Amsterdam, **291**: 269-72, 1991.

YANG, S.F. Sulfoxide formation from methionine or its sulfide analogs during aerobic oxidation of SO₃⁻². Biochemistry, New York, **9**: 5008-5014, 1970.

YARROW, D. Genus 22. *Saccharomyces* MEYEN ex REESS . In KREGER-van RIJ, The Yeasts. New York, 3ed. Elsevier, Groningen, p. 379-95, 1984.

ZAGO, E.A.; AMORIM, H.V.; BASSO, L.C. GUTIERREZ, L.E.; OLIVEIRA, A.J. Métodos Analíticos para o Controle da Produção de Álcool. FERMENTEC/ESALQ -USP. Piracicaba, SP. 1989. 144p.

APÊNDICE
(dados originais)

Tabela 7. Produção de etanol (%), consumo de substrato (ART%), produção dos ácidos succínico, láctico e acético (mg/l) bem como a variação do pH, da viabilidade celular (%) e dos teores de trealose(% M.S.) durante a fermentação alcoólica de meio semi-sintético com 14% ART e 10% de fermento Fleischmann. Os dados de contagem bacteriana constam no 1º e último tempo.

| PARÂMETROS ANALISADOS | | | | | | | | | |
|-----------------------|--------|-------|------------|-----------|-----------|------|-------|----------|--------------|
| TEMPO | ETOH % | ART% | SU C(mg/l) | LAT(mg/l) | ACT(mg/l) | pH | VIAB% | TREAL%MS | Nº BACTx10-5 |
| 0h - 1 | 0,00 | 14,05 | 17,6 | 21,8 | 19,6 | - | - | 4,43 | |
| 0h - 2 | 0,00 | 13,14 | 17,6 | 21,8 | 19,6 | 5,6 | 99, | 4,50 | <10-5 |
| MÉDIAS | 0,00 | 13,60 | 17,6 | 21,8 | 19,6 | 5,6 | 99,0 | 4,47 | <10-5 |
| 20min-1 | 0,66 | 12,08 | 434 | 87,1 | 98,2 | - | - | 1,85 | - |
| 20min-2 | 0,94 | 11,93 | 434 | 87,1 | 108 | 4,35 | 99,1 | 1,32 | - |
| MÉDIAS | 0,80 | 12,01 | 434 | 87,1 | 103 | 4,35 | 99,1 | 1,59 | - |
| 40min-1 | 1,62 | 11,35 | 533 | 152 | 147 | - | - | 1,45 | - |
| 40min-1 | 1,98 | 11,45 | 521 | 145 | 167 | 3,92 | 99,8 | 1,41 | - |
| MÉDIAS | 1,48 | 11,40 | 527 | 148 | 157 | 3,92 | 99,8 | 1,43 | - |
| 1h - 1 | 1,98 | 10,62 | 598 | 196 | 196 | - | - | 2,17 | - |
| 1h - 2 | 2,28 | 10,10 | 609 | 203 | 196 | 3,70 | 99,4 | 2,70 | - |
| MÉDIAS | 2,13 | 10,36 | 603 | 200 | 196 | 3,70 | 99,4 | 2,44 | - |
| 2h - 1 | 3,97 | 6,06 | 697 | 305 | 334 | - | - | 5,84 | - |
| 2h - 2 | 4,20 | 6,18 | 574 | 269 | 295 | 3,26 | 99,2 | 5,34 | - |
| MÉDIAS | 4,08 | 6,12 | 636 | 287 | 315 | 3,26 | 99,2 | 5,60 | - |
| 4h - 1 | 6,56 | 2,92 | 984 | 363 | 335 | - | - | 9,34 | - |
| 4h - 2 | 6,67 | 2,62 | 885 | 341 | 324 | 3,15 | 98,3 | 7,01 | - |
| MÉDIAS | 6,61 | 2,77 | 935 | 352 | 330 | 3,15 | 98,3 | 8,18 | - |
| 6h - 1 | 7,14 | 0,011 | 1030 | 479 | 275 | - | - | 6,60 | - |
| 6h - 2 | 7,18 | 0,010 | 1040 | 370 | 147 | 3,24 | 96,2 | 7,33 | - |
| MÉDIAS | 7,16 | 0,010 | 1035 | 425 | 211 | 3,24 | 96,2 | 6,97 | - |
| 8h - 1 | 7,28 | 0 | 990 | 428 | 196 | - | - | 7,29 | - |
| 8h - 2 | 7,28 | 0 | 1060 | 399 | 176 | 3,34 | 96,7 | 9,31 | - |
| MÉDIAS | 7,28 | 0 | 1025 | 414 | 186 | 3,34 | 96,7 | 8,30 | - |
| 24h - 1 | 7,42 | 0 | 1040 | 370 | 285 | - | - | 6,85 | - |
| 24h - 2 | 7,42 | 0 | 1040 | 399 | 334 | 3,60 | 90,9 | 7,58 | 7,52 |
| MÉDIAS | 7,42 | 0 | 1040 | 385 | 310 | 3,60 | 90,9 | 7,21 | 7,52 |

Tabela 8. Efeito de diferentes fontes nitrogenadas (testemunha, sulfato de amônio, uréia, citrato de amônio) sobre a velocidade de fermentação avaliada pela perda de peso (g) a cada hora, no decorrer de 5 ciclos fermentativos, empregando-se fermento prensado (Fleischmann) e meio semi sintético incubados a 33 C. Cada dado representa a média de 3 repetições.

| TRATA- MENTOS | CICLO | PERDA DE PESO (g) | | | | | | |
|------------------|-------|-------------------|------|------|------|------|------|------|
| | | 1h | 2h | 3h | 4h | 5h | 6h | 7h |
| TEST | 1º | 1,15 | 2,74 | 3,79 | 3,86 | 3,92 | 3,95 | 3,97 |
| | 2º | 0,78 | 2,33 | 3,65 | 3,94 | 4,00 | 4,03 | 4,10 |
| | 3º | 0,12 | 2,77 | 3,85 | 4,02 | 4,08 | 4,13 | 4,19 |
| | 4º | 0,54 | 1,82 | 3,32 | 3,93 | 4,02 | 4,09 | 4,13 |
| | 5º | 1,66 | 3,16 | 3,89 | 4,01 | 4,11 | 4,18 | 4,23 |
| MÉDIAS | | 1,05 | 2,56 | 3,70 | 3,95 | 4,03 | 4,08 | 4,12 |
| S-NH4 | 1º | 1,05 | 2,66 | 3,80 | 3,88 | 3,93 | 3,96 | 3,98 |
| | 2º | 1,02 | 2,76 | 3,86 | 4,01 | 4,06 | 4,13 | 4,17 |
| | 3º | 1,22 | 2,99 | 3,81 | 3,93 | 3,98 | 4,05 | 4,08 |
| | 4º | 0,58 | 2,04 | 3,61 | 3,95 | 4,06 | 4,13 | 4,18 |
| | 5º | 1,63 | 3,35 | 3,91 | 4,02 | 4,11 | 4,16 | 4,22 |
| MÉDIAS | | 1,10 | 2,76 | 3,80 | 3,96 | 4,03 | 4,09 | 4,13 |
| URÉIA | 1º | 0,93 | 2,61 | 3,76 | 3,85 | 3,91 | 3,95 | 3,97 |
| | 2º | 1,03 | 2,97 | 3,88 | 3,99 | 4,04 | 4,11 | 4,15 |
| | 3º | 1,23 | 3,28 | 3,93 | 4,02 | 4,08 | 4,14 | 4,18 |
| | 4º | 0,85 | 2,62 | 3,85 | 3,98 | 4,04 | 4,10 | 4,14 |
| | 5º | 2,08 | 3,31 | 3,95 | 4,04 | 4,12 | 4,17 | 4,24 |
| MÉDIAS | | 1,22 | 3,06 | 3,87 | 3,98 | 4,04 | 4,0 | 4,14 |
| C-NH4 | 1 | 0,93 | 2,61 | 3,78 | 3,86 | 3,91 | 3,92 | 3,95 |
| | 2º | 1,13 | 3,14 | 3,87 | 3,97 | 4,02 | 4,08 | 4,11 |
| | 3º | 1,33 | 3,50 | 3,95 | 4,04 | 4,09 | 4,13 | 4,16 |
| | 4º | 0,88 | 2,68 | 3,84 | 3,95 | 4,02 | 4,07 | 4,13 |
| | 5º | 2,23 | 3,78 | 3,91 | 4,01 | 4,07 | 4,12 | 4,20 |
| MÉDIAS | | 1,30 | 3,14 | 3,87 | 3,97 | 4,02 | 4,06 | 4,11 |

Tabela 9. Efeito de diferentes fontes nitrogenadas (testemunha, sulfato de amônio, uréia, citrato de amônio) em meio semi-sintético, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: eficiência fermentativa; formação de glicerol (g/100g de Etanol) e peso de fermento (g).

| TRATAMENTOS | EFICIÊNCIA | | | | | GLICEROL(g/100gEtOH) | | | | | PESO DE FERMENTO (g) | | | | |
|-------------|------------|------|------|------|------|----------------------|------|------|------|------|----------------------|------|------|------|------|
| | E1 | E2 | E3 | E4 | E5 | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 |
| TEST-1 | 81,1 | 83,1 | 82,2 | 82,2 | 82,0 | 14,4 | 12,5 | 12,0 | 11,4 | 10,7 | 13,5 | 14,2 | 14,3 | 14,4 | 14,6 |
| TEST-2 | 81,9 | 82,8 | 82,3 | 82,2 | 82,0 | 14,3 | 12,4 | 11,9 | 11,4 | 10,7 | 13,6 | 14,2 | 14,4 | 14,4 | 14,7 |
| TEST-3 | 82,4 | 81,5 | 82,5 | 82,2 | 82,0 | 14,3 | 12,5 | 11,7 | 11,4 | 10,7 | 13,6 | 14,2 | 14,5 | 14,7 | 14,8 |
| MÉDIAS | 81,8 | 82,5 | 82,3 | 82,2 | 82,0 | 14,3 | 12,5 | 11,9 | 11,4 | 10,7 | 13,6 | 14,2 | 14,4 | 14,5 | 14,7 |
| S-NH4-1 | 82,4 | 82,3 | 81,6 | 82,3 | 81,9 | 14,6 | 12,5 | 11,7 | 11,2 | 10,3 | 13,5 | 13,9 | 13,9 | 14,0 | 14,3 |
| S-NH4-2 | 82,5 | 83,4 | 82,0 | 83,2 | 81,8 | 13,1 | 12,0 | 11,4 | 11,2 | 10,7 | 13,6 | 14,0 | 14,1 | 14,1 | 14,3 |
| S-NH4-3 | 82,3 | 83,5 | 82,2 | 82,2 | 81,9 | 13,3 | 11,5 | 11,5 | 11,2 | 10,6 | 13,6 | 14,0 | 14,0 | 14,2 | 14,4 |
| MÉDIAS | 82,4 | 83,1 | 81,9 | 82,6 | 81,9 | 13,6 | 11,6 | 11,6 | 11,2 | 10,6 | 13,6 | 14,0 | 14,0 | 14,1 | 14,4 |
| URÉIA-1 | 81,1 | 81,5 | 82,4 | 82,2 | 82,8 | 14,0 | 12,0 | 12,0 | 10,6 | 9,6 | 13,8 | 14,4 | 14,7 | 15,3 | 15,7 |
| URÉIA-2 | 81,1 | 82,1 | 82,4 | 82,3 | 82,1 | 13,9 | 11,9 | 11,9 | 10,2 | 9,6 | 13,9 | 14,4 | 14,8 | 15,4 | 15,9 |
| URÉIA-3 | 81,0 | 82,2 | 82,4 | 82,2 | 82,1 | 13,9 | 11,7 | 11,7 | 10,2 | 9,6 | 13,8 | 14,3 | 14,8 | 15,6 | 15,9 |
| MÉDIAS | 81,1 | 81,9 | 82,4 | 82,2 | 82,3 | 13,9 | 11,9 | 11,9 | 10,3 | 9,6 | 13,8 | 14,4 | 14,8 | 15,4 | 15,8 |
| C-NH4-1 | 81,1 | 82,4 | 82,3 | 82,3 | 82,0 | 14,0 | 11,6 | 11,6 | 10,3 | 9,7 | 13,8 | 14,4 | 14,7 | 15,3 | 15,8 |
| C-NH4-2 | 81,1 | 81,1 | 82,5 | 82,2 | 82,0 | 14,0 | 12,0 | 12,0 | 10,2 | 9,6 | 13,9 | 14,2 | 14,7 | 15,3 | 15,6 |
| C-NH4-3 | 81,0 | 81,6 | 82,4 | 82,2 | 82,1 | 14,0 | 12,0 | 12,0 | 10,5 | 10,1 | 14,0 | 14,5 | 14,8 | 15,7 | 15,8 |
| MÉDIAS | 81,1 | 81,7 | 82,4 | 82,2 | 82,0 | 14,0 | 11,9 | 11,9 | 10,3 | 9,8 | 13,9 | 14,4 | 14,7 | 15,4 | 15,7 |

Tabela 10. Efeito de diferentes fontes nitrogenadas (testemunha; sulfato de amônio; uréia e citrato de amônio) em meio semi-sintético, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: viabilidade celular (%); teor de trealose na célula (% M.S.) antes de iniciar a fermentação e ao final do último ciclo; contaminação bacteriana (n° de bactérias $\times 10^{-6}$ /ml de vinho).

| TRATAMENTOS | VIABILIDADE (%) | | | | | BACTÉRIAS (cels/ml $\times 10^{-6}$) | | | | | TREALOSE (%) | |
|-------------|-----------------|----|----|----|----|---------------------------------------|-----|-----|------|------|--------------|-------|
| | V1 | V2 | V3 | V4 | V5 | BC1 | BC2 | BC3 | BC4 | BC5 | INICIAL | FINAL |
| TEST-1 | 99 | 98 | 96 | 90 | 80 | 0,4 | 4,1 | 5,6 | 4,5 | 6,0 | 2,33 | 1,16 |
| TEST-2 | 98 | 95 | 94 | 93 | 86 | 0,4 | 5,3 | 7,5 | 6,8 | 7,1 | 2,26 | 1,45 |
| TEST-3 | 99 | 95 | 95 | 91 | 86 | 1,1 | 3,8 | 6,8 | 7,5 | 8,3 | - | 1,78 |
| MÉDIAS | 99 | 96 | 95 | 91 | 84 | 0,6 | 4,4 | 6,6 | 6,3 | 7,1 | 2,29 | 1,46 |
| S-NH4-1 | 94 | 90 | 83 | 80 | 76 | 3,0 | 3,0 | 3,8 | 2,3 | 4,9 | 2,33 | 2,16 |
| S-NH4-2 | 96 | 94 | 80 | 79 | 73 | 2,3 | 5,6 | 1,9 | 1,9 | 1,9 | 2,26 | 2,29 |
| S-NH4-3 | 94 | 94 | 85 | 81 | 72 | 1,9 | 4,9 | 2,7 | 2,3 | 3,8 | - | 2,52 |
| MÉDIAS | 95 | 93 | 83 | 80 | 74 | 2,4 | 4,5 | 2,8 | 2,3 | 3,5 | 2,29 | 2,32 |
| URÉIA-1 | 99 | 96 | 95 | 94 | 91 | 2,7 | 7,1 | 4,1 | 4,5 | 5,3 | 2,33 | 1,78 |
| URÉIA-2 | 97 | 98 | 97 | 91 | 89 | 3,4 | 5,3 | 7,1 | 16,2 | 6,0 | 2,26 | 2,31 |
| URÉIA-3 | 98 | 96 | 95 | 99 | 89 | 2,7 | 6,0 | 5,6 | 11,7 | 6,4 | - | 3,01 |
| MÉDIA | 98 | 97 | 96 | 95 | 90 | 2,9 | 6,1 | 5,6 | 10,8 | 5,9 | 2,29 | 2,37 |
| C-NH4-1 | 97 | 94 | 92 | 91 | 83 | 1,9 | 3,0 | 5,6 | 14,6 | 5,6 | 2,33 | 2,05 |
| C-NH4-2 | 98 | 97 | 91 | 86 | 79 | 2,3 | 4,9 | 9,4 | 10,9 | 11,2 | 2,26 | 2,38 |
| C-NH4-3 | 95 | 95 | 90 | 80 | 82 | 2,7 | 3,8 | 8,3 | 13,5 | 10,2 | - | 2,69 |
| MÉDIAS | 97 | 95 | 91 | 86 | 81 | 2,3 | 3,9 | 7,8 | 13,0 | 9,0 | 2,26 | 2,37 |

Tabela 11. Efeito de diferentes fontes nitrogenadas (testemunha, sulfato de amônio, uréia, citrato de amônio) em meio semi-sintético, em três dos cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: formação de ácido succínico (mg/l vinho), formação de ácido láctico (mg/l vinho) e formação de ácido acético (mg/l vinho), já descontados os teores de dos ácidos presentes nos meios.

| TRATA- MENTOS | AC.SUCCINICO(mg/l) | | | AC.LATICO(mg/l) | | | AC.ACÉTICO(mg/l) | | |
|------------------|--------------------|------|------|-----------------|------|------|------------------|------|------|
| | SUC1 | SUC3 | SUC5 | LAC1 | LAC3 | LAC5 | ACT1 | ACT3 | ACT5 |
| TEST-1 | 962 | 882 | 791 | 153 | 147 | 267 | 181 | 152 | 102 |
| TEST-2 | 1080 | 785 | 879 | 153 | 135 | 341 | 219 | 114 | 102 |
| TEST-3 | 1100 | 597 | 897 | 147 | 135 | 354 | 219 | 76 | 122 |
| MÉDIAS | 1050 | 755 | 856 | 151 | 139 | 321 | 206 | 114 | 109 |
| S-NH4-1 | 694 | 398 | 445 | 202 | 147 | 236 | 304 | 76 | 81 |
| S-NH4-2 | 603 | 558 | 516 | 196 | 190 | 261 | 285 | 76 | 71 |
| S-NH4-3 | 649 | 506 | 504 | 171 | 165 | 255 | 266 | 86 | 71 |
| MÉDIAS | 649 | 487 | 488 | 190 | 167 | 251 | 285 | 79 | 74 |
| URÉIA-1 | 859 | 580 | 580 | 196 | 379 | 640 | 285 | 200 | 315 |
| UREIA-2 | 825 | 552 | 580 | 202 | 379 | 733 | 304 | 200 | 366 |
| UREIA-3 | 819 | 586 | 592 | 208 | 373 | 727 | 247 | 200 | 366 |
| MÉDIAS | 834 | 573 | 584 | 202 | 377 | 700 | 279 | 200 | 349 |
| C-NH4-1 | 643 | 512 | 458 | 189 | 269 | 621 | 266 | 124 | 305 |
| C-NH4-2 | 632 | 489 | 510 | 159 | 269 | 689 | 266 | 171 | 315 |
| C-NH4-3 | 637 | 432 | 527 | 271 | 263 | 671 | 266 | 162 | 244 |
| MÉDIAS | 637 | 478 | 512 | 206 | 267 | 660 | 266 | 152 | 288 |

TABELA 12. Efeito de diferentes fontes nitrogenadas (testemunha, sulfato de amônio, uréia, citrato de amônio) em meio semi-sintético, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os valores do pH do vinho e açúcares edutores residuais (AR% P/V).

| TRATA- MENTOS | AÇUCARES RESIDUAIS (AR%) | | | | | pH DOS VINHOS | | | | |
|------------------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|---------------|------|------|------|------|
| | AR1 | AR2 | AR3 | AR4 | AR5 | pH1 | pH2 | pH3 | pH4 | pH5 |
| TEST-1 | 0,011 | 0,011 | 0,010 | 0,011 | 0,011 | 3,55 | 3,65 | 3,84 | 4,13 | 4,42 |
| TEST-2 | 0,010 | 0,011 | 0,009 | 0,010 | 0,010 | 3,56 | 3,67 | 3,83 | 4,19 | 4,44 |
| TEST-3 | 0,007 | 0,010 | 0,009 | 0,009 | 0,009 | 3,55 | 3,66 | 3,82 | 4,17 | 4,45 |
| MÉDIAS | 0,009 | 0,011 | 0,009 | 0,010 | 0,010 | 3,55 | 3,66 | 3,82 | 4,17 | 4,44 |
| S-NH4-1 | 0,010 | 0,010 | 0,010 | 0,011 | 0,011 | 2,96 | 2,98 | 3,17 | 3,61 | 3,38 |
| S-NH4-2 | 0,006 | 0,010 | 0,011 | 0,011 | 0,012 | 2,98 | 2,95 | 3,21 | 3,53 | 3,45 |
| S-NH4-3 | 0,003 | 0,009 | 0,011 | 0,011 | 0,012 | 2,99 | 2,95 | 3,13 | 3,62 | 3,37 |
| MÉDIAS | 0,006 | 0,010 | 0,011 | 0,011 | 0,012 | 2,98 | 3,31 | 3,17 | 3,59 | 3,40 |
| URÉIA-1 | 0,005 | 0,009 | 0,009 | 0,011 | 0,008 | 3,62 | 3,79 | 4,03 | 4,49 | 4,76 |
| URÉIA-2 | 0,010 | 0,010 | 0,010 | 0,011 | 0,008 | 3,67 | 3,78 | 4,04 | 4,52 | 4,74 |
| URÉIA-3 | 0,008 | 0,009 | 0,008 | 0,011 | 0,008 | 3,70 | 3,81 | 4,04 | 4,50 | 4,79 |
| MÉDIAS | 0,008 | 0,009 | 0,009 | 0,011 | 0,008 | 3,66 | 3,79 | 4,04 | 4,50 | 4,76 |
| C-NH4-1 | 0,010 | 0,010 | 0,009 | 0,008 | 0,011 | 3,31 | 3,40 | 3,54 | 4,09 | 4,26 |
| C-NH4-2 | 0,011 | 0,009 | 0,009 | 0,009 | 0,011 | 3,32 | 3,38 | 3,56 | 4,10 | 4,29 |
| C-NH4-3 | 0,011 | 0,010 | 0,010 | 0,009 | 0,011 | 3,33 | 3,38 | 3,53 | 4,08 | 4,22 |
| MÉDIAS | 0,011 | 0,010 | 0,009 | 0,010 | 0,011 | 3,32 | 3,39 | 3,54 | 4,09 | 4,26 |

Tabela 13. Efeito de diferentes concentrações de potássio (390, 1170, 4290 E 8190 mgK/l) na forma de KCl, sobre a velocidade de fermentação avaliada pela perda de peso (g) a cada hora, no transcorrer de 5 ciclos fermentativos, empregando-se fermento prensado (Fleischmann) em meio semi-sintético incubado a 33 C. Cada dado representa a média de 3 repetições.

| TRATA- MENTOS | CICLO | PERDA DE PESO (g) | | | | | | |
|------------------|-------|-------------------|------|------|------|------|------|------|
| | | 1h | 2h | 3h | 4h | 5h | 6h | 7h |
| 390mgK/l | 1º | 0,26 | 1,72 | 2,60 | 3,71 | 3,91 | 3,98 | 4,10 |
| | 2º | 1,09 | 2,38 | 3,63 | 4,04 | 4,17 | 4,25 | 4,30 |
| | 3º | 1,29 | 2,39 | 3,88 | 4,10 | 4,21 | 4,25 | 4,34 |
| | 4º | 0,71 | 2,42 | 2,65 | 4,11 | 4,28 | 4,35 | 4,40 |
| | 5º | 0,88 | 2,24 | 3,17 | 4,00 | 4,25 | 4,33 | 4,46 |
| MÉDIAS | | 0,85 | 2,23 | 3,40 | 3,99 | 4,16 | 4,23 | 4,33 |
| 1170mgK/l | 1º | 0,24 | 1,66 | 2,60 | 3,70 | 3,89 | 3,95 | 4,05 |
| | 2º | 0,98 | 2,24 | 3,60 | 4,02 | 4,12 | 4,23 | 4,30 |
| | 3º | 1,15 | 2,23 | 3,84 | 4,14 | 4,30 | 4,39 | 4,46 |
| | 4º | 0,69 | 2,30 | 3,55 | 4,11 | 4,28 | 4,37 | 4,43 |
| | 5º | 0,84 | 2,14 | 3,02 | 3,99 | 4,24 | 4,33 | 4,37 |
| MÉDIAS | | 0,78 | 2,11 | 3,32 | 3,99 | 4,17 | 4,25 | 4,33 |
| 4290mgK/l | 1º | 0,25 | 1,71 | 2,63 | 3,70 | 3,89 | 3,95 | 4,05 |
| | 2º | 1,01 | 2,45 | 3,56 | 4,03 | 4,16 | 4,26 | 4,31 |
| | 3º | 1,07 | 2,14 | 3,74 | 4,13 | 4,24 | 4,33 | 4,40 |
| | 4º | 0,62 | 2,29 | 3,57 | 4,14 | 4,32 | 4,37 | 4,42 |
| | 5º | 1,31 | 2,48 | 3,43 | 4,00 | 4,30 | 4,36 | 4,40 |
| MÉDIAS | | 0,79 | 2,21 | 3,39 | 4,00 | 4,18 | 4,25 | 4,32 |
| 8190mgK/l | 1º | 0,33 | 1,74 | 2,62 | 3,67 | 3,96 | 4,04 | 4,15 |
| | 2º | 0,86 | 2,03 | 3,30 | 3,71 | 4,05 | 4,20 | 4,28 |
| | 3º | 1,05 | 2,16 | 3,73 | 4,14 | 4,27 | 4,36 | 4,42 |
| | 4º | 0,60 | 2,42 | 3,65 | 4,19 | 4,37 | 4,39 | 4,43 |
| | 5º | 1,12 | 2,71 | 3,68 | 3,90 | 4,46 | 4,37 | 4,40 |
| MÉDIAS | | 0,79 | 2,21 | 3,40 | 3,93 | 4,22 | 4,27 | 4,34 |

Tabela 14. Efeito de diferentes concentrações de potássio (390, 1170, 4290 e 8190 mgK/l) na forma de KCl, em meio semi-sintético, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: eficiência fermentativa; formação de glicerol (g/100g de Etanol) e peso de fermento (g).

| TRATAMENTOS | EFICIENCIA | | | | | GLICEROL(g/100gEtOH) | | | | | PESO DE FERMENTO (g) | | | | |
|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------------------|------------|------------|------------|------------|----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | E1 | E2 | E3 | E4 | E5 | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 |
| 390mgK/l | 84,4 | 87,4 | 88,6 | 88,7 | 89,2 | 9,9 | 8,0 | 7,9 | 7,8 | 8,2 | 10,3 | 10,5 | 10,4 | 10,5 | 10,7 |
| 390mgK/l | 85,7 | 87,7 | 88,4 | 89,2 | 89,2 | 9,8 | 8,0 | 7,8 | 7,6 | 10,4 | 10,4 | 10,6 | 10,6 | 10,7 | 10,9 |
| 390mgK/l | 84,6 | 87,0 | 88,5 | 89,4 | 88,9 | 9,9 | 8,1 | 7,8 | 7,5 | 7,7 | 10,4 | 10,7 | 10,8 | 10,8 | 10,9 |
| MÉDIAS | 84,9 | 87,4 | 88,5 | 88,5 | 89,1 | 9,9 | 8,0 | 7,8 | 7,6 | 7,7 | 10,4 | 10,6 | 10,6 | 10,7 | 10,8 |
| 1170mgK/l | 85,1 | 87,5 | 88,1 | 88,1 | 88,7 | 9,7 | 8,1 | 7,7 | 7,4 | 8,2 | 10,8 | 11,2 | 11,1 | 10,9 | 10,5 |
| 1170mgK/l | 85,9 | 88,1 | 88,7 | 88,3 | 88,4 | 9,6 | 7,7 | 7,7 | 7,3 | 7,9 | 10,7 | 11,2 | 11,0 | 10,4 | 9,9 |
| 1170mgK/l | 83,7 | 88,1 | 89,4 | 87,9 | 88,7 | 9,8 | 7,8 | 7,5 | 7,3 | 7,2 | 10,9 | 11,3 | 11,3 | 10,8 | 10,5 |
| MÉDIAS | 84,9 | 87,9 | 88,8 | 88,1 | 88,7 | 9,7 | 7,9 | 7,6 | 7,3 | 7,8 | 10,8 | 11,2 | 11,1 | 10,7 | 10,2 |
| 4290mgK/l | 83,8 | 87,6 | 89,9 | 88,7 | 89,3 | 9,8 | 8,1 | 7,5 | 7,5 | 7,9 | 10,1 | 11,0 | 11,2 | 11,1 | 11,1 |
| 4290mgK/l | 83,9 | 87,6 | 88,5 | 88,2 | 87,2 | 10,0 | 8,1 | 7,7 | 7,4 | 8,0 | 10,7 | 11,1 | 11,1 | 11,2 | 10,8 |
| 4290mgK/l | 84,1 | 88,4 | 89,8 | 88,9 | 89,4 | 10,0 | 7,9 | 7,5 | 7,6 | 7,7 | 10,8 | 11,2 | 11,2 | 11,2 | 11,2 |
| MÉDIAS | 83,9 | 87,9 | 89,4 | 88,6 | 88,6 | 9,9 | 8,0 | 7,6 | 7,5 | 7,9 | 10,7 | 11,1 | 11,2 | 11,2 | 11,0 |
| 8190mgK/l | 83,6 | 87,4 | 88,4 | 88,1 | 89,3 | 10,2 | 8,8 | 8,3 | 8,2 | 8,3 | 10,3 | 10,9 | 11,0 | 11,3 | 11,4 |
| 8190mgK/l | 83,7 | 86,9 | 89,5 | 88,0 | 88,3 | 10,2 | 8,6 | 8,0 | 8,0 | 8,5 | 10,3 | 11,1 | 11,1 | 11,2 | 11,2 |
| 8190mgK/l | 83,8 | 87,3 | 88,4 | 88,1 | 89,2 | 10,2 | 8,5 | 8,5 | 8,0 | 8,6 | 10,4 | 11,0 | 11,1 | 11,4 | 11,3 |
| MÉDIAS | 83,7 | 87,2 | 88,8 | 88,2 | 88,9 | 10,2 | 8,6 | 8,3 | 8,1 | 8,5 | 10,3 | 11,0 | 11,1 | 11,3 | 11,3 |

Tabela 15. Efeito de diferentes concentrações de potássio (390, 1170, 4290 e 8190 mgK/l) na forma de KCl em meio semi-sintético, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: viabilidade celular (%), teor de trealose na célula (% M.S.) antes de iniciar a fermentação e ao final do último ciclo e contaminação bacteriana (nº de bactérias x 10⁻⁶ ml vinho).

| TRATA- MENTOS | VIABILIDADE (%) | | | | | BACTÉRIAS(cels/mlx10 ⁻⁶) | | | | | TREALOSE (%) | |
|------------------|-----------------|----|----|----|----|--------------------------------------|-----|-----|-----|-----|--------------|-------|
| | V1 | V2 | V3 | V4 | V5 | BC1 | BC2 | BC3 | BC4 | BC5 | INICIAL | FINAL |
| 390mgK/l | 91 | 83 | 68 | 57 | 40 | 0,7 | 0,1 | 0,7 | 0,4 | 1,1 | 0,69 | 0,93 |
| 390mgK/l | 91 | 82 | 64 | 61 | 58 | 0,4 | 0,7 | 0,4 | 0,7 | 0,7 | 0,67 | 0,62 |
| 390mgK/l | 92 | 87 | 77 | 66 | 60 | 0,4 | 0,1 | 0,7 | 1,1 | 1,1 | - | 0,70 |
| MÉDIAS | 91 | 84 | 70 | 61 | 55 | 0,5 | 0,3 | 0,6 | 0,7 | 1,0 | 0,65 | 0,75 |
| 1170mgK/l | 92 | 87 | 76 | 60 | 52 | 1,5 | 0,3 | 0,4 | 0,4 | 1,9 | 0,64 | 0,29 |
| 1170mgK/l | 91 | 90 | 74 | 62 | 43 | 0,7 | 1,1 | 1,1 | 0,1 | 1,1 | 0,67 | 0,29 |
| 1170mgK/l | 94 | 90 | 76 | 60 | 47 | 0,7 | 0,4 | 0,7 | 0,4 | 1,0 | - | 0,54 |
| MÉDIAS | 92 | 89 | 75 | 61 | 47 | 1,7 | 0,7 | 0,7 | 0,3 | 1,3 | 0,65 | 0,37 |
| 4290mgK/l | 90 | 87 | 81 | 77 | 64 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 0,4 | 0,64 | 1,72 |
| 4290mgK/l | 92 | 89 | 82 | 77 | 66 | 1,5 | 0,4 | 0,7 | 1,1 | 0,4 | 0,67 | 1,72 |
| 4290mgK/l | 94 | 90 | 82 | 68 | 66 | 1,1 | 0,4 | 0,7 | 0,4 | 0,7 | - | 1,82 |
| MÉDIAS | 92 | 89 | 82 | 73 | 65 | 1,2 | 0,6 | 0,8 | 0,9 | 0,5 | 0,65 | 1,75 |
| 8190mgK/l | 91 | 91 | 86 | 73 | 71 | 0,7 | 0,7 | 0,4 | 0,4 | 0,1 | 0,64 | 1,76 |
| 8190mgK/l | 96 | 92 | 89 | 84 | 75 | 0,4 | 1,1 | 0,7 | 1,1 | 0,7 | 0,67 | 2,04 |
| 8190mgK/l | 96 | 92 | 81 | 81 | 77 | 0,7 | 0,4 | 0,4 | 0,7 | 0,4 | - | 2,07 |
| MÉDIAS | 94 | 92 | 85 | 79 | 74 | 0,6 | 0,7 | 0,5 | 0,7 | 0,4 | 0,65 | 1,96 |

Tabela 16. Efeito de diferentes concentrações de potássio (390, 1170, 4290 e 8190mgK/l) na forma de KCl em meio semi-sintético, em três dos cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: formação de ácido succínico (mg/l vinho); formação de ácido lático (mg/l vinho) e formação de ácido acético (mg/l vinho), já descontados os teores dos ácidos presentes no meio.

| TRATA- MENTOS | AC.SUCCINICO(mg/l) | | | AC.LATICO(mg/l) | | | AC.ACETICO(mg/l) | | |
|------------------|--------------------|------------|------------|-----------------|------------|------------|------------------|------------|------------|
| | SUC1 | SUC3 | SUC5 | LAC1 | LAC3 | LAC5 | ACT1 | ACT3 | ACT5 |
| 390mgK/l | 300 | 362 | 299 | 85 | 157 | 223 | 103 | 175 | 241 |
| 390mgK/l | 415 | 378 | 284 | 109 | 133 | 187 | 127 | 151 | 223 |
| 390mgK/l | 405 | 352 | 305 | 115 | 169 | 181 | 133 | 187 | 214 |
| MÉDIAS | 373 | 364 | 296 | 103 | 153 | 197 | 121 | 171 | 226 |
| 1170mgK/l | 363 | 347 | 320 | 79 | 115 | 199 | 97 | 133 | 205 |
| 1170mgK/l | 341 | 299 | 331 | 79 | 115 | 223 | 97 | 133 | 205 |
| 1170mgK/l | 394 | 336 | 315 | 85 | 109 | 169 | 103 | 127 | 294 |
| MÉDIAS | 366 | 327 | 322 | 81 | 113 | 197 | 99 | 131 | 235 |
| 4290mgK/l | 399 | 260 | 368 | 35 | 48 | 72 | 66 | 66 | 178 |
| 4290mgK/l | 347 | 247 | 347 | 42 | 48 | 85 | 60 | 66 | 214 |
| 4290mgK/l | 405 | 289 | 320 | 42 | 60 | 66 | 60 | 78 | 178 |
| MÉDIAS | 384 | 268 | 345 | 40 | 52 | 74 | 62 | 70 | 190 |
| 8190mgK/l | 426 | 231 | 205 | 12 | 24 | 18 | 30 | 42 | 134 |
| 8190mgK/l | 357 | 231 | 268 | 6 | 12 | 24 | 24 | 30 | 125 |
| 8190mgK/l | 341 | 189 | 284 | 12 | 24 | 48 | 30 | 42 | 161 |
| MÉDIAS | 375 | 217 | 252 | 10 | 20 | 30 | 28 | 38 | 140 |
| MOSTO | 26 | - | - | 36 | - | - | 18 | - | - |

Tabela 17 . Efeito de diferentes concentrações de potássio (390, 1170, 4290 e 8190 mgK/l) em meio semi-sintético, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os valores de pH do vinho e açúcares redutores residuais (AR% P/V).

| TRATA- MENTOS | AÇUCARES RESIDUAIS (AR%) | | | | | pH DOS VINHOS | | | | |
|------------------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|---------------|------|------|------|------|
| | AR1 | AR2 | AR3 | AR4 | AR5 | pH1 | pH2 | pH3 | pH4 | pH5 |
| 390mg/l-1 | 0,018 | 0,019 | 0,018 | 0,020 | 0,020 | 3,15 | 3,14 | 3,11 | 3,13 | 3,06 |
| 390mg/l-2 | 0,017 | 0,017 | 0,018 | 0,017 | 0,019 | 3,22 | 3,28 | 3,18 | 3,24 | 3,16 |
| 390mg/l-3 | 0,017 | 0,017 | 0,019 | 0,018 | 0,018 | 3,19 | 3,23 | 3,13 | 3,20 | 3,09 |
| MÉDIAS | 0,017 | 0,018 | 0,018 | 0,018 | 0,019 | 3,19 | 3,22 | 3,14 | 3,19 | 3,10 |
| 1170mg/l-1 | 0,015 | 0,015 | 0,015 | 0,016 | 0,018 | 3,19 | 3,35 | 3,23 | 3,33 | 3,10 |
| 1170mg/l-2 | 0,017 | 0,017 | 0,018 | 0,019 | 0,028 | 3,22 | 3,40 | 3,33 | 3,51 | 3,19 |
| 1170mg/l-3 | 0,017 | 0,017 | 0,017 | 0,018 | 0,023 | 3,24 | 3,35 | 3,35 | 3,46 | 3,32 |
| MÉDIAS | 0,016 | 0,016 | 0,017 | 0,018 | 0,023 | 3,22 | 3,37 | 3,30 | 3,43 | 3,20 |
| 4290mg/l-1 | 0,015 | 0,015 | 0,016 | 0,015 | 0,015 | 3,22 | 3,42 | 3,35 | 3,38 | 3,27 |
| 4290mg/l-2 | 0,017 | 0,018 | 0,018 | 0,017 | 0,016 | 3,32 | 3,42 | 3,33 | 3,42 | 3,29 |
| 4290mg/l-3 | 0,016 | 0,017 | 0,016 | 0,016 | 0,014 | 3,30 | 3,41 | 3,34 | 3,33 | 3,30 |
| MÉDIAS | 0,016 | 0,017 | 0,017 | 0,016 | 0,015 | 3,28 | 4,42 | 3,36 | 3,77 | 3,29 |
| 8190mg/l-1 | 0,015 | 0,016 | 0,016 | 0,015 | 0,014 | 3,45 | 3,45 | 3,34 | 3,38 | 3,34 |
| 8190mg/l-2 | 0,015 | 0,015 | 0,017 | 0,015 | 0,014 | 3,46 | 3,50 | 3,38 | 3,44 | 3,32 |
| 8190mg/l-3 | 0,015 | 0,016 | 0,018 | 0,016 | 0,015 | 3,45 | 3,44 | 3,33 | 3,37 | 3,22 |
| MÉDIAS | 0,015 | 0,016 | 0,017 | 0,015 | 0,014 | 3,46 | 4,46 | 3,35 | 3,40 | 3,29 |

Tabela 18. Efeito de diferentes concentrações de potássio (2000, 4000 e 8000 mgK/l) na forma de K_2SO_4 sobre a velocidade de fermentação avaliada pela perda de peso (em g) a cada hora, no transcorrer de seis ciclos fermentativos, empregando-se meio de melão e fermento prensado (Fleischmann) a 33 C. Cada dado representa a média de 4 repetições.

| TRATA- MENTOS | CICLO | PERDA DE PESO (g) | | | | | | |
|------------------|-------|-------------------|------|------|------|------|------|------|
| | | 1h | 2h | 3h | 4h | 5h | 6h | 7h |
| 2000mgK/l | 1º | 0,35 | 1,20 | 2,02 | 3,11 | 3,71 | 3,85 | 3,90 |
| | 2º | 0,70 | 1,50 | 2,67 | 3,53 | 3,84 | 3,91 | 3,97 |
| | 3º | 0,78 | 2,53 | 2,99 | 3,19 | 3,23 | 3,26 | 3,28 |
| | 4º | 1,09 | 2,10 | 3,36 | 3,88 | 3,98 | 4,05 | 4,08 |
| | 5º | 0,48 | 1,60 | 2,76 | 3,67 | 3,94 | 4,10 | 4,16 |
| | 6º | 0,96 | 2,22 | 3,67 | 4,03 | 4,10 | 4,16 | 4,20 |
| MÉDIAS | | 0,73 | 1,86 | 2,91 | 3,57 | 3,80 | 3,86 | 3,93 |
| 4000mgK/l | 1º | 0,34 | 1,18 | 2,04 | 3,18 | 3,76 | 3,88 | 3,92 |
| | 2º | 0,64 | 1,46 | 2,66 | 3,53 | 3,85 | 3,94 | 4,00 |
| | 3º | 0,75 | 2,64 | 3,14 | 3,34 | 3,39 | 3,43 | 3,46 |
| | 4º | 1,03 | 2,03 | 3,32 | 3,88 | 4,00 | 4,07 | 4,11 |
| | 5º | 0,45 | 1,63 | 2,79 | 3,70 | 3,95 | 4,07 | 4,13 |
| | 6º | 0,92 | 2,18 | 3,64 | 4,05 | 4,11 | 4,15 | 4,19 |
| MÉDIAS | | 0,69 | 1,85 | 2,93 | 3,61 | 3,84 | 3,92 | 3,97 |
| 8000mgK/l | 1º | 0,40 | 1,43 | 2,40 | 5,56 | 3,88 | 3,95 | 3,98 |
| | 2º | 0,74 | 1,65 | 2,93 | 3,74 | 3,93 | 4,00 | 4,06 |
| | 3º | 0,75 | 2,60 | 3,35 | 3,87 | 4,05 | 4,12 | 4,16 |
| | 4º | 1,13 | 2,24 | 2,51 | 3,97 | 4,00 | 4,14 | 4,21 |
| | 5º | 0,56 | 1,94 | 3,19 | 3,92 | 4,04 | 4,13 | 4,24 |
| | 6º | 0,86 | 2,20 | 3,64 | 4,05 | 4,12 | 4,17 | 4,21 |
| MÉDIAS | | 0,74 | 2,01 | 3,17 | 3,85 | 4,02 | 4,08 | 4,14 |

Tabela 19. Efeito de diferentes concentrações de potássio (2000, 4000 e 8000mgK/l) na forma K_2SO_4 em meio de melão, ao longo de seis ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: eficiência fermentativa; formação de glicerol (g/100g de Etanol) e peso do fermento (g).

| TRATA- MENTOS | EFICIENCIA | | | | | | GLICEROL(g/100gEtOH) | | | | | | PESO DE FERMENTO (g) | | | | | |
|------------------|------------|------|------|------|------|------|----------------------|------|------|------|------|------|----------------------|------|------|------|------|------|
| | E1 | E2 | E3 | E4 | E5 | E6 | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | G6 | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 |
| 2000mgK/l | 85,7 | 83,5 | 82,1 | 86,1 | 88,3 | 88,3 | 15,4 | 13,8 | 11,6 | 12,4 | 12,6 | 12,0 | 8,75 | 10,4 | 11,0 | 11,9 | 12,4 | 13,4 |
| 2000mgK/l | 84,9 | 83,2 | 82,5 | 84,9 | 88,9 | 87,0 | 15,6 | 13,9 | 11,6 | 12,6 | 12,3 | 12,2 | 8,78 | 10,3 | 11,2 | 12,0 | 12,4 | 13,5 |
| 2000mgK/l | 85,7 | 85,2 | 82,3 | 86,3 | 88,5 | 88,3 | 15,4 | 13,6 | 11,7 | 12,5 | 12,3 | 12,1 | 8,72 | 10,3 | 11,0 | 11,9 | 12,5 | 13,4 |
| 2000mgK/l | 85,0 | 85,2 | 82,2 | 85,9 | 88,8 | 87,0 | 15,7 | 13,3 | 11,6 | 12,7 | 12,3 | 12,3 | 8,79 | 10,4 | 11,4 | 11,9 | 12,4 | 13,6 |
| MÉDIAS | 85,3 | 84,3 | 82,3 | 85,8 | 88,6 | 87,6 | 15,5 | 13,6 | 11,6 | 12,5 | 12,4 | 12,1 | 8,76 | 10,3 | 10,1 | 11,9 | 12,4 | 13,5 |
| 4000mgK/l | 84,8 | 84,3 | 81,7 | 85,0 | 87,6 | 88,5 | 15,3 | 13,5 | 11,6 | 12,8 | 12,4 | 12,1 | 8,55 | 10,1 | 10,7 | 11,6 | 12,0 | 13,1 |
| 4000mgK/l | 85,0 | 85,2 | 81,9 | 85,0 | 88,0 | 88,1 | 15,3 | 13,6 | 11,8 | 12,7 | 12,5 | 12,3 | 8,74 | 10,2 | 11,0 | 11,7 | 12,3 | 13,3 |
| 4000mgK/l | 84,9 | 83,3 | 81,8 | 85,0 | 88,9 | 88,2 | 15,3 | 14,0 | 11,9 | 12,8 | 12,4 | 12,1 | 8,72 | 10,1 | 11,0 | 11,5 | 12,2 | 13,3 |
| 4000mgK/l | 85,0 | 83,2 | 81,6 | 85,0 | 87,8 | 88,2 | 15,3 | 13,8 | 11,7 | 12,6 | 12,6 | 12,1 | 8,56 | 10,2 | 11,2 | 11,4 | 12,0 | 13,2 |
| MÉDIAS | 84,9 | 84,0 | 81,7 | 85,0 | 88,1 | 88,2 | 15,3 | 13,7 | 11,7 | 12,7 | 12,5 | 12,1 | 8,64 | 10,1 | 11,0 | 11,5 | 12,1 | 13,2 |
| 8000mgK/l | 85,9 | 83,0 | 80,7 | 87,0 | 88,4 | 88,0 | 15,4 | 13,6 | 13,1 | 12,7 | 12,5 | 12,1 | 8,46 | 9,7 | 10,2 | 11,5 | 11,9 | 12,5 |
| 8000mgK/l | 84,8 | 83,2 | 80,1 | 86,9 | 88,4 | 87,7 | 15,6 | 13,9 | 13,2 | 12,6 | 12,5 | 12,2 | 8,45 | 9,7 | 10,3 | 11,5 | 11,8 | 12,5 |
| 8000mgK/l | 84,8 | 83,2 | 80,4 | 86,9 | 88,6 | 87,4 | 15,7 | 13,9 | 14,6 | 12,6 | 12,6 | 12,2 | 8,53 | 9,6 | 10,3 | 11,2 | 11,7 | 12,4 |
| 8000mgK/l | 85,0 | 83,4 | 80,2 | 89,0 | 88,5 | 87,9 | 15,7 | 14,1 | 14,6 | 12,7 | 12,6 | 12,2 | 8,49 | 9,7 | 10,5 | 11,2 | 11,7 | 12,5 |
| MÉDIAS | 85,1 | 83,2 | 80,3 | 87,4 | 88,5 | 87,7 | 15,6 | 13,9 | 13,9 | 12,6 | 12,5 | 12,2 | 8,48 | 9,7 | 10,3 | 11,3 | 11,8 | 12,5 |

Tabela 20. Efeito de diferentes concentrações de potássio (2000, 4000 e 8000 mgK/l) na forma K_2SO_4 em meio de melão, ao longo de seis ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: viabilidade celular (%); teor de trealose na célula (% M.S.) antes de iniciar a fermentação e ao final do último ciclo e contaminação bacteriana (n° de bactérias $\times 10^{-6}$ mg/l vinho).

| TRATA- MENTOS | VIABILIDADE (%) | | | | | | BACTÉRIAS (cels/ml $\times 10^{-6}$) | | | | | | TREALOSE (%) | |
|------------------|-----------------|-----|-----|-----|----|-----|---------------------------------------|------|------|------|------|------|--------------|-------|
| | V1 | V2 | V3 | V4 | V5 | V6 | BC1 | BC2 | BC3 | BC4 | BC5 | BC6 | INICIAL | FINAL |
| 2000mgK/l | 99 | 100 | 100 | 99 | 98 | 97 | 12,8 | 10,5 | 7,5 | 21,4 | 23,7 | 19,2 | 4,19 | 4,66 |
| 2000mgK/l | 99 | 97 | 100 | 97 | 99 | 98 | 14,7 | 8,3 | 7,1 | 6,8 | 16,2 | 9,8 | 4,42 | 4,88 |
| 2000mgK/l | 99 | 100 | 99 | 98 | 99 | 100 | 10,2 | 8,6 | 6,0 | 10,5 | 7,5 | 4,9 | - | 5,04 |
| 2000mgK/l | 99 | 99 | 98 | 100 | 98 | 98 | 15,0 | 13,9 | 5,3 | 6,4 | 7,9 | 7,1 | - | 4,94 |
| MÉDIAS | 99 | 99 | 99 | 98 | 98 | 98 | 13,2 | 10,3 | 6,5 | 11,3 | 13,8 | 10,2 | 4,25 | 4,88 |
| 4000mgK/l | 99 | 100 | 98 | 98 | 96 | 98 | 14,7 | 7,5 | 12,0 | 5,3 | 5,6 | 6,4 | 4,19 | 3,30 |
| 4000mgK/l | 99 | 100 | 99 | 98 | 97 | 92 | 10,2 | 6,0 | 5,3 | 8,3 | 9,8 | 6,8 | 4,32 | 3,34 |
| 4000mgK/l | 98 | 99 | 99 | 98 | 98 | 99 | 24,1 | 9,8 | 8,6 | 6,4 | 6,8 | 8,3 | - | 3,35 |
| 4000mgK/l | 94 | 100 | 98 | 97 | 98 | 96 | 10,5 | 10,2 | 18,4 | 3,2 | 5,6 | 11,7 | - | 3,02 |
| MÉDIAS | 97 | 100 | 98 | 97 | 97 | 96 | 14,9 | 8,4 | 11,5 | 5,8 | 6,9 | 8,3 | 4,25 | 3,23 |
| 8000mgK/l | 99 | 99 | 99 | 97 | 96 | 96 | 6,0 | 7,5 | 5,3 | 16,6 | 6,4 | 6,4 | 4,19 | 2,35 |
| 8000mgK/l | 99 | 96 | 99 | 98 | 98 | 95 | 10,9 | 8,3 | 7,1 | 6,8 | 7,9 | 9,4 | 4,32 | 2,26 |
| 8000mgK/l | 99 | 100 | 99 | 99 | 96 | 94 | 18,8 | 7,1 | 7,9 | 4,5 | 4,5 | 13,5 | - | 2,78 |
| 8000mgK/l | 97 | 99 | 98 | 96 | 99 | 97 | 22,9 | 6,8 | 5,3 | 14,3 | 7,1 | 7,5 | - | 3,10 |
| MÉDIAS | 98 | 98 | 99 | 97 | 97 | 95 | 14,6 | 7,4 | 6,4 | 10,5 | 6,5 | 9,2 | 4,25 | 2,65 |

Tabela 21. Efeito de diferentes concentrações de potássio (2000 e 8000 mgK/l) na forma K_2SO_4 em meio de melão, em dois dos seis ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: formação de ácido succínico (mg/l vinho); formação de ácido láctico (mg/l vinho) e formação de ácido acético (mg/l vinho), já descontados os teores dos ácidos presentes no meio.

| TRATA- MENTOS | AC.SUCCINICO(mg/l) | | AC.LATICO(mg/l) | | AC.ACÉTICO(mg/l) | |
|------------------|--------------------|------------|-----------------|------------|------------------|------------|
| | SUC1 | SUC6 | LAC1 | LAC6 | ACT1 | ACT6 |
| 2000mgK/l | 494 | 440 | 285 | 195 | 249 | 317 |
| 2000mgK/l | 553 | 427 | 280 | 157 | 222 | 283 |
| 2000mgK/l | 562 | 399 | 292 | 135 | 237 | 283 |
| 2000mgK/l | 603 | 427 | 262 | 105 | 181 | 271 |
| MÉDIAS | 553 | 423 | 280 | 148 | 222 | 288 |
| 8000mgK/l | 575 | 359 | 135 | 14 | 45 | 102 |
| 8000mgK/l | 548 | 359 | 135 | 0 | 113 | 56 |
| 8000mgK/l | 548 | 328 | 172 | 7 | 135 | 68 |
| 8000mgK/l | 508 | 284 | 187 | 0 | 158 | 45 |
| MÉDIAS | 545 | 332 | 157 | 5 | 113 | 68 |
| MOSTO | 115 | - | 83 | - | 193 | - |

Tabela 22. Efeito de diferentes concentrações de potássio (2000, 4000 e 8000 mgK/l) na forma K_2SO_4 em meio de melão, ao longo de seis ciclos fermentativos, sobre os valores de pH do vinho e açúcares redutores residuais (AR% P/V).

| TRATA- MENTOS | AÇUCARES RESIDUAIS (AR%) | | | | | | pH DOS VINHOS | | | | | |
|------------------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|---------------|------|------|------|------|------|
| | AR1 | AR2 | AR3 | AR4 | AR5 | AR6 | pH1 | pH2 | pH3 | pH4 | pH5 | pH6 |
| 2000mg/l-1 | 0,352 | 0,363 | 0,280 | 0,360 | 0,355 | 0,340 | 4,23 | 4,18 | 4,26 | 4,21 | 4,23 | 4,23 |
| 2000mg/l-2 | 0,360 | 0,352 | 0,276 | 0,352 | 0,347 | 0,336 | 4,24 | 4,20 | 4,26 | 4,21 | 4,22 | 4,23 |
| 2000mg/l-3 | 0,337 | 0,356 | 0,284 | 0,352 | 0,339 | 0,316 | 4,23 | 4,22 | 4,26 | 4,21 | 4,23 | 4,24 |
| 2000mg/l-4 | 0,333 | 0,337 | 0,272 | 0,340 | 0,327 | 0,320 | 4,22 | 4,22 | 4,26 | 4,21 | 4,23 | 4,25 |
| MÉDIAS | 0,346 | 0,348 | 0,278 | 0,351 | 0,342 | 0,328 | 4,23 | 4,21 | 4,26 | 4,21 | 4,23 | 4,24 |
| 4000mg/l-1 | 0,326 | 0,356 | 0,257 | 0,367 | 0,327 | 0,312 | 4,22 | 4,24 | 4,29 | 4,23 | 4,25 | 4,26 |
| 4000mg/l-2 | 0,314 | 0,329 | 0,261 | 0,313 | 0,319 | 0,305 | 4,21 | 4,24 | 4,29 | 4,24 | 4,24 | 4,27 |
| 4000mg/l-3 | 0,341 | 0,337 | 0,296 | 0,352 | 0,343 | 0,312 | 4,21 | 4,25 | 4,27 | 4,24 | 4,24 | 4,29 |
| 4000mg/l-4 | 0,352 | 0,352 | 0,303 | 0,348 | 0,363 | 0,336 | 4,23 | 4,25 | 4,27 | 4,21 | 4,27 | 4,29 |
| MÉDIAS | 0,333 | 0,344 | 0,279 | 0,345 | 0,338 | 0,316 | 4,22 | 4,24 | 4,28 | 4,23 | 4,25 | 4,28 |
| 8000mg/l-1 | 0,360 | 0,344 | 0,327 | 0,348 | 0,343 | 0,324 | 4,26 | 4,29 | 4,23 | 4,23 | 4,26 | 4,28 |
| 8000mg/l-2 | 0,364 | 0,363 | 0,346 | 0,368 | 0,367 | 0,348 | 4,23 | 4,28 | 4,29 | 4,24 | 4,26 | 4,29 |
| 8000mg/l-3 | 0,356 | 0,352 | 0,397 | 0,372 | 0,363 | 0,336 | 4,24 | 4,29 | 4,28 | 4,24 | 4,26 | 4,29 |
| 8000mg/l-4 | 0,349 | 0,359 | 0,401 | 0,364 | 0,359 | 0,340 | 4,25 | 4,28 | 4,29 | 4,24 | 4,26 | 4,29 |
| MÉDIAS | 0,357 | 0,355 | 0,368 | 0,363 | 0,358 | 0,337 | 4,25 | 4,29 | 4,29 | 4,24 | 4,26 | 4,29 |

Tabela 23. Efeito de diferentes concentrações de sulfito (0, 100 e 300mg SO₂/l) sobre a velocidade de fermentação avaliada pela perda de peso (g) a cada hora, no transcorrer de seis ciclos fermentativos, empregando-se fermento prensado (Fleischmann) e meio semi-sintético incubados a 33 C. Cada dado representa a média de 4 repetições.

| TRATA- MENTOS | CICLO | PERDA DE PESO (g) | | | | | | |
|-------------------------------|-------|-------------------|------|------|------|------|------|------|
| | | 1h | 2h | 3h | 4h | 5h | 6h | 7h |
| TEST 0mgSO ₂ /l | 1º | 1,00 | 2,79 | 3,67 | 3,83 | 3,90 | 3,91 | 3,97 |
| | 2º | 1,62 | 3,65 | 3,96 | 4,02 | 4,17 | 4,22 | 4,36 |
| | 3º | 1,79 | 3,85 | 4,10 | 4,37 | 4,41 | 4,47 | 4,49 |
| | 4º | 2,18 | 3,94 | 4,11 | 4,23 | 4,30 | 4,35 | 4,41 |
| | 5º | 2,40 | 3,89 | 4,05 | 4,17 | 4,25 | 4,30 | 4,36 |
| | 6º | 1,89 | 3,41 | 3,46 | 3,54 | 3,64 | 3,78 | 3,80 |
| MÉDIAS | | 1,81 | 3,59 | 3,89 | 4,03 | 4,11 | 4,17 | 4,23 |
| 100mgSO ₂ /l | 1º | 0,63 | 2,32 | 3,42 | 3,87 | 3,94 | 3,97 | 4,02 |
| | 2º | 1,46 | 3,47 | 3,96 | 4,04 | 4,14 | 4,18 | 4,25 |
| | 3º | 1,70 | 3,68 | 4,03 | 4,19 | 4,24 | 4,30 | 4,35 |
| | 4º | 1,86 | 3,83 | 4,10 | 4,21 | 4,29 | 4,36 | 4,41 |
| | 5º | 1,97 | 3,68 | 3,96 | 4,14 | 4,23 | 4,28 | 4,39 |
| | 6º | 1,81 | 3,35 | 3,39 | 3,48 | 3,57 | 3,62 | 3,67 |
| MÉDIAS | | 1,57 | 3,39 | 3,82 | 3,99 | 4,07 | 4,12 | 4,18 |
| 300mgSO ₂ /l | 1º | 0,78 | 2,28 | 3,32 | 3,87 | 3,95 | 3,98 | 4,01 |
| | 2º | 1,24 | 3,18 | 3,95 | 4,04 | 4,14 | 4,19 | 4,27 |
| | 3º | 1,44 | 3,44 | 4,05 | 4,17 | 4,22 | 4,29 | 4,31 |
| | 4º | 1,97 | 3,79 | 4,07 | 4,19 | 4,25 | 4,33 | 4,39 |
| | 5º | 1,73 | 3,37 | 3,96 | 4,15 | 4,22 | 4,29 | 4,34 |
| | 6º | 1,43 | 3,28 | 3,33 | 3,36 | 3,53 | 3,60 | 3,63 |
| MÉDIAS | | 1,43 | 3,22 | 2,78 | 3,96 | 4,05 | 4,12 | 4,15 |

Tabela 24. Efeito de diferentes concentrações de sulfito (0, 100 e 300 mg SO₂/l) em meio semi-sintético, ao longo de seis ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: eficiência fermentativa; formação de glicerol (g/100g de Etanol) e peso de fermento (g).

| TRATA- MENTOS | EFICIÊNCIA | | | | | | GLICEROL(g/100gEtOH) | | | | | | PESO DE FERMENTO (g) | | | | | |
|------------------|------------|------|------|------|------|------|----------------------|------|------|------|------|------|----------------------|------|------|------|------|------|
| | E1 | E2 | E3 | E4 | E5 | E6 | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | G6 | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 |
| TEST.-1 | 83,1 | 83,2 | 82,1 | 83,0 | 83,3 | 85,1 | 13,9 | 11,4 | 10,7 | 9,6 | 9,5 | 8,9 | 13,7 | 14,7 | 15,6 | 16,1 | 16,8 | 17,2 |
| TEST.-2 | 83,1 | 83,4 | 82,1 | 84,3 | 83,7 | 83,3 | 13,9 | 11,4 | 10,8 | 9,7 | 9,5 | 9,7 | 13,7 | 14,7 | 15,6 | 16,1 | 16,8 | 17,4 |
| TEST.-3 | 83,1 | 83,0 | 82,0 | 84,3 | 84,0 | 84,0 | 13,9 | 11,4 | 10,8 | 10,1 | 9,8 | 9,2 | 13,7 | 14,7 | 15,7 | 16,0 | 16,6 | 17,2 |
| TEST.-4 | 83,1 | 83,5 | 82,1 | 84,7 | 83,9 | 84,8 | 13,6 | 11,4 | 10,7 | 9,5 | 9,2 | 9,1 | 13,7 | 14,8 | 15,7 | 16,1 | 16,7 | 17,2 |
| MÉDIAS | 83,1 | 83,3 | 82,1 | 84,1 | 83,7 | 84,2 | 13,8 | 11,4 | 10,7 | 9,7 | 9,5 | 9,2 | 13,7 | 14,7 | 15,6 | 16,1 | 16,7 | 17,2 |
| 100mg/l-1 | 83,3 | 83,2 | 82,3 | 82,0 | 84,1 | 84,0 | 13,6 | 11,4 | 11,1 | 9,8 | 9,6 | 10,3 | 13,5 | 14,4 | 15,4 | 15,9 | 16,1 | 16,8 |
| 100mg/l-2 | 83,0 | 84,0 | 82,2 | 83,3 | 84,2 | 84,7 | 13,6 | 11,0 | 10,8 | 9,7 | 9,8 | 10,2 | 14,0 | 14,4 | 15,4 | 16,0 | 16,4 | 16,7 |
| 100mg/l-3 | 83,5 | 83,3 | 82,3 | 82,0 | 83,4 | 85,6 | 13,6 | 11,2 | 11,2 | 10,2 | 9,6 | 9,6 | 13,6 | 14,7 | 15,5 | 15,9 | 16,4 | 16,7 |
| 100mg/l-4 | 83,0 | 83,4 | 82,2 | 82,4 | 84,6 | 84,4 | 13,8 | 11,2 | 11,2 | 10,2 | 10,2 | 10,0 | 13,6 | 14,6 | 15,4 | 15,9 | 16,2 | 16,7 |
| MÉDIAS | 83,2 | 83,5 | 82,2 | 82,4 | 84,1 | 84,6 | 13,6 | 11,2 | 11,2 | 10,0 | 9,8 | 10,0 | 13,7 | 14,5 | 15,4 | 15,9 | 16,3 | 16,7 |
| 300mg/l-1 | 83,0 | 83,5 | 82,3 | 83,8 | 83,5 | 85,6 | 13,8 | 11,4 | 11,4 | 10,3 | 10,5 | 10,1 | 13,3 | 14,1 | 14,9 | 15,3 | 15,7 | 16,0 |
| 300mg/l-2 | 83,0 | 83,4 | 82,3 | 84,1 | 83,0 | 84,9 | 14,0 | 11,6 | 11,6 | 10,1 | 10,1 | 10,3 | 13,3 | 14,1 | 15,0 | 15,4 | 15,8 | 16,1 |
| 300mg/l-3 | 83,1 | 83,4 | 82,3 | 83,8 | 84,0 | 86,2 | 14,0 | 11,6 | 11,6 | 10,2 | 9,8 | 10,0 | 13,3 | 14,2 | 15,0 | 15,4 | 15,7 | 15,9 |
| 300mg/l-4 | 83,0 | 83,3 | 82,3 | 84,7 | 83,6 | 85,8 | 14,0 | 11,6 | 11,6 | 10,3 | 9,8 | 10,0 | 13,3 | 14,1 | 14,9 | 15,3 | 15,8 | 16,0 |
| MÉDIAS | 83,0 | 83,4 | 82,3 | 84,1 | 83,5 | 85,4 | 12,6 | 11,5 | 11,5 | 10,2 | 10,1 | 10,0 | 13,3 | 14,1 | 14,9 | 15,3 | 15,7 | 16,0 |

Tabela 25. Efeito de diferentes concentrações de sulfito (0, 100 e 300 mg SO₂/l) em meio semi-sintético, ao longo de seis ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: viabilidade celular (%); teor de trealose na célula (% M.S.) antes de iniciar a fermentação e ao final do último ciclo e contaminação bacteriana (nº de bactérias x 10⁻⁶/ml vinho).

| TRATA- MENTOS | VIABILIDADE (%) | | | | | | BACTÉRIAS (cels/ml x 10 ⁻⁶) | | | | | | TREALOSE (%) | |
|------------------|-----------------|----|----|----|----|----|---|-----|------|------|------|------|--------------|-------|
| | V1 | V2 | V3 | V4 | V5 | V6 | BC1 | BC2 | BC3 | BC4 | BC5 | BC6 | INICIAL | FINAL |
| TEST-1 | 97 | 97 | 96 | 95 | 93 | 89 | 2,3 | 6,8 | 7,5 | 17,3 | 6,8 | 35,4 | 2,33 | 2,46 |
| TEST-2 | 99 | 96 | 95 | 94 | 94 | 91 | 2,7 | 5,6 | 7,9 | 21,4 | 9,4 | 26,3 | 2,26 | 0,77 |
| TEST-3 | 98 | 98 | 96 | 93 | 90 | 89 | 1,9 | 4,9 | 10,9 | 18,4 | 10,5 | 19,2 | - | 0,79 |
| TEST-4 | 99 | 98 | 94 | 93 | 94 | 92 | 2,3 | 6,4 | 16,0 | 22,6 | 7,1 | 26,7 | - | 1,03 |
| MÉDIAS | 98 | 97 | 95 | 94 | 93 | 90 | 2,3 | 5,9 | 10,8 | 19,9 | 8,4 | 26,9 | 2,29 | 1,26 |
| 100mg/l-1 | 99 | 98 | 97 | 95 | 93 | 88 | 3,4 | 6,8 | 3,0 | 4,1 | 3,0 | 10,9 | 2,33 | 0,75 |
| 100mg/l-2 | 98 | 97 | 96 | 95 | 88 | 88 | 1,9 | 5,6 | 2,7 | 3,4 | 3,8 | 10,9 | 2,26 | 1,18 |
| 100mg/l-3 | 99 | 98 | 96 | 95 | 94 | 92 | 2,7 | 4,9 | 3,0 | 3,8 | 4,5 | 11,2 | - | 1,35 |
| 100mg/l-4 | 98 | 98 | 93 | 92 | 89 | 90 | 3,0 | 6,4 | 1,9 | 3,0 | 3,8 | 7,5 | - | 1,03 |
| MÉDIAS | 98 | 98 | 95 | 94 | 91 | 89 | 2,7 | 5,9 | 2,6 | 3,6 | 3,8 | 10,1 | 2,26 | 1,08 |
| 300mg/l-1 | 99 | 98 | 94 | 92 | 93 | 88 | 3,7 | 5,3 | 1,9 | 2,3 | 2,7 | 3,4 | 2,33 | 0,92 |
| 300mg/l-2 | 99 | 99 | 96 | 89 | 92 | 90 | 1,1 | 3,0 | 3,0 | 1,9 | 3,0 | 3,4 | 2,26 | 1,16 |
| 300mg/l-3 | 99 | 97 | 95 | 94 | 93 | 92 | 1,5 | 4,1 | 2,7 | 3,0 | 1,9 | 4,5 | - | 1,08 |
| 300mg/l-4 | 98 | 98 | 95 | 91 | 92 | 89 | 1,1 | 4,5 | 1,9 | 2,3 | 3,4 | 5,6 | - | 1,03 |
| MÉDIAS | 99 | 98 | 95 | 91 | 92 | 90 | 1,8 | 4,2 | 2,4 | 2,4 | 2,7 | 4,2 | 2,29 | 1,05 |

Tabela 26. Efeito de diferentes concentrações de sulfito (0, 100 e 300 mg SO₂/l) em meio semi-sintético, em três dos seis ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: formação de ácido succínico (mg/l vinho); formação de ácido lático (mg/l vinho) e formação de ácido acético (mg/l vinho), já descontados os teores dos ácidos presentes no meio.

| TRATA- MENTOS | AC.SUCCÍNICO(mg/l) | | | AC.LÁTICO(mg/l) | | | AC.ACÉTICO(mg/l) | | |
|------------------|--------------------|------|------|-----------------|------|------|------------------|------|------|
| | SUC1 | SUC2 | SUC5 | LAC1 | LAC2 | LAC5 | ACT1 | ACT2 | ACT5 |
| TEST-1 | 744 | 330 | 370 | 222 | 339 | 726 | 304 | 152 | 642 |
| TEST-2 | 710 | 503 | 438 | 222 | 311 | 690 | 304 | 133 | 669 |
| TEST-3 | 833 | 498 | 433 | 201 | 325 | 804 | 361 | 162 | 695 |
| TEST-4 | 699 | 258 | 344 | 284 | 311 | 756 | 323 | 171 | 713 |
| MÉDIAS | 746 | 447 | 396 | 232 | 321 | 744 | 323 | 154 | 680 |
| 100mg/l-1 | 671 | 576 | 528 | 222 | 222 | 286 | 228 | 47 | 52 |
| 100mg/l-2 | 727 | 391 | 554 | 201 | 146 | 267 | 257 | 28 | 52 |
| 100mg/l-3 | 732 | 488 | 465 | 215 | 159 | 243 | 276 | 35 | 43 |
| 100mg/l-4 | 704 | 498 | 507 | 222 | 177 | 279 | 209 | 43 | 47 |
| MÉDIAS | 708 | 488 | 513 | 215 | 176 | 269 | 242 | 38 | 56 |
| 300mg/l-1 | 659 | 456 | 407 | 173 | 141 | 141 | 333 | 26 | 79 |
| 300mg/l-2 | 766 | 530 | 444 | 173 | 141 | 147 | 333 | 43 | 79 |
| 300mg/l-3 | 738 | 524 | 412 | 180 | 147 | 141 | 333 | 43 | 61 |
| 300mg/l-4 | 727 | 440 | 381 | 187 | 147 | 141 | 304 | 39 | 72 |
| MÉDIAS | 722 | 487 | 411 | 178 | 144 | 142 | 326 | 39 | 72 |
| MOSTO | 11 | - | - | 34 | - | - | 19 | - | - |

Tabela 27 . Efeito de diferentes concentrações de sulfito (0, 100 e 300 mgSO₂/l) em meio semi-sintético, ao longo de seis ciclos fermentativos, sobre os valores do pH do vinho e açúcares redutores residuais (AR% P/V).

| TRATA- MENTOS | AÇUCARES RESIDUAIS (AR%) | | | | | | pH DOS VINHOS | | | | | |
|------------------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|---------------|------|------|------|------|------|
| | AR1 | AR2 | AR3 | AR4 | AR5 | AR6 | pH1 | pH2 | pH3 | pH4 | pH5 | pH |
| TEST-1 | 0,013 | 0,012 | 0,012 | 0,010 | 0,010 | 0,008 | 3,39 | 3,56 | 3,67 | 3,88 | 4,02 | 4,17 |
| TEST-2 | 0,013 | 0,012 | 0,012 | 0,011 | 0,009 | 0,009 | 3,39 | 3,56 | 3,65 | 3,88 | 4,00 | 4,12 |
| TEST-3 | 0,012 | 0,011 | 0,011 | 0,010 | 0,009 | 0,008 | 3,39 | 3,57 | 3,65 | 3,86 | 3,99 | 4,13 |
| TEST-4 | 0,012 | 0,011 | 0,011 | 0,008 | 0,008 | 0,007 | 3,39 | 3,58 | 3,69 | 4,00 | 4,08 | 4,20 |
| MÉDIAS | 0,013 | 0,012 | 0,012 | 0,010 | 0,009 | 0,008 | 3,39 | 3,57 | 3,67 | 3,90 | 4,02 | 4,16 |
| 100mg/l-1 | 0,013 | 0,012 | 0,013 | 0,011 | 0,009 | 0,008 | 3,43 | 3,72 | 3,62 | 3,89 | 3,84 | 3,73 |
| 100mg/l-2 | 0,011 | 0,012 | 0,013 | 0,012 | 0,009 | 0,009 | 3,43 | 3,61 | 3,63 | 3,84 | 3,80 | 3,73 |
| 100mg/l-3 | 0,012 | 0,012 | 0,014 | 0,011 | 0,011 | 0,010 | 3,47 | 3,56 | 3,65 | 3,81 | 3,80 | 3,82 |
| 100mg/l-4 | 0,013 | 0,014 | 0,012 | 0,011 | 0,009 | 0,011 | 3,46 | 3,60 | 3,63 | 3,87 | 3,81 | 3,77 |
| MÉDIAS | 0,012 | 0,013 | 0,013 | 0,011 | 0,009 | 0,009 | 3,45 | 3,62 | 3,63 | 3,85 | 3,81 | 3,76 |
| 300mg/l-1 | 0,013 | 0,012 | 0,012 | 0,012 | 0,009 | 0,009 | 3,62 | 3,60 | 3,70 | 4,06 | 3,95 | 3,80 |
| 300mg/l-2 | 0,014 | 0,013 | 0,014 | 0,012 | 0,011 | 0,010 | 3,60 | 3,60 | 3,69 | 3,98 | 3,94 | 3,81 |
| 300mg/l-3 | 0,014 | 0,013 | 0,014 | 0,012 | 0,010 | 0,010 | 3,67 | 3,66 | 3,67 | 4,06 | 3,93 | 3,84 |
| 300mg/l-4 | 0,014 | 0,014 | 0,014 | 0,011 | 0,010 | 0,010 | 3,63 | 3,59 | 3,69 | 4,06 | 3,94 | 3,85 |
| MÉDIAS | 0,014 | 0,013 | 0,014 | 0,012 | 0,010 | 0,010 | 3,63 | 3,61 | 3,69 | 4,04 | 3,94 | 3,83 |

Tabela 28. Efeito de diferentes concentrações de substrato (6, 12 e 18% ART) sobre a velocidade de fermentação avaliada pela perda de peso (g) a cada hora, no transcorrer de 5 ciclos fermentativos, empregando-se meio de melão e fermento prensado (Fleischmann) incubados a 33 C. Cada dado representa a média de 4 repetições.

| TRATA- MENTOS | CICLO | PERDA DE PESO (g) | | | | | |
|------------------|-------|-------------------|------|------|------|------|------|
| | | 1h | 2h | 3h | 4h | 5h | 6h |
| 6% ART | 1º | 0,52 | 1,12 | 1,21 | 1,30 | 1,37 | 1,39 |
| | 2º | 0,16 | 0,77 | 1,06 | 1,14 | 1,23 | 1,30 |
| | 3º | 0,28 | 1,00 | 1,15 | 1,23 | 1,32 | 1,36 |
| | 4º | 0,40 | 1,10 | 1,23 | 1,31 | 1,34 | 1,40 |
| | 5º | 0,35 | 1,06 | 1,33 | 1,40 | 1,44 | 1,49 |
| MÉDIAS | | 0,34 | 1,01 | 1,20 | 1,30 | 1,34 | 1,39 |
| 12% ART | 1º | 0,46 | 1,47 | 2,49 | 2,79 | 2,87 | 2,89 |
| | 2º | 0,26 | 0,94 | 1,85 | 2,55 | 2,82 | 2,93 |
| | 3º | 0,50 | 1,60 | 2,61 | 2,80 | 2,99 | 3,05 |
| | 4º | 0,62 | 1,87 | 2,67 | 2,92 | 3,00 | 3,08 |
| | 5º | 0,81 | 2,17 | 2,94 | 3,04 | 3,09 | 3,15 |
| MÉDIAS | | 0,53 | 1,61 | 2,51 | 2,82 | 2,95 | 3,02 |
| 18% ART | 1º | 0,70 | 1,48 | 2,56 | 3,65 | 4,31 | 4,39 |
| | 2º | 0,32 | 1,02 | 1,95 | 2,85 | 3,99 | 4,46 |
| | 3º | 0,73 | 1,91 | 3,09 | 3,71 | 4,48 | 4,71 |
| | 4º | 0,60 | 1,84 | 2,87 | 3,90 | 4,45 | 4,71 |
| | 5º | 1,24 | 2,66 | 3,77 | 4,48 | 4,70 | 4,82 |
| MÉDIAS | | 0,72 | 1,78 | 2,85 | 3,72 | 4,39 | 4,62 |

Tabela 29. Efeito de diferentes concentrações de substrato (6, 12 e 18% ART) em meio de melão, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: eficiência fermentativa; formação de glicerol (g/100g de Etanol) e peso de fermento (g).

| TRATAMENTOS | EFICIENCIA | | | | | GLICEROL(g/100gEtOH) | | | | | PESO DE FERMENTO (g) | | | | |
|-------------|------------|------|------|------|------|----------------------|------|------|------|------|----------------------|------|------|------|------|
| | E1 | E2 | E3 | E4 | E5 | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 |
| 6%-1 | 86,4 | 80,9 | 79,7 | 86,8 | 71,6 | 20,3 | 16,8 | 16,8 | 16,5 | 15,0 | 10,6 | 11,5 | 12,0 | 12,4 | 12,1 |
| 6%-2 | 86,5 | 81,6 | 82,4 | 87,8 | 87,8 | 19,8 | 16,2 | 16,3 | 15,6 | 14,4 | 10,6 | 11,6 | 12,1 | 12,4 | 12,8 |
| 6%-3 | 86,5 | 79,3 | 83,9 | 86,8 | 88,7 | 19,8 | 16,6 | 15,4 | 16,0 | 14,4 | 10,6 | 11,5 | 12,2 | 12,5 | 13,0 |
| 6%-4 | 86,4 | 79,6 | 81,9 | 86,2 | 90,7 | 19,8 | 16,7 | 15,7 | 15,8 | 15,2 | 10,5 | 11,5 | 12,2 | 12,5 | 13,0 |
| MÉDIAS | 86,4 | 80,6 | 82,0 | 86,9 | 82,1 | 19,9 | 16,6 | 16,0 | 16,0 | 14,7 | 10,6 | 11,5 | 12,1 | 12,4 | 12,9 |
| 12%-1 | 81,9 | 82,8 | 84,2 | 85,1 | 84,6 | 14,2 | 10,5 | 10,5 | 11,0 | 10,7 | 11,1 | 12,3 | 12,9 | 13,2 | 13,9 |
| 12%-2 | 81,9 | 83,5 | 84,0 | 86,0 | 83,6 | 14,2 | 10,4 | 10,5 | 11,0 | 11,1 | 11,2 | 12,3 | 12,9 | 13,2 | 13,8 |
| 12%-3 | 82,0 | 84,2 | 84,1 | 86,1 | 83,4 | 14,4 | 11,0 | 10,3 | 10,5 | 10,9 | 11,1 | 12,4 | 13,1 | 13,6 | 13,9 |
| 12%-4 | 81,9 | 83,6 | 84,2 | 85,6 | 83,5 | 14,4 | 11,0 | 10,4 | 11,0 | 10,9 | 11,1 | 12,4 | 13,1 | 13,7 | 14,0 |
| MÉDIAS | 81,9 | 83,5 | 84,1 | 85,7 | 83,8 | 14,3 | 10,7 | 10,4 | 10,9 | 10,9 | 11,1 | 12,3 | 13,0 | 13,4 | 13,9 |
| 18%-1 | 82,7 | 83,8 | 86,3 | 85,6 | 85,5 | 11,9 | 9,2 | 9,1 | 9,5 | 9,7 | 11,4 | 12,7 | 13,2 | 13,8 | 14,0 |
| 18%-2 | 82,0 | 83,9 | 86,5 | 85,6 | 85,6 | 12,0 | 9,4 | 9,1 | 9,5 | 9,6 | 11,6 | 12,6 | 13,1 | 13,8 | 14,1 |
| 18%-3 | 82,9 | 83,8 | 86,3 | 85,8 | 85,5 | 11,9 | 9,4 | 9,1 | 9,4 | 9,7 | 11,7 | 12,5 | 13,2 | 14,0 | 14,1 |
| 18%-4 | 81,9 | 84,0 | 86,3 | 85,6 | 85,4 | 12,2 | 9,4 | 9,2 | 9,4 | 9,7 | 11,6 | 12,6 | 13,0 | 14,0 | 14,1 |
| MÉDIAS | 82,4 | 83,9 | 86,3 | 85,6 | 85,5 | 12,0 | 9,3 | 9,1 | 9,4 | 9,7 | 11,6 | 12,6 | 13,1 | 13,9 | 14,1 |

Tabela 30. Efeito de diferentes concentrações de substrato (6, 12 e 18% ART) em meio de melão, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: viabilidade celular (%); teor de trealose na célula (% M.S.) antes de iniciar a fermentação e ao final do último ciclo e contaminação bacteriana (n° de bactérias $\times 10^{-6}$ /ml vinho).

| TRATA- MENTOS | VIABILIDADE (%) | | | | | BACTÉRIAS (cels/ml $\times 10^{-6}$) | | | | | TREALOSE (%) | |
|------------------|-----------------|----|----|----|----|---------------------------------------|-----|------|------|-----|--------------|-------|
| | V1 | V2 | V3 | V4 | V5 | BC1 | BC2 | BC3 | BC4 | BC5 | INICIAL | FINAL |
| 6%-1 | 99 | - | 98 | 97 | 98 | 5,3 | 3,8 | 3,0 | 24,1 | 3,4 | - | 4,82 |
| 6%-2 | - | 99 | 99 | 99 | 97 | 6,0 | 5,3 | 2,3 | 4,5 | 3,8 | - | 4,94 |
| 6%-3 | 99 | - | 99 | 97 | 98 | 6,8 | 5,8 | 12,8 | 12,0 | 6,0 | 3,53 | 4,71 |
| 6%-4 | - | 99 | 98 | 98 | 99 | 6,0 | 6,4 | 3,0 | 5,3 | 3,4 | 3,47 | 4,86 |
| MÉDIAS | 99 | 99 | 98 | 98 | 98 | 6,0 | 5,8 | 5,3 | 11,5 | 4,1 | 3,50 | 4,83 |
| 12%-1 | 99 | - | 98 | 94 | 99 | 4,1 | 4,5 | 11,3 | 3,8 | 2,6 | - | 3,90 |
| 12%-2 | - | 97 | 98 | 95 | 98 | 3,7 | 3,4 | 3,8 | 6,0 | 3,8 | - | 3,55 |
| 12%-3 | 98 | - | 98 | 97 | 94 | 3,4 | 3,1 | 12,4 | 14,7 | 3,4 | 3,53 | 4,28 |
| 12%-4 | - | 97 | 98 | 98 | 96 | 3,7 | 5,3 | 4,9 | 10,9 | 4,9 | 3,47 | 4,26 |
| MÉDIAS | 98 | 97 | 98 | 96 | 97 | 3,7 | 4,3 | 8,1 | 8,8 | 3,7 | 3,50 | 4,00 |
| 18%-1 | 99 | - | 95 | 94 | 95 | 10,2 | 5,6 | 3,0 | 6,4 | 7,9 | - | 2,89 |
| 18%-2 | - | 99 | 97 | 96 | 94 | 12,8 | 3,8 | 2,6 | 8,3 | 9,8 | - | 3,05 |
| 18%-3 | 98 | - | 98 | 94 | 92 | 15,4 | 5,6 | 5,3 | 6,0 | 9,8 | 3,53 | 2,93 |
| 18%-4 | - | 98 | 96 | 93 | 97 | 12,4 | 7,5 | 9,4 | 6,8 | 7,7 | 3,47 | 3,01 |
| MÉDIAS | 98 | 98 | 96 | 94 | 94 | 12,8 | 5,6 | 5,1 | 6,9 | 8,8 | 3,50 | 2,97 |

Tabela 31. Efeito de diferentes concentrações de substrato (6 e 18% ART) em meio de melão, em três ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: formação de ácido succínico (mg/l vinho); formação de ácido láctico (mg/l vinho) e formação de ácido acético (mg/l vinho), já descontados os teores dos ácidos presentes nos meios.

| TRATA- MENTOS | AC.SUCCINICO(mg/l) | | | AC.LATICO(mg/l) | | | AC.ACÉTICO(mg/l) | | |
|------------------|--------------------|------------|------------|-----------------|-----------|-----------|------------------|------------|------------|
| | SUC1 | SUC2 | SUC5 | LAC1 | LAC2 | LAC5 | ACT1 | ACT2 | ACT5 |
| 6%-1 | 399 | 230 | 195 | 89 | 19 | 13 | 108 | 137 | 78 |
| 6%-2 | 356 | 253 | 230 | 95 | 19 | 13 | 108 | 137 | 127 |
| 6%-3 | 356 | 224 | 270 | 95 | 13 | 26 | 186 | 118 | 147 |
| 6%-4 | 345 | 230 | 276 | 82 | 19 | 32 | 108 | 127 | 157 |
| MÉDIAS | 349 | 234 | 243 | 90 | 17 | 21 | 127 | 130 | 127 |
| 18%-1 | 563 | 523 | 719 | 51 | 31 | 57 | 128 | 177 | 167 |
| 18%-2 | 546 | 593 | 673 | 63 | 26 | 57 | 108 | 177 | 177 |
| 18%-3 | 644 | 512 | 724 | 70 | 38 | 57 | 147 | 216 | 177 |
| 18%-4 | 632 | 471 | 678 | 70 | 32 | 63 | 167 | 196 | 186 |
| MÉDIAS | 596 | 525 | 698 | 63 | 32 | 58 | 137 | 191 | 177 |
| MOSTO | 23 | - | - | 31 | - | - | 59 | - | - |

Tabela 32. Efeito de diferentes concentrações de substrato (6, 12 e 18% ART) em meio de melão, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os valores de pH do vinho e açúcares redutores residuais (AR% P/V).

| TRATA- MENTOS | AÇÚCARES RESIDUAIS (AR%) | | | | | pH DOS VINHOS | | | | |
|------------------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|---------------|------|------|------|------|
| | AR1 | AR2 | AR3 | AR4 | AR5 | pH1 | pH2 | pH3 | pH4 | pH5 |
| 6% -1 | 0,092 | 0,090 | 0,112 | 0,098 | 0,082 | 4,00 | 3,98 | 4,03 | 4,09 | 4,10 |
| 6% -2 | 0,096 | 0,090 | 0,097 | 0,100 | 0,088 | 4,00 | 3,97 | 4,00 | 4,08 | 4,08 |
| 6% -3 | 0,096 | 0,090 | 0,097 | 0,096 | 0,102 | 4,00 | 3,99 | 4,03 | 4,09 | 4,09 |
| 6% -4 | 0,096 | 0,089 | 0,094 | 0,096 | 0,112 | 4,03 | 3,99 | 4,02 | 4,09 | 4,08 |
| MÉDIAS | 0,095 | 0,090 | 0,100 | 0,097 | 0,096 | 4,01 | 3,98 | 4,02 | 4,09 | 4,09 |
| 12% -1 | 0,112 | 0,108 | 0,111 | 0,115 | 0,114 | 3,74 | 3,76 | 3,86 | 3,93 | 3,93 |
| 12% -2 | 0,108 | 0,107 | 0,112 | 0,114 | 0,112 | 3,74 | 3,80 | 3,86 | 3,95 | 3,95 |
| 12% -3 | 0,113 | 0,106 | 0,115 | 0,122 | 0,119 | 3,77 | 3,82 | 3,81 | 3,85 | 3,85 |
| 12% -4 | 0,115 | 0,104 | 0,115 | 0,122 | 0,120 | 3,77 | 3,82 | 3,83 | 3,91 | 3,91 |
| MÉDIAS | 0,112 | 0,106 | 0,113 | 0,118 | 0,116 | 3,75 | 3,80 | 3,84 | 3,91 | 3,91 |
| 18% -1 | 0,128 | 0,120 | 0,133 | 0,136 | 0,130 | 3,62 | 3,75 | 3,79 | 3,82 | 3,82 |
| 18% -2 | 0,137 | 0,124 | 0,137 | 0,140 | 0,137 | 3,60 | 3,71 | 3,78 | 3,80 | 3,81 |
| 18% -3 | 0,135 | 0,127 | 0,135 | 0,138 | 0,135 | 3,62 | 3,70 | 3,81 | 3,81 | 3,80 |
| 18% -4 | 0,136 | 0,126 | 0,135 | 0,140 | 0,135 | 3,60 | 3,68 | 3,70 | 3,83 | 3,82 |
| MÉDIAS | 0,134 | 0,124 | 0,135 | 0,138 | 0,134 | 3,61 | 3,71 | 3,77 | 3,82 | 3,81 |

Tabela 33. Efeito de diferentes valores de pH sobre a velocidade de fermentação avaliada pela perda de peso (g) a cada hora, no transcorrer de 4 ciclos fermentativos, empregando-se fermento prensado (Fleischmann) e meio semi-sintético a 33°C. Cada dado representa a média de 4 repetições.

| TRATAMENTOS | CICLO | PERDA DE PESO (g) | | | | | | |
|-------------|-------|-------------------|------|------|------|------|------|------|
| | | 1h | 2h | 3h | 4h | 5h | 6h | 7h |
| pH 3,45 | 1º | 1,34 | 3,51 | 3,77 | 3,85 | 3,91 | 3,95 | 3,99 |
| | 2º | 1,21 | 2,65 | 3,88 | 4,03 | 4,10 | 4,17 | 4,20 |
| | 3º | 1,52 | 2,92 | 3,84 | 3,99 | 4,07 | 4,11 | 4,14 |
| | 4º | 1,01 | 2,45 | 3,39 | 3,49 | 3,57 | 3,60 | 3,63 |
| MÉDIAS | | 1,27 | 2,88 | 3,72 | 3,84 | 3,91 | 3,96 | 3,99 |
| pH 4,40 | 1º | 1,41 | 3,69 | 3,90 | 3,99 | 4,03 | 4,08 | 4,09 |
| | 2º | 1,27 | 2,87 | 4,01 | 4,15 | 4,21 | 4,28 | 4,30 |
| | 3º | 1,55 | 2,98 | 3,94 | 4,08 | 4,17 | 4,21 | 4,25 |
| | 4º | 1,18 | 2,74 | 3,50 | 3,60 | 3,66 | 3,69 | 3,72 |
| MÉDIAS | | 1,35 | 3,07 | 3,84 | 3,95 | 4,02 | 4,06 | 4,09 |
| pH 4,92 | 1º | 1,37 | 3,75 | 4,01 | 4,09 | 4,14 | 4,19 | 4,15 |
| | 2º | 1,47 | 3,17 | 4,10 | 4,20 | 4,26 | 4,32 | 4,34 |
| | 3º | 1,54 | 2,99 | 4,01 | 4,17 | 4,25 | 4,29 | 4,36 |
| | 4º | 1,20 | 2,58 | 3,49 | 3,60 | 4,67 | 3,70 | 3,74 |
| MÉDIAS | | 1,39 | 3,12 | 3,90 | 4,01 | 4,08 | 4,12 | 4,15 |

Tabela 34 . Efeito de diferentes valores do pH do meio semi-sintético (3,45; 4,40 e 4,92) ao longo de quatro ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: eficiência fermentativa; formação de glicerol (g/100g de Etanol) e peso de fermento (g).

| TRATA- MENTOS | EFICIÊNCIA | | | | GLICEROL (g/100gEtOH) | | | | PESO DE FERMENTO (g) | | | |
|------------------|------------|------|------|------|-----------------------|------|------|------|----------------------|------|------|------|
| | E1 | E2 | E3 | E4 | G1 | G2 | G3 | G4 | P1 | P2 | P3 | P4 |
| pH 3,45-1 | 78,3 | 78,0 | 78,2 | 82,1 | 15,3 | 11,8 | 10,4 | 10,3 | 13,7 | 13,8 | 13,5 | 13,5 |
| pH 3,45-2 | 78,8 | 77,8 | 78,4 | 82,2 | 15,2 | 11,9 | 10,4 | 10,1 | 13,7 | 13,9 | 13,7 | 13,5 |
| pH 3,45-3 | 79,1 | 78,4 | 78,2 | 82,1 | 15,1 | 11,8 | 10,2 | 10,4 | 13,6 | 13,9 | 13,5 | 13,3 |
| pH 3,45-4 | 80,0 | 79,5 | 78,4 | 82,0 | 15,0 | 11,6 | 9,9 | 10,3 | 13,7 | 14,0 | 13,6 | 13,4 |
| MÉDIAS | 79,0 | 78,4 | 78,3 | 82,1 | 15,1 | 11,8 | 10,2 | 10,3 | 13,7 | 13,9 | 13,6 | 13,4 |
| pH 4,40-1 | 79,9 | 79,4 | 78,0 | 82,0 | 14,8 | 11,6 | 9,8 | 9,4 | 13,9 | 14,2 | 14,0 | 13,8 |
| pH 4,40-2 | 79,4 | 79,4 | 79,8 | 81,7 | 14,8 | 11,6 | 9,1 | 9,4 | 13,9 | 14,2 | 13,9 | 13,3 |
| pH 4,40-3 | 79,9 | 79,5 | 78,7 | 82,0 | 14,8 | 11,6 | 9,8 | 9,3 | 13,8 | 14,1 | 13,7 | 13,2 |
| pH 4,40-4 | 78,8 | 79,7 | 79,5 | 81,8 | 15,2 | 12,0 | 9,2 | 9,0 | 14,1 | 14,5 | 14,1 | 13,5 |
| MÉDIAS | 79,5 | 79,5 | 79,0 | 81,9 | 14,9 | 11,7 | 9,5 | 9,3 | 13,9 | 14,2 | 13,9 | 13,4 |
| pH 4,92-1 | 78,5 | 79,3 | 79,8 | 81,7 | 15,0 | 11,9 | 9,8 | 8,8 | 14,0 | 14,3 | 14,1 | 13,8 |
| pH 4,92-2 | 79,9 | 79,4 | 80,3 | 81,7 | 15,0 | 12,1 | 9,7 | 8,8 | 14,1 | 14,4 | 13,8 | 13,2 |
| pH 4,92-3 | 80,0 | 79,5 | 81,4 | 81,4 | 15,0 | 12,1 | 9,6 | 8,9 | 14,2 | 14,5 | 14,0 | 13,4 |
| pH 4,92-4 | 79,9 | 79,5 | 79,7 | 81,7 | 15,0 | 11,8 | 9,1 | 8,8 | 14,2 | 14,6 | 14,3 | 13,8 |
| MÉDIAS | 79,6 | 79,4 | 80,3 | 81,6 | 15,0 | 12,0 | 9,5 | 8,8 | 14,1 | 14,4 | 14,0 | 13,5 |

Tabela 35. Efeito de diferentes valores de pH do meio semi-sintético (3,45; 4,40 e 4,92) ao longo de quatro ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: viabilidade celular (%); teor de trealose na célula (% M.S.) antes de iniciar a fermentação e ao final do último ciclo; contaminação bacteriana (n° de bactérias $\times 10^{-6}/\text{ml}$ vinho).

| TRATA- MENTOS | VIABILIDADE (%) | | | | BACTÉRIAS (cels/ml 10^{-6}) | | | | TREALOSE (%) | |
|------------------|-----------------|----|----|----|--------------------------------|------|------|------|--------------|-------|
| | V1 | V2 | V3 | V4 | BC1 | BC2 | BC3 | BC4 | INICIAL | FINAL |
| pH 3,45-1 | 96 | 89 | 74 | 79 | 12,2 | 16,1 | 9,4 | 12,2 | 4,19 | 3,43 |
| pH 3,45-2 | 94 | 88 | 75 | 70 | 9,4 | 12,9 | 11,0 | 13,5 | 4,55 | 3,18 |
| pH 3,45-3 | 94 | 88 | 74 | 80 | 16,1 | 15,2 | 9,4 | 11,2 | - | 3,54 |
| pH 3,45-4 | 95 | 87 | 74 | 79 | 15,1 | 13,3 | 9,0 | 12,3 | - | 3,93 |
| MÉDIAS | 95 | 88 | 74 | 77 | 13,2 | 14,4 | 9,7 | 12,3 | 4,37 | 3,52 |
| pH 4,40-1 | 95 | 86 | 72 | 69 | 20,5 | 20,5 | 31,0 | 46,0 | 4,19 | 3,25 |
| pH 4,40-2 | 93 | 86 | 73 | 69 | 32,9 | 21,1 | 24,2 | 42,1 | 4,55 | 2,74 |
| pH 4,40-3 | 92 | 85 | 77 | 61 | 20,5 | 32,9 | 16,9 | 56,4 | - | 2,06 |
| pH 4,40-4 | 94 | 87 | 77 | 61 | 37,6 | 37,6 | 19,9 | 49,3 | - | 2,81 |
| MÉDIAS | 93 | 86 | 75 | 65 | 27,9 | 28,0 | 23,0 | 48,4 | 4,37 | 2,71 |
| pH 4,92-1 | 95 | 87 | 73 | 55 | 25,7 | 19,0 | 45,1 | 67,7 | 4,19 | 2,78 |
| pH 4,92-2 | 93 | 89 | 78 | 54 | 30,5 | 25,7 | 44,2 | 59,9 | 4,55 | 2,42 |
| pH 4,92-3 | 90 | 90 | 70 | 64 | 19,0 | 30,5 | 47,0 | 56,4 | - | 2,42 |
| pH 4,92-4 | 95 | 88 | 70 | 62 | 23,5 | 23,5 | 49,1 | 58,8 | - | 2,74 |
| MÉDIAS | 93 | 88 | 73 | 59 | 24,7 | 24,7 | 46,3 | 60,7 | 4,37 | 2,59 |

Tabela 36 . Efeito de diferentes valores de pH do meio semi-sintético (3,45 e 4,92) em dois dos quatro ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: formação de ácido succínico (mg/l vinho); formação de ácido láctico (mg/l vinho) e formação de ácido acético (mg/l vinho), já descontados os teores dos ácidos presentes no meio.

| TRATA- MENTOS | AC.SUCCINICO(mg/l) | | AC.LATICO(mg/l) | | AC.ACÉTICO(mg/l) | |
|------------------|--------------------|------|-----------------|------|------------------|------|
| | SUC3 | SUC4 | LAC3 | LAC4 | ACT3 | ACT4 |
| pH 3,45-1 | 404 | 391 | 123 | 195 | 498 | 498 |
| pH 3,45-2 | 392 | 365 | 117 | 157 | 427 | 539 |
| pH 3,45-3 | 386 | 339 | 117 | 135 | 437 | 478 |
| pH 3,45-4 | 363 | 345 | 110 | 105 | 386 | 519 |
| MÉDIAS | 386 | 360 | 117 | 148 | 437 | 508 |
| pH 4,92-1 | 381 | 321 | 577 | 14 | 651 | 966 |
| pH 4,92-2 | 364 | 392 | 590 | 0 | 570 | 1140 |
| pH 4,92-3 | 416 | 340 | 655 | 7 | 600 | 925 |
| pH 4,92-4 | 375 | 373 | 597 | 0 | 599 | 1140 |
| MÉDIAS | 384 | 356 | 605 | 5 | 595 | 1020 |
| MOSTO pH 3,45 | 18 | - | 39 | - | 30 | - |
| MOSTO pH 4,92 | 23 | - | 39 | - | 40 | - |

Tabela 37. Efeito de diferentes valores de pH do meio semi-sintético (3,45; 4,40 e 4,92) ao longo de quatro ciclos fermentativos, sobre os valores de pH do vinho e açúcares redutores residuais (AR % P/V).

| TRATA- MENTOS | AÇÚCARES RESIDUAIS (AR%) | | | | pH DOS VINHOS | | | |
|------------------|--------------------------|-------|-------|-------|---------------|------|------|------|
| | AR1 | AR2 | AR3 | AR4 | pH1 | pH2 | pH3 | pH4 |
| pH 3,45-1 | 0,073 | 0,073 | 0,070 | 0,065 | 3,26 | 3,18 | 3,32 | 3,17 |
| pH 3,45-2 | 0,067 | 0,073 | 0,070 | 0,065 | 3,26 | 3,19 | 3,32 | 3,21 |
| pH 3,45-3 | 0,076 | 0,074 | 0,070 | 0,067 | 3,25 | 3,25 | 3,34 | 3,23 |
| pH 3,45-4 | 0,073 | 0,073 | 0,070 | 0,067 | 3,22 | 3,21 | 3,38 | 3,31 |
| MÉDIAS | 0,072 | 0,073 | 0,070 | 0,066 | 3,25 | 3,21 | 3,34 | 3,23 |
| pH 4,40-1 | 0,033 | 0,031 | 0,023 | 0,019 | 3,69 | 3,74 | 3,87 | 3,76 |
| pH 4,40-2 | 0,034 | 0,031 | 0,024 | 0,017 | 3,69 | 3,74 | 3,87 | 3,75 |
| pH 4,40-3 | 0,036 | 0,032 | 0,026 | 0,020 | 3,69 | 3,78 | 3,85 | 3,74 |
| pH 4,40-4 | 0,039 | 0,034 | 0,026 | 0,021 | 3,59 | 3,73 | 3,83 | 3,78 |
| MÉDIAS | 0,036 | 0,032 | 0,025 | 0,019 | 3,66 | 3,74 | 3,85 | 3,76 |
| pH 4,92-1 | 0,021 | 0,014 | 0,012 | 0,006 | 3,91 | 3,90 | 3,96 | 3,88 |
| pH 4,92-2 | 0,021 | 0,011 | 0,008 | 0,005 | 3,86 | 3,95 | 3,98 | 3,82 |
| pH 4,92-3 | 0,019 | 0,011 | 0,004 | 0,005 | 3,85 | 3,92 | 3,98 | 3,85 |
| pH 4,92-4 | 0,022 | 0,009 | 0,005 | 0,005 | 3,85 | 3,91 | 3,96 | 3,86 |
| MÉDIAS | 0,021 | 0,011 | 0,007 | 0,005 | 3,87 | 3,92 | 3,97 | 3,85 |

Tabela 38. Efeito da temperatura sobre a velocidade de fermentação avaliada pela perda de peso (g) a cada hora, no transcorrer de quatro ciclos fermentativos, empregando-se fermento prensado (Fleischmann) e meio semi-sintético incubados a 27, 33 e 38 C. Cada dado representa a média de 4 repetições.

| TRATAMENTOS | CICLO | PERDA DE PESO (g) | | | | | | |
|-------------|-------|-------------------|------|------|------|------|------|------|
| | | 1h | 2h | 3h | 4h | 5h | 6h | 7h |
| 27 °C | 1º | 2,12 | 3,56 | 4,13 | 4,19 | 4,23 | 4,27 | 4,30 |
| | 2º | 1,93 | 3,71 | 4,10 | 4,13 | 4,19 | 4,23 | 4,25 |
| | 3º | 1,88 | 3,45 | 4,06 | 4,11 | 4,14 | 4,19 | 4,23 |
| | 4º | 1,86 | 3,80 | 4,19 | 4,23 | 4,27 | 4,29 | 4,33 |
| MÉDIAS | | 1,95 | 3,63 | 4,12 | 4,16 | 4,21 | 4,24 | 4,28 |
| 33 °C | 1º | 2,30 | 3,99 | 4,20 | 4,25 | 4,32 | 4,36 | 4,40 |
| | 2º | 1,94 | 3,89 | 4,23 | 4,27 | 4,34 | 4,38 | 4,40 |
| | 3º | 1,93 | 3,67 | 4,31 | 4,36 | 4,40 | 4,46 | 4,49 |
| | 4º | 1,72 | 3,85 | 4,27 | 4,35 | 4,39 | 4,43 | 4,48 |
| MÉDIAS | | 1,97 | 3,85 | 4,25 | 4,31 | 4,38 | 4,41 | 4,44 |
| 38 °C | 1º | 2,12 | 4,15 | 4,34 | 4,44 | 4,53 | 4,61 | 4,70 |
| | 2º | 1,95 | 3,55 | 4,36 | 4,50 | 4,59 | 4,67 | 4,70 |
| | 3º | 1,70 | 3,00 | 4,11 | 4,49 | 4,64 | 4,76 | 4,86 |
| | 4º | 0,93 | 2,13 | 3,17 | 3,86 | 4,27 | 4,49 | 4,66 |
| MÉDIA | | 1,82 | 3,21 | 3,99 | 4,32 | 4,50 | 4,64 | 4,66 |

Tabela 39. Efeito de diferentes temperaturas de incubação (27, 33 e 38°C) em meio semi-sintético, ao longo de quatro ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: eficiência fermentativa; formação de glicerol (g/100g de Etanol) e peso do fermento (g).

| TRATA- MENTOS | EFICIÊNCIA | | | | GLICEROL(g/100gEtOH) | | | | PESO DE FERMENTO (g) | | | |
|------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------------------|-------------|-------------|-------------|----------------------|-------------|-------------|-------------|
| | E1 | E2 | E3 | E4 | G1 | G2 | G3 | G4 | P1 | P2 | P3 | P4 |
| 27°C-1 | 85,4 | 82,6 | 88,1 | 85,1 | 16,5 | 12,9 | 10,1 | 10,7 | 14,4 | 15,4 | 16,4 | 17,4 |
| 27°C-2 | 85,4 | 84,7 | 87,8 | 87,2 | 16,4 | 12,6 | 9,8 | 10,0 | 14,3 | 15,2 | 16,3 | 17,2 |
| 27°C-3 | 87,4 | 84,5 | 87,9 | 86,5 | 15,8 | 12,3 | 9,8 | 10,1 | 14,5 | 15,3 | 16,2 | 17,4 |
| 27°C-4 | 85,4 | 84,5 | 87,9 | 87,2 | 16,2 | 12,3 | 9,9 | 10,1 | 14,3 | 15,4 | 16,4 | 17,6 |
| MÉDIAS | 85,9 | 84,1 | 87,9 | 86,5 | 16,2 | 12,5 | 9,9 | 10,2 | 14,4 | 15,3 | 16,3 | 17,3 |
| 33°C-1 | 85,4 | 86,0 | 87,1 | 87,1 | 15,9 | 12,2 | 10,0 | 9,5 | 14,5 | 15,0 | 15,5 | 15,1 |
| 33°C-2 | 85,4 | 84,6 | 87,6 | 87,0 | 15,9 | 12,3 | 10,0 | 9,4 | 14,6 | 15,2 | 15,5 | 14,9 |
| 33°C-3 | 85,4 | 84,5 | 87,3 | 86,7 | 16,1 | 12,3 | 10,2 | 9,4 | 14,1 | 14,7 | 15,5 | 14,5 |
| 33°C-4 | 87,4 | 84,2 | 87,6 | 87,1 | 15,0 | 12,0 | 10,1 | 9,4 | 14,2 | 13,4 | 14,9 | 14,3 |
| MÉDIAS | 85,9 | 84,8 | 87,4 | 87,0 | 15,7 | 12,2 | 10,1 | 9,4 | 14,3 | 14,6 | 15,3 | 14,7 |
| 38°C-1 | 87,2 | 87,8 | 88,5 | 82,1 | 14,4 | 11,3 | 9,6 | 12,6 | 14,2 | 13,4 | 11,8 | 11,2 |
| 38°C-2 | 87,2 | 87,8 | 88,5 | 86,1 | 14,2 | 11,3 | 9,8 | 11,0 | 14,1 | 13,5 | 12,1 | 11,3 |
| 38°C-3 | 87,2 | 87,3 | 88,7 | 84,4 | 14,2 | 11,3 | 9,7 | 11,2 | 14,1 | 13,5 | 12,1 | 11,2 |
| 38°C-4 | 87,2 | 88,3 | 88,4 | 84,1 | 14,2 | 11,2 | 9,7 | 11,2 | 14,0 | 13,4 | 12,1 | 11,3 |
| MÉDIAS | 87,2 | 87,8 | 88,5 | 84,2 | 14,2 | 11,3 | 9,7 | 11,5 | 14,1 | 13,4 | 12,0 | 11,2 |

Tabela 40. Efeito de diferentes temperaturas de incubação (27, 33 e 38°C) em meio semi-sintético, ao longo de quatro ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: viabilidade celular (%); teor de trealose (% M.S.) antes de iniciar a fermentação e ao final do último ciclo; contaminação bacteriana (n° de bactéria $\times 10^{-6}$ /ml vinho).

| TRATA- MENTOS | VIABILIDADE | | | | BACTÉRIAS (cels/ml $\times 10^{-6}$) | | | | TREALOSE (%) | |
|------------------|-------------|----|----|----|---------------------------------------|------|------|------|--------------|-------|
| | V1 | V2 | V3 | V4 | BC1 | BC2 | BC3 | BC4 | INICIAL | FINAL |
| 27°C-1 | 97 | 94 | 90 | 87 | 36,6 | 38,1 | 43,2 | 36,6 | - | 1,11 |
| 27°C-2 | 98 | 94 | 90 | 88 | 43,2 | 39,5 | 39,1 | 59,9 | - | 1,11 |
| 27°C-3 | 98 | 96 | 94 | 85 | 38,1 | 29,9 | 38,5 | 61,2 | 4,19 | 2,05 |
| 27°C-4 | 99 | 96 | 92 | 85 | 29,9 | 33,8 | 43,2 | 59,8 | 4,55 | 1,24 |
| MÉDIAS | 98 | 95 | 91 | 86 | 36,9 | 35,3 | 41,0 | 49,4 | 4,37 | 1,38 |
| 33°C-1 | 94 | 91 | 85 | 71 | 33,8 | 37,6 | 50,7 | 42,3 | - | 0,62 |
| 33°C-2 | 97 | 93 | 85 | 73 | 39,5 | 35,2 | 51,3 | 41,0 | - | 0,55 |
| 33°C-3 | 97 | 89 | 81 | 53 | 45,1 | 39,5 | 58,3 | 52,6 | 4,19 | 0,47 |
| 33°C-4 | 96 | 90 | 81 | 52 | 37,6 | 45,1 | 52,4 | 55,1 | 4,55 | 0,42 |
| MÉDIAS | 96 | 91 | 83 | 62 | 39,0 | 39,3 | 53,2 | 47,7 | 4,37 | 0,50 |
| 38°C-1 | 90 | 75 | 62 | 43 | 35,2 | 36,8 | 69,5 | 59,2 | - | 0,42 |
| 38°C-2 | 91 | 79 | 66 | 46 | 36,8 | 37,6 | 72,6 | 57,7 | - | 0,39 |
| 38°C-3 | 91 | 74 | 57 | 57 | 37,2 | 38,2 | 73,3 | 50,7 | 4,19 | 0,41 |
| 38°C-4 | 91 | 76 | 66 | 57 | 38,2 | 37,6 | 80,8 | 53,1 | 4,55 | 0,42 |
| MÉDIAS | 91 | 76 | 63 | 51 | 36,8 | 37,5 | 74,0 | 55,2 | 4,37 | 0,39 |

Tabela 41 . Efeito de diferentes temperaturas de incubação (27 e 38°C) em meio semi-sintético, em três dos quatro ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: formação de ácido succínico (mg/l vinho); formação e ácido láctico (mg/l vinho) e formação de ácido acético (mg/l vinho), já descontados os teores dos ácidos presentes no meio.

| TRATA- MENTOS | AC.SUCCINICO(mg/l) | | | AC.LATICO(mg/l) | | | AC.ACÉTICO(mg/l) | | |
|------------------|--------------------|------|------|-----------------|------|------|------------------|------|------|
| | SUC1 | SUC3 | SUC4 | LAC1 | LAC3 | LAC4 | ACT1 | ACT3 | ACT4 |
| 27°C-1 | 523 | 351 | 236 | 304 | 336 | 640 | 364 | 481 | 599 |
| 27°C-2 | 598 | 374 | 299 | 323 | 354 | 696 | 423 | 481 | 639 |
| 27°C-3 | 661 | 431 | 305 | 298 | 342 | 752 | 403 | 462 | 609 |
| 27°C-4 | 644 | 374 | 316 | 298 | 348 | 683 | 432 | 491 | 590 |
| MÉDIAS | 606 | 382 | 289 | 306 | 345 | 693 | 403 | 479 | 609 |
| 38°C-1 | 632 | 366 | 333 | 336 | 613 | 2670 | 315 | 511 | 1500 |
| 38°C-2 | 678 | 385 | 207 | 348 | 615 | 2500 | 315 | 511 | 1503 |
| 38°C-3 | 690 | 362 | 253 | 348 | 627 | 2820 | 324 | 511 | 1620 |
| 38°C-4 | 678 | 351 | 207 | 329 | 596 | 2690 | 334 | 511 | 1620 |
| MÉDIAS | 669 | 366 | 300 | 340 | 613 | 2670 | 322 | 511 | 1560 |
| MOSTO | 23 | - | - | 37 | - | - | 29 | - | - |

Tabela 42. Efeito de diferentes temperaturas de incubação (27, 33 e 38 °C) em meio semi-sintético, ao longo de quatro ciclos fermentativos, sobre o pH final do vinho e açúcares redutores residuais (AR % P/V).

| TRATA- MENTOS | AÇÚCARES RESIDUAIS (AR%) | | | | pH DOS VINHOS | | | |
|------------------|--------------------------|--------------|--------------|--------------|---------------|-------------|-------------|-------------|
| | AR1 | AR2 | AR3 | AR4 | pH1 | pH2 | pH3 | pH4 |
| 27° C-1 | 0,019 | 0,017 | 0,011 | 0,010 | 3,65 | 3,73 | 3,87 | 3,80 |
| 27° C-2 | 0,018 | 0,012 | 0,010 | 0,004 | 3,75 | 3,76 | 3,90 | 3,81 |
| 27° C-3 | 0,019 | 0,012 | 0,011 | 0,006 | 3,70 | 3,76 | 3,88 | 3,83 |
| 27° C-4 | 0,018 | 0,016 | 0,012 | 0,011 | 3,75 | 3,74 | 3,88 | 3,82 |
| MÉDIAS | 0,019 | 0,014 | 0,011 | 0,009 | 3,71 | 3,75 | 3,88 | 3,82 |
| 33° C-1 | 0,017 | 0,009 | 0,005 | 0,005 | 3,78 | 3,83 | 3,91 | 3,88 |
| 33° C-2 | 0,017 | 0,006 | 0,004 | 0,007 | 3,76 | 3,85 | 3,92 | 3,91 |
| 33° C-3 | 0,018 | 0,007 | 0,005 | 0,010 | 3,73 | 3,87 | 3,92 | 3,90 |
| 33° C-4 | 0,019 | 0,009 | 0,005 | 0,007 | 3,76 | 3,87 | 3,92 | 3,90 |
| MÉDIAS | 0,018 | 0,009 | 0,005 | 0,007 | 3,76 | 3,86 | 3,92 | 3,90 |
| 38° C-1 | 0,018 | 0,009 | 0,008 | 0,015 | 3,93 | 4,09 | 3,98 | 3,78 |
| 38° C-2 | 0,013 | 0,006 | 0,007 | 0,009 | 3,92 | 4,09 | 3,99 | 3,79 |
| 38° C-3 | 0,012 | 0,006 | 0,006 | 0,010 | 3,95 | 4,08 | 3,98 | 3,81 |
| 38° C-4 | 0,012 | 0,006 | 0,007 | 0,012 | 3,96 | 4,08 | 3,99 | 3,82 |
| MÉDIAS | 0,014 | 0,007 | 0,007 | 0,012 | 3,94 | 4,09 | 3,89 | 3,80 |

Tabela 43. Efeito de diferentes concentrações de inóculo (6, 11 e 16% em peso úmido) em meio de melaço sobre a velocidade de fermentação estimada pela perda de peso (g) a cada hora, no transcorrer de 5 ciclos fermentativos, empregando-se fermento prensado (Fleischmann e meio de melaço. Cada dado representa a média de 4 repetições.

| TRATA- MENTOS | CICLO | PERDA DE PESO (g) | | | | | | |
|------------------|-------|-------------------|------|------|------|------|------|------|
| | | 1h | 2h | 3h | 4h | 5h | 6h | 7h |
| 5g | 1º | 0,32 | 1,14 | 2,20 | 3,13 | 3,58 | 3,67 | 4,19 |
| | 2º | 0,16 | 0,84 | 1,97 | 2,76 | 3,44 | 3,75 | 3,85 |
| | 3º | 0,52 | 1,56 | 2,48 | 3,24 | 3,77 | 3,93 | 4,49 |
| | 4º | 0,53 | 1,63 | 2,45 | 3,32 | 3,75 | 3,91 | 3,98 |
| | 5º | 0,44 | 1,46 | 2,52 | 3,42 | 3,90 | 4,03 | 4,08 |
| MÉDIAS | | 0,39 | 1,33 | 2,32 | 3,17 | 3,69 | 3,86 | 4,12 |
| 10g | 1º | 0,89 | 2,46 | 3,39 | 3,48 | 3,53 | 3,58 | 4,07 |
| | 2º | 0,44 | 1,90 | 3,57 | 3,74 | 3,82 | 3,88 | 3,92 |
| | 3º | 1,05 | 2,81 | 3,75 | 3,86 | 3,96 | 4,00 | 4,05 |
| | 4º | 1,12 | 2,87 | 3,69 | 3,89 | 3,95 | 4,01 | 4,06 |
| | 5º | 0,78 | 2,37 | 3,63 | 3,93 | 4,01 | 4,07 | 4,11 |
| MÉDIAS | | 0,86 | 2,48 | 3,61 | 3,78 | 3,85 | 3,91 | 4,04 |
| 15g | 1º | 1,54 | 3,33 | 3,50 | 3,57 | 3,62 | 3,67 | 4,15 |
| | 2º | 0,68 | 2,87 | 3,67 | 3,76 | 3,82 | 3,89 | 3,93 |
| | 3º | 1,48 | 3,62 | 3,81 | 3,89 | 3,94 | 3,99 | 4,05 |
| | 4º | 1,47 | 3,67 | 3,80 | 3,90 | 3,96 | 4,02 | 4,06 |
| | 5º | 1,03 | 3,17 | 3,83 | 3,92 | 3,98 | 4,04 | 4,08 |
| MÉDIAS | | 1,28 | 3,33 | 3,72 | 3,81 | 3,86 | 3,92 | 4,05 |

Tabela 44 . Efeito de diferentes concentrações de inóculo (6, 11 e 16% em peso úmido) em meio de melão ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetro: eficiência fermentativa, produção de glicerol (g/100g de Etanol) e peso de fermento (g).

| TRATA- MENTOS | EFICIÊNCIA | | | | | GLICEROL(g/100gEtOH) | | | | | PI | PESO DE FERMENTO (g) | | | | |
|------------------|------------|-------|------|------|------|----------------------|-------|-------|-------|-------|------|----------------------|-------|-------|-------|-------|
| | E1 | E2 | E3 | E4 | E5 | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 |
| 6%-1 | 82,9 | 87,05 | 84,1 | 86,8 | 86,3 | 16,83 | 13,68 | 13,56 | 13,17 | 13,01 | 5,00 | 8,54 | 8,85 | 9,26 | 9,85 | 10,22 |
| 6%-2 | 82,8 | 86,78 | 90,5 | 89,0 | 89,4 | 16,83 | 13,68 | 12,71 | 12,75 | 12,58 | 5,00 | 8,53 | 9,01 | 9,43 | 9,96 | 10,47 |
| 6%-3 | 82,9 | 87,20 | 90,9 | 89,3 | 88,3 | 16,83 | 13,80 | 12,71 | 12,71 | 12,73 | 5,00 | 8,48 | 8,92 | 9,36 | 9,87 | 10,33 |
| 6%-4 | 82,9 | 87,11 | 89,6 | 89,3 | 89,3 | 16,83 | 13,54 | 12,85 | 12,78 | 12,35 | 5,00 | 8,48 | 8,97 | 9,56 | 9,93 | 10,44 |
| MÉDIAS | 82,9 | 87,00 | 88,8 | 88,6 | 88,3 | 16,83 | 13,67 | 12,96 | 12,84 | 12,67 | 5,00 | 8,51 | 8,94 | 9,40 | 9,90 | 10,36 |
| 11%-1 | 85,6 | 87,90 | 86,3 | 88,5 | 89,7 | 17,61 | 13,80 | 13,66 | 12,89 | 12,06 | 10,0 | 14,84 | 15,23 | 15,75 | 15,42 | 16,18 |
| 11%-2 | 83,5 | 88,34 | 87,3 | 89,4 | 89,1 | 18,06 | 13,80 | 12,91 | 12,62 | 12,12 | 10,0 | 15,09 | 15,73 | 16,17 | 16,21 | 16,43 |
| 11%-3 | 85,6 | 88,05 | 87,4 | 89,0 | 89,6 | 17,61 | 14,19 | 12,75 | 12,42 | 11,93 | 10,0 | 15,08 | 15,74 | 16,13 | 16,25 | 16,31 |
| 11%-4 | 83,4 | 88,49 | 88,1 | 88,9 | 89,4 | 18,06 | 13,94 | 12,81 | 12,42 | 11,97 | 10,0 | 15,10 | 15,69 | 16,15 | 16,20 | 16,40 |
| MÉDIAS | 84,50 | 88,2 | 87,3 | 88,9 | 89,4 | 17,83 | 13,93 | 13,03 | 12,59 | 12,02 | 10,0 | 15,02 | 15,60 | 16,05 | 16,02 | 16,33 |
| 16%-1 | 7,8 | 86,74 | 86,9 | 88,6 | 88,3 | 18,85 | 14,11 | 13,52 | 12,89 | 11,98 | 15,0 | 20,46 | 21,57 | 22,32 | 22,44 | 22,88 |
| 16%-2 | 87,9 | 86,85 | 87,1 | 88,9 | 88,4 | 18,69 | 14,11 | 13,27 | 12,50 | 11,71 | 15,0 | 20,80 | 21,95 | 22,77 | 23,26 | 23,54 |
| 16%-3 | 85,7 | 87,35 | 87,0 | 88,8 | 88,4 | 19,17 | 14,11 | 13,01 | 12,50 | 11,71 | 15,0 | 20,83 | 21,96 | 23,00 | 23,22 | 23,53 |
| 16%-4 | 87,9 | 86,86 | 88,1 | 88,9 | 88,4 | 16,01 | 13,84 | 12,87 | 12,50 | 11,84 | 15,0 | 20,74 | 21,84 | 22,75 | 23,02 | 23,29 |
| MÉDIAS | 87,3 | 86,9 | 87,3 | 88,8 | 88,4 | 18,18 | 14,04 | 13,17 | 12,60 | 11,81 | 15,0 | 20,71 | 21,83 | 22,71 | 22,98 | 23,31 |

Tabela 45. Efeito de diferentes concentrações de inóculo (6, 11 e 16%, em peso úmido) em meio de melão, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: viabilidade celular (%); teor de trealose (% M.S.) antes de iniciar a fermentação e ao final do último ciclo; contaminação bacteriana (n° de bactéria $\times 10^{-6}$ /ml vinho).

| TRATA- MENTOS | VIABILIDADE | | | | | BACTÉRIAS (cels/ml $\times 10^{-6}$) | | | | | TREALOSE (%) | |
|------------------|-------------|----|----|----|----|---------------------------------------|-----|-----|-----|-----|--------------|-------|
| | V1 | V2 | V3 | V4 | V5 | BC1 | BC2 | BC3 | BC4 | BC5 | INICIAL | FINAL |
| 6%-1 | 99 | 95 | 94 | 86 | 83 | 1,9 | 1,7 | 2,5 | 3,3 | 3,2 | 0,96 | 3,00 |
| 6%-2 | 98 | 92 | 89 | 88 | 84 | 1,9 | 1,9 | 2,8 | 3,2 | 3,8 | 0,35 | 1,66 |
| 6%-3 | 98 | 94 | 88 | 87 | 81 | 2,0 | 1,9 | 2,6 | 3,4 | 3,4 | 1,03 | 1,90 |
| 6%-4 | 98 | 91 | 90 | 89 | 86 | 1,9 | 1,8 | 2,4 | 3,3 | 3,3 | - | 2,37 |
| MÉDIAS | 98 | 93 | 90 | 87 | 83 | 1,9 | 1,8 | 2,6 | 3,3 | 3,6 | 0,78 | 2,25 |
| 11%-1 | 97 | 95 | 94 | 93 | 91 | 1,1 | 0,7 | 1,7 | 2,3 | 2,5 | 0,97 | 1,90 |
| 11%-2 | 99 | 98 | 93 | 92 | 91 | 1,1 | 0,9 | 2,1 | 2,3 | 2,7 | 0,35 | 1,91 |
| 11%-3 | 99 | 97 | 95 | 93 | 93 | 1,1 | 0,7 | 1,9 | 2,8 | 2,3 | 1,03 | 1,70 |
| 11%-4 | 99 | 96 | 92 | 91 | 87 | 1,2 | 0,9 | 1,8 | 2,4 | 2,6 | - | 1,81 |
| MÉDIAS | 98 | 96 | 93 | 92 | 90 | 1,1 | 0,8 | 1,9 | 2,4 | 2,5 | 0,78 | 1,83 |
| 16%-1 | 98 | 97 | 96 | 96 | 94 | 1,3 | 0,9 | 1,9 | 2,6 | 2,4 | 0,97 | 1,58 |
| 16%-2 | 98 | 96 | 96 | 95 | 94 | 1,4 | 1,2 | 2,2 | 2,1 | 2,4 | 0,35 | 1,30 |
| 16%-3 | 99 | 98 | 97 | 91 | 90 | 1,2 | 1,1 | 2,3 | 2,4 | 2,1 | 1,03 | 2,05 |
| 16%-4 | 99 | 98 | 95 | 94 | 93 | 1,4 | 0,9 | 2,1 | 2,3 | 2,0 | - | 1,90 |
| MÉDIAS | 98 | 97 | 96 | 94 | 93 | 1,3 | 1,0 | 2,1 | 2,3 | 2,2 | 0,78 | 1,71 |

Tabela 46 . Efeito de diferentes concentrações de inóculo (6, 11 e 16% em peso úmido) em meio de melão, em dois dos cinco fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: formação de ácido succínico (mg/l vinho), formação de ácido láctico (mg/l vinho) e formação de ácido acético (mg/l vinho), já descontados os teores dos ácidos presentes nos meios.

| TRATA- MENTOS | AC. SUCCINICO(mg/l) | | AC. LÁTICO (mg/l) | | AC. ACÉTICO (mg/l) | |
|------------------|---------------------|------|-------------------|------|--------------------|------|
| | SUC1 | SUC3 | LAC1 | LAC3 | ACT1 | ACT3 |
| 6%-1 | 225 | 136 | 46 | 40 | 70 | 58 |
| 6%-2 | 275 | 159 | 64 | 43 | 70 | 79 |
| 6%-3 | 263 | 159 | 49 | 30 | 66 | 62 |
| 6%-4 | 272 | 154 | 46 | 30 | 50 | 62 |
| MÉDIAS | 259 | 152 | 51 | 36 | 64 | 65 |
| 11%-1 | 293 | 118 | 61 | 43 | 120 | 103 |
| 11%-2 | 359 | 138 | 61 | 37 | 87 | 124 |
| 11%-3 | 340 | 143 | 49 | 24 | 70 | 87 |
| 11%-4 | 363 | 138 | 46 | 21 | 70 | 83 |
| MÉDIAS | 339 | 134 | 54 | 31 | 87 | 99 |
| 16%-1 | 336 | 150 | 58 | 55 | 99 | 132 |
| 16%-2 | 409 | 186 | 64 | 37 | 66 | 112 |
| 16%-3 | 334 | 172 | 67 | 24 | 70 | 83 |
| 16%-4 | 365 | 150 | 46 | 21 | 50 | 87 |
| MÉDIAS | 361 | 164 | 59 | 34 | 71 | 103 |

Tabela 47 . Efeito de diferentes concentrações de inóculo (6, 11 e 16% em peso úmido) em meio de melaço, ao longo de cinco ciclos fermentativos, sobre os valores de pH do vinho e açucars redutores residuais (AR% P/V).

| TRATA- MENTOS | ACUCARES RESIDUAIS (AR%) | | | | | pH DOS VINHOS | | | | |
|------------------|--------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | AR1 | AR2 | AR3 | AR4 | AR5 | pH1 | pH2 | pH3 | pH4 | pH5 |
| 6% -1 | 0,420 | 0,468 | 0,451 | 0,470 | 0,494 | 3,97 | 3,98 | 4,04 | 4,07 | 4,16 |
| 6% -2 | 0,416 | 0,468 | 0,463 | 0,452 | 0,486 | 3,98 | 3,90 | 4,03 | 4,03 | 4,13 |
| 6% -3 | 0,409 | 0,446 | 0,463 | 0,452 | 0,486 | 3,96 | 3,88 | 4,00 | 4,04 | 4,12 |
| 6% -4 | 0,395 | 0,416 | 0,427 | 0,423 | 0,454 | 3,95 | 3,85 | 3,96 | 4,03 | 4,13 |
| MÉDIAS | 0,410 | 0,457 | 0,451 | 0,449 | 0,480 | 3,97 | 3,90 | 4,01 | 4,25 | 4,13 |
| 11% -1 | 0,416 | 0,449 | 0,467 | 0,456 | 0,490 | 3,97 | 3,83 | 4,13 | 4,10 | 4,23 |
| 11% -2 | 0,416 | 0,442 | 0,447 | 0,448 | 0,466 | 3,96 | 3,83 | 4,00 | 4,10 | 4,23 |
| 11% -3 | 0,402 | 0,434 | 0,431 | 0,437 | 0,470 | 3,96 | 3,83 | 4,02 | 4,09 | 4,22 |
| 11% -4 | 0,427 | 0,464 | 0,471 | 0,456 | 0,494 | 3,92 | 3,89 | 4,02 | 4,09 | 4,20 |
| MÉDIAS | 0,415 | 0,447 | 0,454 | 0,449 | 0,480 | 3,95 | 3,84 | 4,04 | 4,10 | 4,22 |
| 16% -1 | 0,388 | 0,427 | 0,459 | 0,445 | 0,466 | 3,99 | 3,83 | 4,10 | 4,13 | 4,26 |
| 16% -2 | 0,406 | 0,449 | 0,463 | 0,452 | 0,490 | 3,99 | 3,89 | 4,03 | 4,07 | 4,22 |
| 16% -3 | 0,490 | 0,446 | 0,459 | 0,452 | 0,470 | 4,00 | 3,83 | 4,02 | 4,02 | 4,24 |
| 16% -4 | 0,331 | 0,449 | 0,463 | 0,452 | 0,482 | 4,09 | 3,83 | 4,02 | 4,05 | 4,26 |
| MÉDIAS | 0,404 | 0,443 | 0,461 | 0,450 | 0,477 | 4,02 | 3,84 | 4,04 | 4,07 | 4,25 |

Tabela 48. Efeito de diferentes leveduras [Fleischmann, IZ-1904 e TA (M-300-A)] sobre a velocidade de fermentação avaliada pela perda de peso (g) a cada hora, no transcorrer de 6 ciclos fermentativos, empregando-se meio de melação incubados a 33 C. Cada dado representa a média de 4 repetições.

| TRATA- MENTOS | CICLO | PERDA DE PESO (g) | | | | | | |
|------------------|----------------|-------------------|------|------|------|------|------|------|
| | | 1h | 2h | 3h | 4h | 5h | 6h | 7h |
| FLEISCHMANN | 1 ^o | 0,55 | 1,73 | 3,35 | 3,78 | 3,94 | 3,98 | 4,05 |
| | 2 ^o | 0,59 | 2,02 | 3,55 | 3,91 | 4,06 | 4,15 | 4,22 |
| | 3 ^o | 0,99 | 2,78 | 3,38 | 3,96 | 4,08 | 4,12 | 4,20 |
| | 4 ^o | 0,85 | 2,43 | 3,61 | 3,85 | 4,05 | 4,09 | 4,16 |
| | 5 ^o | 0,47 | 1,64 | 2,69 | 3,70 | 3,86 | 3,92 | 3,96 |
| | 6 ^o | 1,11 | 2,59 | 3,79 | 3,95 | 4,06 | 4,12 | 4,15 |
| MÉDIAS | | 0,76 | 1,86 | 3,39 | 3,86 | 4,01 | 4,06 | 4,12 |
| IZ-1904 | 1 ^o | 0,56 | 2,04 | 3,37 | 4,05 | 4,18 | 4,23 | 4,30 |
| | 2 ^o | 0,48 | 1,94 | 3,67 | 4,06 | 4,22 | 4,29 | 4,36 |
| | 3 ^o | 0,82 | 2,65 | 4,02 | 4,12 | 4,21 | 4,24 | 4,30 |
| | 4 ^o | 0,45 | 1,75 | 2,95 | 4,00 | 4,14 | 4,20 | 4,28 |
| | 5 ^o | 0,41 | 1,45 | 2,43 | 3,65 | 4,03 | 4,08 | 4,12 |
| | 6 ^o | 0,85 | 2,17 | 3,53 | 4,07 | 4,15 | 4,22 | 4,27 |
| MÉDIAS | | 0,59 | 2,00 | 3,33 | 3,99 | 4,15 | 4,21 | 4,27 |
| TA(M-300-A) | 1 ^o | 0,38 | 1,63 | 3,27 | 3,77 | 3,94 | 3,98 | 4,07 |
| | 2 ^o | 0,54 | 1,99 | 3,53 | 3,89 | 4,06 | 4,15 | 4,21 |
| | 3 ^o | 0,96 | 2,85 | 3,90 | 3,99 | 4,09 | 4,13 | 4,19 |
| | 4 ^o | 0,87 | 2,44 | 3,64 | 3,90 | 4,08 | 4,12 | 4,21 |
| | 5 ^o | 0,44 | 1,65 | 2,69 | 3,71 | 3,87 | 3,92 | 5,97 |
| | 6 ^o | 0,99 | 2,58 | 3,77 | 3,94 | 4,02 | 4,10 | 4,15 |
| MÉDIAS | | 0,61 | 2,19 | 3,47 | 3,86 | 4,01 | 4,07 | 4,13 |

Tabela 49 . Efeito de diferentes leveduras [Fleischmann, IZ-1904 e TA (M-300-A)] inoculadas em meio de melaço, ao longo de seis ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: eficiência fermentativa, formação de glicerol (g/100g de Etanol) e peso de fermento (g).

| TRATA- MENTOS | EFICIÊNCIA | | | | | | GLICEROL(g/100gEtOH) | | | | | | PESO DE FERMENTO (g) | | | | | | |
|------------------|------------|------|------|------|------|------|----------------------|------|------|------|------|------|----------------------|------|------|------|------|------|------|
| | E1 | E2 | E3 | E4 | E5 | E6 | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | G6 | PI | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 |
| FL-1 | 82,4 | 84,4 | 84,3 | 86,7 | 85,6 | 88,4 | 12,7 | 12,7 | 12,4 | 12,8 | 12,9 | 13,4 | 10,6 | 11,6 | 11,8 | 12,5 | 12,8 | 13,4 | 14,4 |
| FL-2 | 82,4 | 84,2 | 83,5 | 86,1 | 83,7 | 81,6 | 12,7 | 12,4 | 12,6 | 12,8 | 13,0 | 13,7 | 10,6 | 11,6 | 12,0 | 12,7 | 10,0 | 13,5 | 14,5 |
| FL-3 | 81,3 | 84,2 | 83,8 | 84,5 | 84,6 | 83,6 | 12,7 | 12,4 | 12,5 | 13,0 | 12,9 | 13,4 | 10,7 | 11,6 | 12,0 | 12,7 | 13,0 | 13,6 | 14,6 |
| FL-4 | 84,1 | 84,0 | 84,9 | 86,2 | 83,7 | 82,8 | 12,2 | 12,2 | 12,4 | 13,0 | 13,0 | 13,5 | 10,6 | 11,5 | 12,0 | 12,8 | 13,1 | 13,7 | 14,7 |
| MÉDIAS | 83,0 | 84,1 | 84,1 | 86,1 | 84,4 | 84,1 | 12,6 | 12,4 | 12,5 | 12,9 | 12,9 | 13,5 | 10,6 | 11,6 | 11,6 | 12,7 | 13,0 | 13,5 | 14,5 |
| IZ-1 | 84,2 | 86,8 | 83,2 | 85,1 | 85,7 | 84,6 | 12,2 | 12,2 | 13,2 | 12,9 | 14,0 | 14,2 | 10,6 | 9,7 | 9,8 | 9,6 | 9,4 | 9,7 | 10,0 |
| IZ-2 | 85,1 | 87,5 | 84,3 | 85,6 | 83,6 | 83,6 | 12,1 | 12,0 | 13,1 | 13,1 | 14,3 | 14,7 | 10,6 | 9,8 | 9,9 | 9,7 | 9,6 | 9,9 | 10,1 |
| IZ-3 | 84,0 | 85,8 | 83,4 | 86,1 | 85,6 | 84,6 | 12,2 | 12,2 | 13,2 | 12,6 | 14,0 | 14,2 | 10,6 | 9,9 | 9,7 | 9,5 | 9,3 | 9,6 | 9,8 |
| IZ-4 | 86,1 | 86,7 | 83,2 | 87,9 | 84,1 | 83,5 | 11,9 | 12,2 | 13,2 | 12,4 | 14,2 | 14,4 | 10,6 | 9,7 | 9,7 | 9,3 | 9,4 | 9,6 | 9,8 |
| MÉDIAS | 84,8 | 86,2 | 83,5 | 86,1 | 84,7 | 84,1 | 12,1 | 12,1 | 13,2 | 12,7 | 14,1 | 14,4 | 10,6 | 9,8 | 9,8 | 9,5 | 9,4 | 9,7 | 9,9 |
| TA-1 | 84,3 | 83,2 | 85,5 | 83,4 | 85,8 | 83,4 | 11,8 | 12,0 | 12,0 | 12,9 | 13,0 | 13,3 | 10,6 | 11,7 | 12,2 | 12,9 | 13,2 | 13,6 | 14,5 |
| TA-2 | 83,4 | 84,7 | 83,6 | 82,9 | 85,3 | 82,8 | 12,0 | 12,2 | 12,2 | 12,9 | 13,2 | 13,4 | 10,5 | 11,7 | 12,2 | 12,9 | 13,3 | 14,7 | 15,7 |
| TA-3 | 82,3 | 86,4 | 84,7 | 86,2 | 86,7 | 82,8 | 12,1 | 12,0 | 12,1 | 12,7 | 12,9 | 13,4 | 10,5 | 11,9 | 12,3 | 13,0 | 13,3 | 13,7 | 14,7 |
| TA-4 | 83,1 | 84,2 | 86,0 | 85,8 | 83,8 | 83,2 | 11,9 | 12,4 | 12,1 | 12,5 | 13,0 | 13,4 | 10,6 | 11,4 | 11,8 | 12,6 | 13,0 | 13,4 | 14,4 |
| MÉDIAS | 83,3 | 86,1 | 84,7 | 84,3 | 85,1 | 83,0 | 11,9 | 12,1 | 12,1 | 12,7 | 13,0 | 13,4 | 10,6 | 11,7 | 12,1 | 12,8 | 13,2 | 13,8 | 14,8 |

Tabela 50. Efeito de diferentes leveduras [Fleischmann, IZ-1904 e TA (M-300-A) inoculadas em meio de melão, ao longo de seis ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: viabilidade celular (%); teor de trealose na célula (% M.S.) antes de iniciar a fermentação e ao final do último ciclo e contaminação bacteriana (nº de bactérias x 10⁻⁶mg/l vinho).

| TRATAMENTOS | VIABILIDADE (%) | | | | | | BACTÉRIAS (cels/ml x 10 ⁶) | | | | | | TREALOSE (%) | |
|-------------|-----------------|-----|----|-----|----|----|--|-----|-----|-----|-----|------|--------------|-------|
| | V1 | V2 | V3 | V4 | V5 | V6 | BC1 | BC2 | BC3 | BC4 | BC5 | BC6 | NICIAL | FINAL |
| FL-1 | 96 | 80 | 99 | 100 | 97 | 97 | 1,8 | 3,0 | 1,9 | 1,2 | 4,5 | 3,8 | - | 10,56 |
| FL-2 | 99 | 96 | 95 | 98 | 98 | 99 | 0,3 | 2,3 | 1,5 | 2,6 | 3,4 | 1,5 | - | 10,47 |
| FL-3 | 100 | 100 | 96 | 99 | 98 | 97 | 1,6 | 1,9 | 1,1 | 1,5 | 1,8 | 1,9 | - | 10,65 |
| FL-4 | 100 | 100 | 98 | 97 | 98 | 97 | 0,4 | 3,8 | 1,4 | 2,3 | 3,4 | 4,1 | 3,41 | 10,92 |
| MÉDIAS | 99 | 94 | 97 | 98 | 96 | 97 | 1,0 | 2,8 | 1,5 | 1,9 | 3,3 | 2,8 | 3,41 | 10,65 |
| IZ-1 | 95 | 86 | 93 | 84 | 88 | 88 | 3,0 | 2,3 | 1,3 | 6,0 | 4,9 | 15,4 | - | 1,54 |
| IZ-2 | 93 | 89 | 83 | 84 | 88 | 90 | 7,1 | 1,9 | 1,9 | 1,5 | 3,0 | 7,1 | - | 1,29 |
| IZ-3 | 89 | 81 | 92 | 82 | 85 | 81 | 3,0 | 7,1 | 2,3 | 2,3 | 1,5 | 13,1 | - | 1,36 |
| IZ-4 | 96 | 87 | 85 | 84 | 84 | 87 | 7,1 | 2,6 | 1,5 | 2,6 | 2,3 | 3,4 | 0,25 | 1,29 |
| MÉDIAS | 93 | 86 | 88 | 83 | 86 | 86 | 5,0 | 3,5 | 1,8 | 3,1 | 2,9 | 9,7 | 0,25 | 1,37 |
| TA-1 | 99 | 99 | 98 | 98 | 99 | 97 | 3,0 | 8,6 | 1,8 | 3,0 | 1,1 | 6,0 | - | 11,10 |
| TA-2 | 99 | 100 | 99 | 97 | 97 | 96 | 1,5 | 2,3 | 6,8 | 1,5 | 2,6 | 6,4 | - | 10,92 |
| TA-3 | 100 | 100 | 99 | 97 | 97 | 97 | 2,4 | 2,3 | 1,9 | 2,3 | 1,9 | 3,0 | - | 10,45 |
| TA-4 | 100 | 99 | 99 | 96 | 96 | 98 | 1,4 | 9,8 | 3,0 | 3,8 | 2,3 | 7,5 | 4,75 | 11,28 |
| MÉDIAS | 99 | 99 | 99 | 97 | 97 | 97 | 2,1 | 5,7 | 3,4 | 2,6 | 2,0 | 5,7 | 4,75 | 11,19 |

Tabela 51. Efeito de diferentes leveduras [Fleischmann, IZ-1904 e TA M-300-A]] inoculadas em meio de melão, em quatro dos seis ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: formação de ácido succínico (mg/l vinho); formação de ácido láctico (mg/l vinho) e formação de ácido acético (mg/l vinho), já descontados os teores dos ácidos orgânicos presentes no meio.

| TRATA- MENTOS | ACIDO SUCCINICO (mg/l) | | | | ACIDO LACTICO (mg/l) | | | | ACIDO ACÉTICO (mg/l) | | | |
|------------------|------------------------|------------|------------|------------|----------------------|-----------|------------|------------|----------------------|------------|------------|------------|
| | SUC1 | SUC2 | SUC5 | SUC6 | LAC1 | LAC2 | LAC5 | LAC6 | ACT1 | ACT2 | ACT5 | ACT6 |
| FL-1 | 300 | 334 | 317 | 387 | 35 | 72 | 104 | 150 | 86 | 270 | 678 | 481 |
| FL-2 | 288 | 346 | 305 | 310 | 63 | 92 | 111 | 107 | 148 | 270 | 678 | 373 |
| FL-3 | 294 | 369 | 317 | 310 | 91 | 85 | 111 | 114 | 123 | 246 | 619 | 393 |
| FL-4 | 399 | 375 | 389 | 351 | 104 | 85 | 118 | 100 | 172 | 221 | 649 | 354 |
| MÉDIAS | 320 | 356 | 332 | 339 | 73 | 83 | 111 | 118 | 135 | 252 | 656 | 400 |
| IZ-1 | 245 | 257 | 389 | 322 | 72 | 45 | 91 | 107 | 160 | 246 | 236 | 167 |
| IZ-2 | 276 | 286 | 413 | 351 | 77 | 45 | 98 | 79 | 184 | 246 | 236 | 157 |
| IZ-3 | 306 | 274 | 377 | 298 | 77 | 32 | 98 | 65 | 258 | 278 | 236 | 138 |
| IZ-4 | 313 | 316 | 371 | 316 | 77 | 32 | 56 | 79 | 221 | 246 | 192 | 177 |
| MÉDIAS | 285 | 283 | 387 | 322 | 76 | 38 | 80 | 82 | 206 | 252 | 229 | 160 |
| TA-1 | 276 | 322 | 347 | 334 | 98 | 85 | 111 | 100 | 123 | 295 | 546 | 177 |
| TA-2 | 313 | 269 | 347 | 298 | 118 | 85 | 104 | 72 | 172 | 295 | 550 | 314 |
| TA-3 | 300 | 345 | 311 | 292 | 111 | 92 | 111 | 65 | 135 | 270 | 550 | 291 |
| TA-4 | 288 | 351 | 341 | 298 | 98 | 85 | 98 | 58 | 123 | 295 | 575 | 285 |
| MÉDIAS | 294 | 322 | 336 | 305 | 106 | 87 | 106 | 79 | 138 | 289 | 555 | 267 |
| MOSTO | 57 | - | - | - | 82 | - | - | - | 147 | - | - | - |

Tabela 52. Efeito de diferentes leveduras [Fleischmann, IZ-1904 e TA (M-300-A)] inoculadas em meio de melaço, ao longo de seis ciclos fermentativos, sobre os valores de pH do vinho e açúcares redutores residuais (AR% P/V).

| TRATA- MENTOS | AÇÚCARES RESIDUAIS (AR%) | | | | | | pH DOS VINHOS | | | | | |
|------------------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|---------------|------|------|------|------|------|
| | AR1 | AR2 | AR3 | AR4 | AR5 | AR6 | pH1 | pH2 | pH3 | pH4 | pH5 | pH6 |
| FL-1 | 0,331 | 0,353 | 0,385 | 0,369 | 0,382 | 0,380 | 4,23 | 4,28 | 4,29 | 4,30 | 4,35 | 4,42 |
| FL-2 | 0,320 | 0,353 | 0,389 | 0,362 | 0,378 | 0,372 | 4,28 | 4,27 | 4,30 | 4,29 | 4,36 | 4,45 |
| FL-3 | 0,320 | 0,349 | 0,385 | 0,362 | 0,370 | 0,369 | 4,28 | 4,26 | 4,30 | 4,29 | 4,38 | 4,43 |
| FL-4 | 0,316 | 0,338 | 0,369 | 0,358 | 0,370 | 0,361 | 4,28 | 4,26 | 4,32 | 4,30 | 4,38 | 4,46 |
| MÉDIAS | 0,322 | 0,348 | 0,382 | 0,363 | 0,375 | 0,371 | 4,27 | 4,27 | 4,30 | 4,30 | 4,37 | 4,44 |
| IZ-1 | 0,313 | 0,357 | 0,373 | 0,365 | 0,390 | 0,376 | 4,51 | 4,46 | 4,48 | 4,46 | 4,49 | 4,69 |
| IZ-2 | 0,302 | 0,338 | 0,357 | 0,350 | 0,366 | 0,353 | 4,51 | 4,46 | 4,50 | 4,48 | 4,51 | 4,72 |
| IZ-3 | 0,320 | 0,349 | 0,369 | 0,362 | 0,378 | 0,368 | 4,50 | 4,48 | 4,52 | 4,50 | 4,50 | 4,72 |
| IZ-4 | 0,324 | 0,375 | 0,385 | 0,369 | 0,394 | 0,396 | 4,50 | 4,46 | 4,51 | 4,48 | 4,51 | 4,70 |
| MÉDIAS | 0,315 | 0,355 | 0,371 | 0,362 | 0,382 | 0,373 | 4,51 | 4,47 | 4,50 | 4,48 | 4,50 | 4,71 |
| TA-1 | 0,320 | 0,353 | 0,357 | 0,358 | 0,374 | 0,369 | 4,28 | 4,30 | 4,35 | 4,32 | 4,36 | 4,46 |
| TA-2 | 0,331 | 0,379 | 0,381 | 0,373 | 0,394 | 0,388 | 4,28 | 4,30 | 4,36 | 4,31 | 4,36 | 4,49 |
| TA-3 | 0,331 | 0,372 | 0,389 | 0,369 | 0,394 | 0,384 | 4,27 | 4,30 | 4,33 | 4,33 | 4,36 | 4,48 |
| TA-4 | 0,331 | 0,357 | 0,373 | 0,369 | 0,386 | 0,388 | 4,28 | 4,28 | 4,32 | 4,35 | 4,37 | 4,43 |
| MÉDIAS | 0,328 | 0,365 | 0,375 | 0,367 | 0,382 | 0,382 | 4,28 | 4,30 | 4,34 | 4,33 | 4,36 | 4,47 |

Tabela 53. Efeito da contaminação bacteriana em meio semi-sintético (estéril; estéril + antibiótico; contaminado e contaminado + antibiótico) sobre a velocidade de fermentação avaliada pela perda de peso (g) a cada hora, no transcorrer de 3 ciclos fermentativos, empregando-se fermento prensado (Fleischmann) incubado a 33°C. Os antibióticos consistiram em virginiamicina e penicilina adicionados nos dois primeiros ciclos (10mg/l cada) e cloranfenicol (100mg/l) no último). Cada dado representa a média de 3 repetições.

| TRATA- MENTOS | CICLO | PERDA DE PESO (g) | | | | | |
|------------------|-------|-------------------|------|------|------|------|------|
| | | 1h | 2h | 3h | 4h | 5h | 6h |
| ESTÉRIL | 1º | 0,51 | 1,72 | 3,26 | 3,77 | 3,84 | 3,88 |
| ESTÉRIL | 2º | 0,47 | 2,16 | 3,54 | 3,96 | 4,06 | 4,11 |
| ESTÉRIL | 3º | 1,52 | 2,85 | 3,92 | 4,03 | 4,10 | 4,14 |
| MÉDIAS | | 0,80 | 2,24 | 3,57 | 3,92 | 4,00 | 4,04 |
| EST+ANT | 1º | 0,31 | 1,52 | 3,11 | 3,63 | 3,69 | 3,74 |
| EST+ANT | 2º | 0,15 | 1,88 | 3,28 | 3,61 | 3,70 | 3,75 |
| EST+ANT | 3º | 1,38 | 2,71 | 3,70 | 3,82 | 3,88 | 3,93 |
| MÉDIAS | | 0,61 | 2,04 | 3,36 | 3,69 | 3,76 | 3,81 |
| CONTAM | 1º | 0,58 | 1,86 | 3,42 | 3,72 | 3,76 | 3,81 |
| CONTAM | 2º | 0,41 | 2,15 | 3,54 | 3,82 | 3,90 | 3,95 |
| CONTAM | 3º | 1,45 | 2,80 | 3,79 | 5,87 | 3,93 | 3,96 |
| MÉDIAS | | 0,81 | 2,27 | 3,58 | 3,80 | 3,86 | 3,9 |
| CONT+ANT | 1º | 0,33 | 1,56 | 3,16 | 3,50 | 3,55 | 3,60 |
| CONT+ANT | 2º | 0,08 | 1,78 | 3,14 | 3,46 | 3,50 | 3,59 |
| CONT+ANT | 3º | 1,08 | 2,37 | 3,51 | 3,64 | 3,74 | 3,75 |
| MÉDIAS | | 0,50 | 1,90 | 3,27 | 3,53 | 3,62 | 3,65 |

Tabela 54. Efeito da contaminação bacteriana em meio semi-sintético (estéril; estéril + antibiótico; contaminado e contaminado + antibiótico), em três ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: eficiência fermentativa; formação de glicerol (g/100g Etanol) e peso de fermento (g). Os antibióticos constistiram em virginiamicina e penicilina adicionados nos dois primeiros ciclos (10mg/l cada) e cloranfenicol (100mg/l) no último.

| TRATA- MENTOS | EFICIENCIA | | | GLICEROL (g/100gEtOH) | | | PESO DE FERMENTO (g) | | |
|------------------|------------|------|------|-----------------------|------|-----|----------------------|------|------|
| | E1 | E2 | E3 | G1 | G2 | G3 | P1 | P2 | P3 |
| ESTÉRIL-1 | 82,1 | 86,6 | 84,9 | 11,8 | 9,7 | 8,6 | 12,8 | 13,3 | 14,0 |
| ESTÉRIL-2 | 82,6 | 86,5 | 83,4 | 11,2 | 9,5 | 8,6 | 12,8 | 13,4 | 13,7 |
| ESTÉRIL-3 | 82,0 | 87,5 | 88,3 | 11,3 | 9,4 | 8,4 | 12,7 | 13,3 | 13,9 |
| MÉDIAS | 82,2 | 86,9 | 83,9 | 11,4 | 9,5 | 8,5 | 12,8 | 13,3 | 13,8 |
| EST+ANT-1 | 81,5 | 86,0 | 81,6 | 11,6 | 9,7 | 9,2 | 12,7 | 13,3 | 13,9 |
| EST+ANT-2 | 81,5 | 85,6 | 83,4 | 11,3 | 9,7 | 8,8 | 12,3 | 13,3 | 13,6 |
| EST+ANT-3 | 81,6 | 87,7 | 83,5 | 11,3 | 9,3 | 8,6 | 12,8 | 13,4 | 13,6 |
| MÉDIAS | 81,5 | 86,4 | 82,8 | 11,4 | 9,6 | 8,9 | 12,8 | 13,3 | 13,7 |
| CONTAM-1 | 80,1 | 83,0 | 79,5 | 11,6 | 9,8 | 9,8 | 12,1 | 12,7 | 13,1 |
| CONTAM-2 | 80,2 | 82,9 | 79,5 | 11,4 | 10,1 | 9,7 | 12,2 | 12,7 | 13,1 |
| CONTAM-3 | 81,4 | 82,9 | 79,5 | 11,8 | 10,1 | 9,6 | 12,1 | 12,6 | 13,0 |
| MÉDIAS | 80,6 | 82,9 | 79,5 | 11,6 | 10,0 | 9,7 | 12,1 | 12,7 | 13,1 |
| CONT+ANT-1 | 81,6 | 83,2 | 85,2 | 11,3 | 9,9 | 9,0 | 12,0 | 12,6 | 13,9 |
| CONT+ANT-2 | 81,7 | 83,7 | 84,7 | 11,3 | 9,8 | 8,9 | 12,1 | 12,6 | 13,0 |
| CONT+ANT-3 | 81,7 | 83,7 | 84,7 | 11,3 | 9,8 | 9,0 | 12,1 | 12,7 | 13,0 |
| MÉDIAS | 81,7 | 83,5 | 84,9 | 11,3 | 9,8 | 9,0 | 12,1 | 12,6 | 13,3 |

Tabela 55. Efeito da contaminação bacteriana em meio semi-sintético (estéril; estéril + antibiótico; contaminado e contaminado + antibiótico), em três ciclos fermentativos, sobre os seguintes parâmetros: viabilidade celular (%); teor de trealose na célula (% M.S.) antes de iniciar a fermentação e ao final do último ciclo e contaminação bacteriana (nº de bactérias x 10⁻⁶/ml vinho). Os antibióticos constistiram em virginiamicina e penicilina adicionados nos dois primeiros ciclos (10mg/l cada) e cloranfenicol (100mg/l) no último.

| TRATA- MENTOS | VIABILIDADE | | | BACTÉRIAS (cels/ml x 10 ⁻⁶) | | | TREALOSE (%) | |
|------------------|-------------|----|----|---|------|------|--------------|-------|
| | V1 | V2 | V3 | BAC1 | BAC2 | BAC3 | INICIAL | FINAL |
| ESTÉRIL-1 | 99 | 98 | 95 | 25 | 7 | 8 | 0,94 | 2,16 |
| ESTÉRIL-2 | 97 | 95 | 93 | 29 | 11 | 7 | 1,06 | 3,79 |
| ESTÉRIL-3 | 98 | 97 | 91 | 32 | 15 | 10 | - | 2,82 |
| MÉDIAS | 98 | 97 | 93 | 29 | 11 | 8 | 1,00 | 2,92 |
| EST+ANT-1 | 99 | 94 | 94 | 10 | 6 | 1 | 0,94 | 2,45 |
| EST+ANT-2 | 99 | 97 | 95 | 16 | 15 | 3 | 1,06 | 2,85 |
| EST+ANT-3 | 100 | 97 | 95 | 18 | 8 | 2 | - | 2,82 |
| MÉDIAS | 99 | 96 | 95 | 15 | 10 | 2 | 1,00 | 2,71 |
| CONTAM-1 | 97 | 95 | 92 | 429 | 483 | 598 | 0,94 | 3,57 |
| CONTAM-2 | 97 | 94 | 96 | 498 | 515 | 414 | 1,06 | 2,68 |
| CONTAM-3 | 98 | 93 | 92 | 432 | 570 | 669 | - | 3,62 |
| MÉDIAS | 97 | 96 | 93 | 453 | 523 | 560 | 1,00 | 3,29 |
| CONT+ANT-1 | 97 | 97 | 94 | 386 | 421 | 13 | 0,94 | 2,08 |
| CONT+ANT-2 | 98 | 97 | 94 | 408 | 478 | 17 | 1,06 | 2,31 |
| CONT+ANT-3 | 98 | 97 | 92 | 438 | 502 | 19 | - | 2,45 |
| MÉDIAS | 98 | 97 | 93 | 411 | 467 | 16 | 1,00 | 2,28 |

Tabela 56. Efeito da contaminação bacteriana em meio semi-sintético (estéril; estéril + antibiótico; contaminado e contaminado + antibiótico) sobre os seguintes parâmetros: formação de ácido succínico (mg/l vinho); formação de ácido láctico (mg/l vinho) e formação de ácido acético (mg/l vinho), já descontados os teores dos ácidos presentes nos meios. Os antibióticos consistiram em virginiamicina e penicilina adicionados nos dois primeiros ciclos (10mg/l cada) e cloranfenicol (100mg/l) no último.

| TRATA- MENTOS | AC.SUCCINICO(mg/l) | | | AC.LATICO(mg/l) | | | AC.ACÉTICO(mg/l) | | |
|------------------|--------------------|------|------|-----------------|------|------|------------------|------|------|
| | SUC1 | SUC2 | SUC3 | LAC1 | LAC2 | LAC3 | ACT1 | ACT2 | ACT3 |
| EST-1 | 360 | 410 | 294 | 188 | 208 | 254 | 265 | 351 | 265 |
| EST-2 | 371 | 366 | 304 | 162 | 155 | 307 | 303 | 294 | 284 |
| EST-3 | 360 | 366 | 327 | 109 | 155 | 267 | 246 | 275 | 256 |
| MÉDIAS | 364 | 381 | 308 | 153 | 173 | 267 | 271 | 307 | 268 |
| EST+ANT-1 | 399 | 415 | 349 | 129 | 149 | 149 | 227 | 284 | 208 |
| EST+ANT-2 | 404 | 415 | 316 | 96 | 182 | 155 | 227 | 332 | 284 |
| EST+ANT-3 | 426 | 415 | 333 | 122 | 135 | 135 | 303 | 303 | 237 |
| MÉDIAS | 410 | 415 | 333 | 116 | 155 | 146 | 252 | 306 | 243 |
| CONTAM-1 | 382 | 366 | 344 | 244 | 283 | 158 | 311 | 148 | 317 |
| CONTAM-2 | 366 | 371 | 316 | 297 | 349 | 441 | 283 | 91 | 412 |
| CONTAM-3 | 371 | 344 | 250 | 362 | 316 | 388 | 359 | 72 | 383 |
| MÉDIAS | 373 | 360 | 303 | 301 | 316 | 329 | 318 | 104 | 371 |
| CON+ANT-1 | 415 | 327 | 250 | 349 | 303 | 336 | 349 | 81 | 307 |
| CON+ANT-2 | 371 | 322 | 267 | 132 | 204 | 131 | 283 | 129 | 269 |
| CON+ANT-3 | 355 | 316 | 245 | 165 | 86 | 171 | 254 | 100 | 288 |
| MÉDIAS | 380 | 322 | 254 | 215 | 198 | 213 | 295 | 103 | 288 |
| MOSTO EST | 24 | - | - | 49 | - | - | 20 | - | - |
| MOSTO CONTAM | 24 | 24 | 24 | 1280 | 1400 | 1520 | 183 | 223 | 254 |

Tabela 57 . Efeito da contaminação bacteriana em meio semi-sintético estéril; estéril + antibiótico, contaminado e contaminado + antibiótico), sobre os valores de pH dos vinhos e açúcares redutores residuais (AR% P/V). Os antibióticos consistiram em virginamicina e penicilina adicionados nos dois primeiros ciclos (10mg/l cada) e cloranfenicol (100mg/l) no último.

| TRATA- MENTOS | AÇUCARES RESIDUAIS (%) | | | pH DOS VINHOS | | |
|------------------|------------------------|-------|-------|---------------|------|------|
| | AR1 | AR2 | AR3 | pH1 | pH2 | pH3 |
| EST-1 | 0,007 | 0,006 | 0,006 | 3,78 | 3,95 | 4,08 |
| EST-2 | 0,006 | 0,005 | 0,005 | 3,86 | 4,03 | 4,11 |
| EST-3 | 0,005 | 0,004 | 0,004 | 3,82 | 4,01 | 4,14 |
| MÉDIAS | 0,006 | 0,005 | 0,005 | 3,82 | 4,00 | 4,11 |
| EST+ANT-1 | 0,004 | 0,006 | 0,003 | 3,70 | 3,89 | 4,02 |
| EST+ANT-2 | 0,008 | 0,008 | 0,006 | 3,71 | 3,91 | 4,02 |
| EST+ANT-3 | 0,006 | 0,006 | 0,005 | 3,73 | 3,96 | 4,10 |
| MÉDIAS | 0,006 | 0,007 | 0,005 | 3,71 | 3,92 | 4,05 |
| CONTAM-1 | 0,005 | 0,005 | 0,004 | 3,54 | 3,66 | 3,70 |
| CONTAM-2 | 0,008 | 0,006 | 0,006 | 3,57 | 3,64 | 3,68 |
| CONTAM-3 | 0,006 | 0,006 | 0,006 | 3,53 | 3,64 | 3,69 |
| MÉDIAS | 0,006 | 0,006 | 0,005 | 3,55 | 3,65 | 3,69 |
| CONT+ANT-1 | 0,009 | 0,009 | 0,005 | 3,59 | 3,68 | 3,71 |
| CONT+ANT-2 | 0,008 | 0,008 | 0,006 | 3,59 | 3,67 | 3,72 |
| CONT+ANT-3 | 0,009 | 0,008 | 0,005 | 3,50 | 3,66 | 3,74 |
| MÉDIAS | 0,009 | 0,008 | 0,005 | 3,56 | 3,67 | 3,72 |