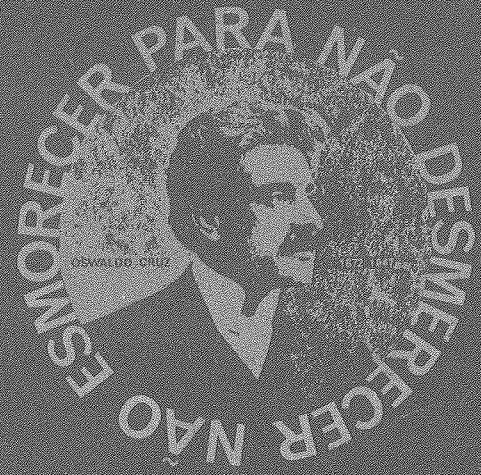
Volume 7 Número 4 Out.-Dez. 1976

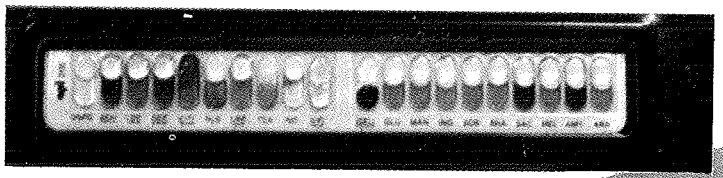
Revista de Microbiologia

Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo – Brasil



api system

abriu o caminho da estandardização na identificação bacteriológica.

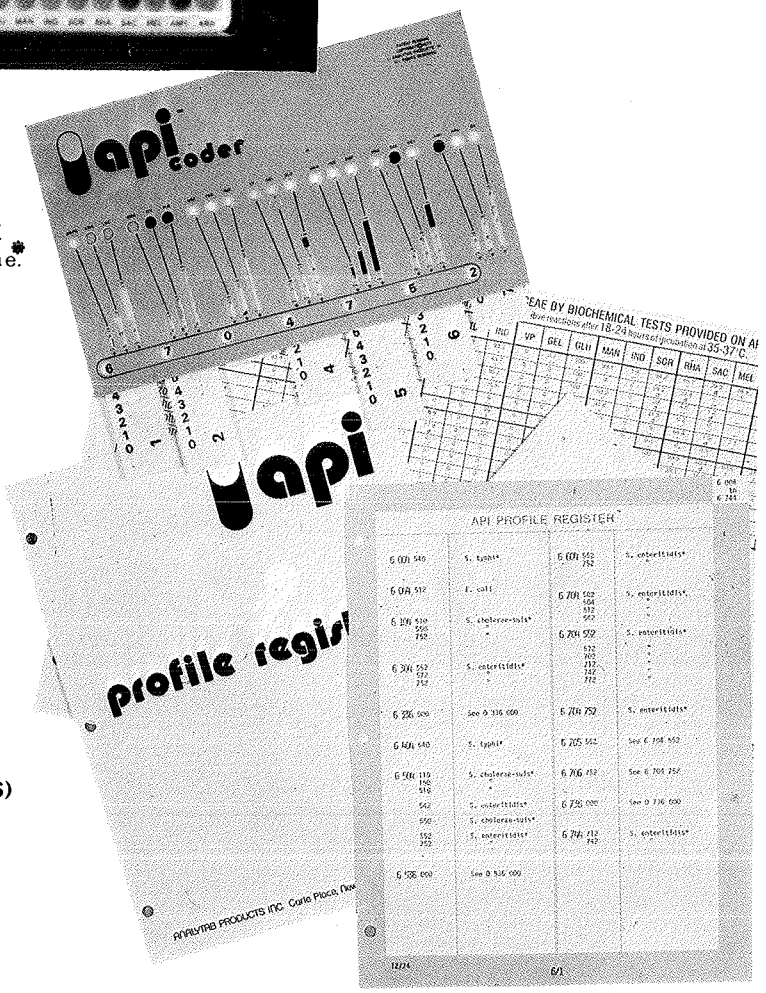


API 20 E e o SISTEMA DE LEITURA CODIFICADA põem à disposição dos laboratórios mais de 25.000 cepas registradas de ENTEROBACTERIACEAE e outros GRAM ⊖ não-Enterobacteriaceae*. Esse é o resultado de vários anos de colaboração entre utilizadores, centros de referência e os serviços de pesquisa API na França e na América. E, amanhã, esse número crescerá ainda mais com a sua participação.

*Pseudomonas, Aeromonas, Víbrio, Moraxela, etc.

Sempre com o mesmo princípio de microtécnica padronizada API SYSTEM identifica também:

- **os germes anaeróbios (API 20 ANAERÓBIOS)**
- **os agentes das principais micoses encontradas em clínica (API 20 CÂNDIDA)**
- **germes os mais diversos (API 50 PESQUISA, API 50 LACTOBACILLUS)**
- **ou apenas as Enterobacteriaceae (API 10 SCREEN)**



BIOLAB-MÉRIEUX PRODUTOS PARA LABORATÓRIOS LTDA.

Rua do Resende, 96-A – 2.° andar – Tels.: 221-4089 e 242-0050
RIO DE JANEIRO, RJ. – 20.000 – ZC-06

SÃO PAULO – BRASÍLIA – PORTO ALEGRE – RECIFE – BELO HORIZONTE

Revista de Microbiologia

Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo – Brasil

Conselho Editorial Luiz Rachid Trabulsi, Italo Suassuna e Wilson Chagas de Araujo

Editor João Salvador Furtado
Instituto de Botânica
Caixa Postal 4005
01000 São Paulo SP

Editores Associados Antônio F. Pestana de Castro e Sílvio A.C. Camba

Aquisição por não-membros Assinatura anual para quatro números: Cr$ 120,00 para o Brasil; US$ 20.00 (via marítima) ou US$ 25.00 (via aérea) para o Exterior. Números avulsos: Cr$ 30,00 para o Brasil e US$ 6.50 (via aérea) ou US$ 5.00 (via marítima) para o Exterior. Cheques ou ordens de pagamento em nome da Sociedade Brasileira de Microbiologia, para o endereço do Editor.

Acquisition by non-members Annual subscription for four numbers: US$ 20.00 (surface mail) or US$ 25.00 (air mail). Single copies: US$ 6.50 (air mail) or US$ 5.00 (surface mail). Checks or money orders for Sociedade Brasileira de Microbiologia, addressed to the Editor's office.

Sociedade Brasileira de Microbiologia

Diretoria Gobert A. Costa, Presidente. Cláudio A. Jürgensen, Vice Presidente. Flávio Alterthum, Secretário Geral. João S. Furtado, Tesoureiro.

Conselho Científico Amadeu Cury, Augusto E. Taunay, A. Monteiro Filho, Carlos da Silva Lacaz, Ciro A. Peluffo, Dácio de A. Christóvão, Dirce Franco de Araujo, Eduardo O. Cisalpino, Gobert A. Costa, Homero S. Jobin, Jandira Planet do Amaral, João Xavier Viana, José Noronha Peres, José Oliveira de Almeida, Lúcio P. de Carvalho Lima, Luiz Siqueira Carneiro, Milton Fontes Magarão, Oswaldo G. de Lima, Otávio Barachini, Otto G. Bier, Paulo de Góes, Raymundo A.C. Moniz de Aragão, Seymor H. Hutner, Werner K. Maas.

Delegados Regionais ALAGOAS: Ayro Pontes Lima Bomfim (Maceió). AMAZONAS: Aurélia Lopes Castrillon (Manaus). BAHIA: Carlos Brenha Chaves (Salvador). CEARÁ: Eldair dos Santos Sátiro (Fortaleza). ESPÍRITO SANTO: Henrique Tommasi Netto (Vitória). GÓIAS: Maria Aparecida Muniz (Goiânia). GUANABARA: Altair Antunes Zebral (Rio de Janeiro) e Milton de Uzeda (Rio de Janeiro). MARANHÃO: Salomão Fiquene (São Luiz). MINAS GERAIS: Romain Rolland Golgher (Belo Horizonte). PARÁ: Zéa Constante Lins (Belém). PARAÍBA: Maria Marluce Melo Vasconcelos de Castro (João Pessoa). PARANÁ: Alceu Schwab (Curitiba) e Luiz Parelha Ruiz (Londrina). PERNAMBUCO: Diva Montenegro Melo de Azevedo (Recife) e Marcelo Magalhães (Recife). RIO GRANDE DO NORTE: Maria Raquel dos Santos (Natal). RIO GRANDE DO SUL: Sérgio Job Jobim (Porto Alegre) Newton Neves da Silva (Porto Alegre) e Tabajara Gaúcho da Costa (Santa Maria). RIO DE JANEIRO: Cláudio Armando Jürgensen (Niterói). SANTA CATARINA: Aquilles A. Cordova Santos (Florianópolis). SÃO PAULO: Deise Pasetto Falcão (Araraquara). Vicente Correa Miranda (Araraquara), Augusto Cezar Montelli (Botucatu) Izabel Yoko Ito (Ribeirão Preto), Antônio Walter Ferreira (São Paulo), Waldyr Giorgi (São Paulo) e Edécio Maluf (Sorocaba). SERGIPE: Raimundo Mendonça de Araujo (Aracaju).

Instruções aos autores

A Revista de Microbiologia publica trabalhos originais em todos os campos da microbiologia e da protozoologia. Revisões e atualizações serão publicadas a convite do conselho editorial.

Os manuscritos devem ser enviados em duplicata (original e uma cópia) para o Editor da Revista.

NORMAS GERAIS — Todo manuscrito submetido à Revista deve representar pesquisa original inédita e que não será publicada em outro órgão. Os trabalhos podem ser redigidos em português, espanhol ou inglês. Se aceitos pela Revista, não poderão ser reproduzidos, mesmo em partes, sem permissão oficial dos Editores.

A Revista segue, essencialmente, o "Style Manual for Biological Journals" (2ª edição, AIBS, 1964). Os símbolos genéticos devem seguir, essencialmente, as recomendações de Demerec & col. (*Genetics,* 54: 61, 1966). Abreviações bioquímicas devem seguir, essencialmente, as regras da IUPAC-IUB (*J. Biol. Chem.,* 241: 527, 1966). Atividade enzimática deve ser expressa em termos de unidades internacionais (Enzyme Nomenclature, Elsevier Publ. Co., 1965). Para pesos e volumes, devem ser usados os prefixos nano (n) e pico (p), ao invés de milimicro (mμ) e micromico ($\mu\mu$). Comprimentos devem ser expressos em micrômetro (μm; 10^{-6}m), ao invés de micro (μ); nanômetro (nm; 10^{-9}m), ao in- de milimicro (mμ); e Angstroms (A; 10^{-10}m). Partes por milhão (ppm) devem ser expressas como microgramos por mililitros (μg/ml) ou microlitros por litro (μ litros/litro). A Revista se reserva o direito de adaptar os manuscritos ao estilo adotado.

NOMENCLATURA DE MICRORGANISMOS — A combinação binomial, nome do gênero seguido do da espécie, é adotada e a nomenclatura apresentada no "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (7ª ed., 1957) obedecida. Se o Autor divergir dessa nomenclatura, seu julgamento será respeitado, mas a classificação correspondente ao Manual de Bergey deverá ser mencionada a seguir, entre parênteses, à primeira vez em que o nome figurar no texto e no resumo.

Quando um nome novo for proposto para um microrganismo, será solicitada a opinião de uma autoridade internacional em taxonomia.

FORMA DO MANUSCRITO — Os trabalhos devem ser datilografados em papel branco, comum, tamanho ofício, em espaço duplo ou triplo, deixando-se o mínimo de 3 cm de margens laterais, superior e inferior. Títulos de capítulos de primeira ordem devem ser centrados, incluídos essencialmente pela ordem: **Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos, Referências Bibliográficas.** Os de subcapítulos devem ser junto à margem esquerda.

A *página-título* deverá conter apenas e tão somente: (i) o título do artigo, centrado usando-se letras maiúsculas somente quando obrigatórias, (ii) o(s) nome(s) do(s) autor(es) com maiúsculas e minúsculas normalmente usadas e (iii) afiliação como nota de rodapé, indicada por asterisco.

O *resumo* não deverá ultrapassar 250 palavras. Os trabalhos redigidos em inglês devem ser acompanhados de um título e resumo em português; os redigidos em português e espanhol, de um título e resumo em inglês. O resumo na língua do trabalho e o título com resumo na outra língua devem ser datilografados em página separada do restante do texto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS — No texto, as referências devem ser citadas por número. Os sobrenomes de dois autores devem ser separados por &; quando houver mais de dois autores, a separação é feita por ponto e vírgula e o último por &. Na secção **Referências Bibliográficas,** as citações devem ser por ordem alfabética de autor (ou da mesma combinação de autores) e, para um mesmo autor, em ordem cronológica, numeradas sequencialmente. Os artigos em periódicos devem ser citados na seguinte ordem: nome(s) do(s) autor(es) em maiúsculas, título do trabalho, nome do periódico (abreviado de acordo com o World Medical Periodicals), número do volume, número do fascículo (quando desejado; colocado entre parênteses), número da primeira e da última página do artigo, e ano da publicação.
Exemplo:

WEISER, O.L. & EMERSON, J.S. — Selective screening for quantitative urine cultures. *Amer. J. clin. Path.,* 45:649-650, 1966.

Quando puder ocorrer confusão com o título do periódico, o local da publicação deverá ser mencionado entre parênteses, após a abreviação. Exemplo: *Publ. Hlth Rep. (Wash.).*

Citações de livros devem ter a seguinte ordem: autor(es), título, edição, local, editores e data. Exemplo:

MILLER, S.E. — A textbook of clinical pathology. 6th ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1960.

Citações de "resumos", "dados não publicados", "comunicações pessoais" ou "no prelo" poderão ser adequadamente mencionadas no texto, mas não serão aceitas como referências bibliográficas.

TABELAS — Devem ser numeradas em arábico e datilografadas em páginas separadas. Os dados devem ser arranjados de maneira que colunas de material idêntico sejam lidas perpendicular e não transversalmente. Cabeçalhos e legendas devem ser suficientemente claros e compreensíveis, sem necessidade de consulta ao texto. São permitidas notas explanativas de rodapé indicadas por asteriscos, mas não descrições pormenorizadas dos experimentos. Materiais e métodos utilizados para a obtenção dos resultados devem ser incluídos na secção correspondente.

ILUSTRAÇÕES — Cada uma das duas vias do manuscrito deverá ser acompanhada de um conjunto completo de ilustrações (preferivelmente como fotografias). Os gráficos e desenhos devem ser concluídos, não requerendo qualquer montagem ou rearranjo. Nenhuma parte do gráfico deverá ser datilografada, devendo ser usado um e o mesmo normógrafo. As fotografias de ilustrações a traço devem ser feitas em papel de alto contraste apropriado. É recomendável submeter gráficos e desenhos no dobro da impressão final da Revista, prevendo-se todos os elementos da figura para as escalas de redução. Fotografias com retícula devem ser feitas em papel brilhante, com contraste adequado para reprodução na escala 1:1, observados os espaços máximos disponíveis na Revista e seus submúltiplos, reservando-se espaço suficiente para a legenda. Sempre que houver escala de aumento ou redução, esta deverá ser superposta ou desenhada diretamente na fotografia ou figura. Ver instruções sobre legendas, notas de rodapé, etc. sob TABELAS. Proteja as ilustrações durante o trânsito, com uma folha de papelão.

NOTAS BREVES — Não devem exceder a 500 palavras e o respectivo resumo não mais do que 25. O(s) autor(es) deve(m) consultar um número da Revista para familiarização com a forma e o estilo.

SEPARATAS — Serão fornecidas, gratuitamente, 10 separatas por artigo. Para encomendas maiores, o(s) autor(es) deve(m) entrar em entendimento com o Editor, correndo as despesas por conta dos interessados.

Revista de Microbiologia

Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia

Volume 7 Outubro-Dezembro 1976 Número 4

Rev. Microbiol. (S. Paulo), 7(4)

CONTEÚDO – CONTENTS

Artigos originais

Ethionine resistence in the enteric yeast *Candida slooffii* – Eliana R. M. Barreto & L. R. Travassos 75

Seleção e uso de microrganismos com vistas à otimização dos processos de fabricação de produtos fermentados de leite [*Selection and use of micro-organisms suitable for fermented dairy products*] – J. Cal-Vidal 82

Cultivo contínuo de microrganismos em regime transitório [*Unsteady-state continuous culture of yeast cells*] – Walter Borzani, Marina L. R. Vairo, Rosana E. Gregori, Margarida M. dos A. Magalhães & Lilian B. Chueiri. . . . 88

Estudo preliminar da vinhaça como substrato para leveduras [*Preliminary study of the vinesse as a substrate for yeast growth*] – Sâmia Maria Tauk 92

Microbiologia nos planos de governo: pesquisa e desenvolvimento [*Microbiology in governmental programs: research and development*] – João S. Furtado 98

of resistance in one of these mutants appeared to involve the increased degradation of ethionine before its conversion to *S*-adenosylethionine (SAE). Due in part to this degradation there was a decreased incorporation of the radioactively labeled ethyl-group of ethionine into the various cellular fractions of the resistant mutant(10).

In the present paper, the *etr* mutant of *C. slooffii* was further studied in connection with its ability to grow with SAE, to synthesize macromolecules in presence of ethionine, or sulfonucleosides when growing in a synthetic medium, to incorporate ethionine in proteins or carry out transethylation reactions of ribonucleic (RNA) and deoxyribonucleic (DNA) acids in comparison with similar reactions involving methionine.

Materials and Methods

Microorganisms — A strain of *C. slooffii*, nº 2419 from the Centraalbureau voor Schimmelcultures was used throughout the experiments. The *etr* mutant strain was the same studied before(9); however, after several transfers on Sabouraud medium this strain acquired the ability to grow at 43°C (unlike the original mutant strain) while keeping its resistance to 3μmoles/ml of DL-ethionine. Both sensitive and resistant strains of *C. slooffii* were maintained as described previously(9).

Radiochemicals — They were purchased from the New England Nuclear Corp. Specific activities were: L-ethionine-ethyl-1-^{3}H 45.8mCi/mmole, adenine-8-^{14}C 5.58mCi/mmole, uracil-^{3}H 5.61Ci/mmole, L-leucine-4,5-^{3}H 38.6Ci/mmole, L-tyrosine-3-^{3}H 27.6Ci/mmole, L-methionine-methyl-^{3}H 0.19 Ci/mmole.

Basal medium — The defined medium at pH 3.0 as described before(9) was used to grow *C. slooffii* as well as to suspend mass of cells for measuring the incorporation of radiochemicals and study the influence of ethionine.

S-adenosylethionine —SAE was synthesized as the bromide salt according to the procedure of Stekol (20).

Biosynthesis of sulfonucleosides —The short column technique of Shapiro & Ehninger (16) was used to determine the synthesis of *S*-adenosylmethionine (SAM) and SAE in *etr* and ethionine-sensitive (*ets*) cells. Cells were grown on Sabouraud medium, washed in saline and incubated with 6.7mM DL-ethionine or DL-methionine in the glucose-salts solution of Stekol (20) for 24h at 37C or 43C. Cells were then extracted with 1.5N perchloric acid and the extracts fractionated, in 8% cross-linked, 200-400 mesh, Dowex 50W Na^+ columns.

To determine the synthesis of sulfonucleosides in growing cells of *C. slooffii*, the *ets* and *etr* strains were inoculated in 500ml of basal medium (9) and incubated at 37°C. At half the logarithmical phase of growth (O.D. = 0.28) which was attained after 24h and 31h of incubation in the *ets* and *etr* cultures respectively, ethionine or methionine was added and the incubation was prolonged for 6 hours. The cells were then centrifuged and extracted as above.

Isolation of RNA, DNA and protein —The procedure of Smith & Salmon (17) was used for the isolation of nucleic acids from whole cells of *C. slooffii*. The method of Roberts & Col. (14) was used for the isolation of the protein fraction.

RNA and DNA determination — RNA was determined by the orcinol method (3) after purification of the extracts in Dowex 2 according to Miura & Hayashi (12). DNA was determined by the diphenylamine method (5).

Incorporation of radiochemicals — Cells were grown in 1 liter of basal medium for 48h at 37°C then were centrifuged and resuspended in the same medium to which glucose (1%) was added. Radiochemicals and non-radioactive substances were pipetted into flasks containing 10ml of cell suspension and aliquots were taken at different times for radioactivity determination. With this purpose, the suspensions were filtered in Millipore filters and the latter were immersed into vials with diphenyloxazole 4g, 1,4-*bis*-2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl) benzene 0.1 g and toluene to 1,000ml, for radioactivity counting in a Beckman scintillation spectrometer. Filtered supernatants were pipetted directly into vials containing: naphthalene 60g, diphenyloxazole 4g, 1,4-*bis*-2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl) benzene 0.2g, methanol 100ml, ethylene glycol 20ml, and *p*-dioxane to 1,000ml.

Results

Sensitivity to SAE — The growth response of *ets* and *etr* strains of *C. slooffii* to a single dose (0.6μmoles/ml) of SAE is shown in Figure 1. At lower concentrations (0.1μmoles/ml) ethionine fully inhibited growth of the *ets* strain. This may be due to the different permeability rates to ethionine and SAE exhibited by these cells. The *etr* cells on the contrary could tolerate concentrations of ethionine as high as 3μmoles/ml but were inhibited by similar concentrations of SAE. The inhibitory activity of SAE (0.6μmoles/ml) was more pronounced in the *etr* than in the *ets* cells.

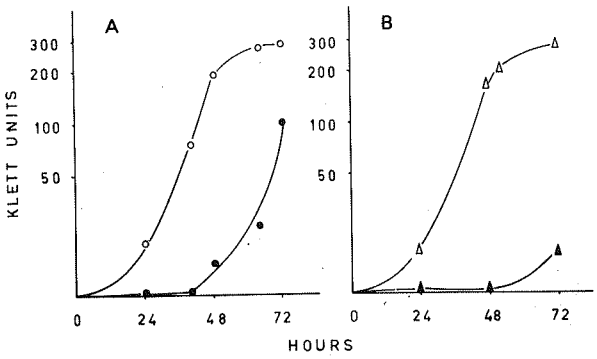


Fig. 1 – Growth inhibition of *ets* and *etr* cells by *S*-adenosylethionine. Synthetic medium as in Mendonça and Travassos (1972).
A = *ets* strain; B = *etr* strain. Solid symbols = *S*-adenosylethionine (0.6 μmoles/ml)

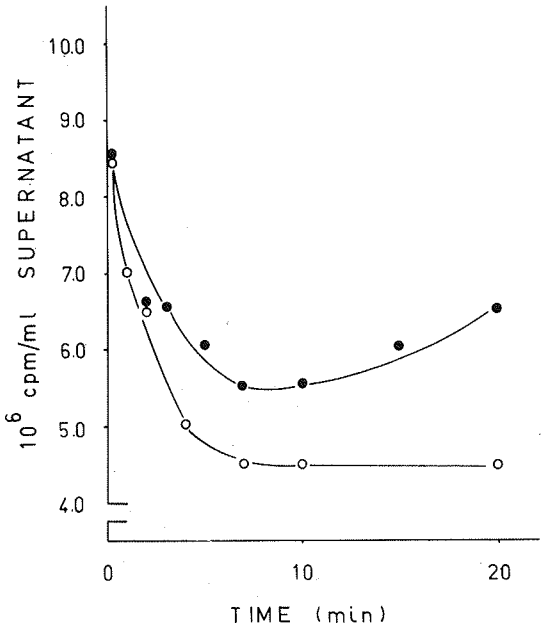


Fig. 2 – Incorporation and excretion of radioactivity from ethionine-^{3}H in *ets* and *etr* cells. Incubation system is described in Material and Methods. Additions: ethionine-^{3}H 1.5 μCi/ml plus DL-ethionine 0.01mg/ml. Open circles: *ets* cells; solid circles: *etr* cells.

Synthesis of SAM and SAE – Since the *etr* strain used in the present paper was somewhat different from the one studied before (9) at least in its capacity to grow at 43°C, it was necessary to check if its behavior towards the synthesis of sulfonucleosides was the same as reported previously. A different method was also used to determine SAM and SAE in whole yeast cells (16). The results are shown in Table 1. Two different incubation temperatures were explored. The levels of sulfonucleosides synthesized by growing cells of *ets* and *etr* strains are shown in Table 2. In all instances the *etr* strain synthesized much less SAM and SAE than the *ets* strain in these conditions.

Excretion of radioactivity from ethionine-ethyl-^{3}H – Under the conditions used for studying the incorporation of radiochemicals by yeast cells suspended in their own growth medium, ethionine-^{3}H was rapidly taken up by both *etr* and *ets* cells. A moderate excretion of the radioactivity was evident in the *etr* cells (Fig. 2).

Table 1

Synthesis of SAE and SAM in *ets* and *etr* strains of *C. slooffii* at two different temperatures[a]

Temperature	*ets* strain		*etr* strain	
	SAE	SAM	SAE	SAM
37°C	9.7	11.7	9.4	9.4
43°C	12.5	16.9	16.2	13.9

[a] Values are in μmoles/g dry cells; conditions for SAM and SAE synthesis in non-growing cells are described in Material and Methods.

Table 2

Synthesis of sulfonucleosides by growing cells of *C. slooffii* on a synthetic medium[a]

Additions	*ets* cells	*etr* cells
No addition	5.22	1.74
DL-methionine 30mg%	3.51	1.71
DL-ethionine 30mg%	4.42	2.08

[a] Values are in μmoles/g dry cells; amino acids were added at the logarithmical phase of growth (O.D. = 0.28): time of incubation of 24h for the *ets* and 31h for the *etr* cells.

Transmethylation and transethylation of RNA and DNA – The incorporations of the radioactivity from methionine-methyl-^{3}H and ethionine-ethyl-1-^{3}H in the RNA and DNA fractions from *ets* and *etr* cells are shown in Figures 3 and 4. The *ets* strain methylated RNA and DNA more rapidly than the *etr* strain. The final yield of methyl group incorporation was greater in the *ets* than in the *etr* strain. The same was observed for the ethylation of both RNA and DNA. The yield of transmethylation of RNA was greater than that of transethylation in the *ets* strain. Transethylation of nucleic acids in the *ets* strain was 4–5 times as efficient as in the *etr* strain. The same pattern observed for the alkylation rates of RNA was also obtained for the corresponding transmethylation/transethylation rates of DNA in both strains.

Discussion

The mechanisms proposed for explaining ethionine resistance in microorganisms often depended upon the ratios of *S*-adenosylethionine to *S*-adenosylmethionine synthesized in the *etr* as compared with the *ets* cells. As suggested by Mertz & Spence (11) if a cell has a low level of SAM it becomes more sensitive to SAE. This seemed to be the case of growing cells of ethionine-resistant *C. slooffii.* The fact that the *etr* strain of *C. slooffii* was inhibited by SAE but not by equimolar amounts of ethionine seems to indicate that the formation of SAE is an important step in the mechanism of ethionine toxicity. Several resistant mutants of *S. cerevisiae* were able to hydrolyze SAE; the corresponding *ets* cells accumulated 25 times as much SAE and twice as much SAM as the *etr* cells (19). Under different conditions, Mertz & Spence (11) found that the *ets* cells formed 4 times as much SAE as the *etr* cells. The medium used did not contain methionine. In addition, the methionine-adenosyl transferase activity in the *ets* cells was 3-fold greater than in the *etr* cells in the same medium. Such a difference was not observed when the cells grew on a tryptone-yeast extract medium or on a synthetic medium with methionine. Apparently methionine acted as a co-repressor of the methionine-adenosyl transferase synthesis (11). In our experiments with *C. slooffii* only small differences in sulfonucleoside levels could be detected in the *etr* as compared with the *ets* cells when the yeasts were grown on Sabouraud medium and incubated with methionine or ethionine as described by Stekol (20). Cells of the *ets* strain of *C. slooffii* growing on a synthetic medium in the absence of methionine synthesized, however, 3 times as much sulfonucleosides as the *etr* cells. The addition of methionine or ethionine to logarithmically growing cells did not stimulate the synthesis of sulfonucleosides and even depressed it in the *ets* strain of *C. slooffii.* These results contrast with those obtained in non-growing systems.

Since SAE is toxic in the *etr* cells of *C. slooffii* and since there is some excretion of the radioactivity from ethionine-ethyl-1-^{3}H in the *etr* but not in the *ets* cells, the mechanism of resistance probably involves in part the degradation of ethionine before it is converted to SAE as proposed previously (10). Moreover the incorporation of the ethyl group of ethionine in RNA and DNA was much less in the *etr* than in the *ets* cells. This could also be due to the partial degradation of ethionine in the *etr* cells. However, since the incorporation of the methyl group from methionine-methyl-^{3}H in RNA and DNA was greater in the *ets* than in the *etr* cells, one might expect a greater incorporation of the ethyl group of ethionine in the macromolecules from the *ets* strain too. That ethylation of RNA may cause the macromolecule to become more unstable might be suggested by the lower contents of total RNA assayed in the *ets* cells after the addition of ethionine in comparison with the control. The DNA contents, however, were not altered by ethylation. It is more likely then that the lower contents of RNA in the *ets* cells is the result of an association of RNA hydrolysis (which also occurs in the absence of ethionine) and the partial inhibition of RNA synthesis by ethionine.

An increased incorporation of methionine-^{3}H in proteins from the *ets* as compared with the *etr* cells of *C. slooffii* was also observed. As expected, an even more pronounced difference was observed for the incorporation of ethionine in these cells. Since ethionine inhibits the synthesis of RNA and protein in both *etr* and *ets* cells at comparable rates such an effect is probably not related to the resistance mechanism. Resistance is due to an association of ethionine (but not SAE) degradation, lowered synthesis of SAE and, in consequence, reduced rates of RNA/DNA transethylation as well as lowered incorporation of ethionine in proteins of the *etr* as compared with the *ets* cells.

Acknowledgements

We thank Dr. Leda C. Mendonça-Hagler for helpful discussion and advice. L.R.T. is a fellow of the Brazilian National Research Council (CNPq). This work was supported by the CNPq and by the Research Council of Federal University of Rio de Janeiro.

References

1. ADELBERG, E.A. — Selection of bacterial mutants which excrete antagonists of antimetabolites. *J. Bacteriol.*, 76:326, 1958.
2. BINKLEY, F.J. — A note on the specificity of the enzymatic cleavage of thioethers. *J. Biol. Chem.*, 192:209-211, 1951.
3. BROWN, A.H. — Determination of pentose in the presence of large quantities of glucose. *Arch. Biochem.*, 11:269-278, 1946.
4. COLEMAN, W.H. & MARTIN, W.R. — *Escherichia coli* resistance to ethionine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 126:481-487, 1967.

5. DISCHE, Z. — Color reaction of nucleic acid components. *In* The nucleic acids: Chemistry and Biology; vol 1, p.286-305, 1955.

6. HOCHBERG, A., PIMSTEIN, R. & RAHAT, M. — Properties of an ethionine-resistant(ER) mutant of *Ochromonas danica. J. Protozool.,* 19:66-69, 1972.

7. KAPPY, M.S. & METZENBERG, R.L. — Studies on the basis of ethionine resistance in *Neurospora. Biochim. Biophys. Acta,* 107:425-433, 1965.

8. MAW, G.A. — Incorporation and distribution of ethionine sulfur in the protein of ethionine-sensitive and ethionine-resistant yeasts. *Arch. Biochem. Biophys.,* 115:291-301, 1966.

9. MENDONÇA, L.C.S. & TRAVASSOS, L.R. — Metabolism of ethionine in ethionine-sensitive and ethionine-resistant cells of the enteric yeast *Candida slooffii. J. Bacteriol.,* 110:643-651, 1972.

10. MERTZ, J.E. & SPENCE, K.D. — Methionine adenosyl transferase and ethionine resistance in *Saccharomyces cerevisiae. J. Bacteriol.,* 111:778-783, 1972.

11. METZENBERG, R.L.; KAPPY, M.S. & PARSON, J.W. — Irreparable mutations and ethionine resistance in *Neurospora. Science,* 145:1434-1435, 1964.

12. MIURA, K.I. & HAYASHI, Y. — Dowex 1 chromatography of oligonucleotides. *In:* Methods in Enzymology, vol. XII, part A, p.390-395, 1967.

13. MUSILKOVA, M. & FENCL, Z. — Biosynthesis of methionine in an ethionine resistant strain of *Candida utilis. Folia Microbiol.,* 9:374-379, 1964.

14. ROBERTS, R.; ABELSON, P.H.; COWIE, D.P.; BOLTON, E.T. & BRITTEN, R.J. — Studies of biosynthesis in *Escherichia coli.* Publication 607. Carnegie Institution of Washington, Washington D.C., 1957.

15. de ROBICHON-SZULMAJSTER, H. & CHEREST, H. — Resistance a l'ethionine chez *Saccharomyces cerevisiae.* II. Etude physiologique. *Genetics,* 54:993-1006, 1966.

16. SHAPIRO, S.K. & EHNINGER, D.J. — Methods for the analysis and preparation of adenosylmethionine and adenosylhomocysteine. *Anal. Biochem.,* 15:323-333, 1966.

17. SMITH, R.C. & SALMON, W.D. — Effect of ethionine on the ribonucleic acid, deoxyribonucleic acid, and protein content of *Escherichia coli. J. Bacteriol.,* 89:687-692, 1965.

18. SORSOLI, W.A.; SPENCE, K.D. & PARKS, L.W. — Amino acid accumulation in ethionine-resistant *Saccharomyces cerevisiae. J. Bacteriol.,* 88:20-24, 1964.

19. SPENCE, K.D.; PARKS, L.W. & SHAPIRO, S.K. — Dominant mutation for ethionine resistance in *Saccharomyces cerevisiae. J. Bacteriol.,* 94:1531-1537, 1967.

20. STEKOL, J.A. — Newer methods for preparation of *S*-adenosylmethionine and derivatives. *In:* Methods in Enzymology, Vol. VI, p.566-577, 1963.

21. STEKOL, J.A. — Biochemical basis for ethionine effects on tissues. *Adv. Enzymol.,* 25:369-383, 1963.

22. TRAVASSOS, L.R. & CURY, A. — Thermophilic enteric yeasts. *Annu. Rev. Microbiol.,* 25:49-74, 1971.

Seleção e uso de microrganismos com vistas à otimização dos processos de fabricação de produtos fermentados de leite*

J. Cal-Vidal**

Resumo

Os produtos fermentados de leite constituem alimento de considerável valor dietético e, em muitos casos, recebem melhor aceitabilidade que o próprio leite. No presente momento, há considerável interesse no desenvolvimento industrial de produtos fermentados de leite, em vários países. Em tal circunstância, a seleção e uso de microrganismos capazes de fermentar o leite, de modo satisfatório, torna-se importante. No presente estudo, a seleção, manutenção e uso de culturas microbianas são descritos, com vistas à sua aplicação e sucesso na fermentação de produtos de leite em escala industrial.

Summary

Selection and use of microorganisms suitable for fermented dairy products

Fermented dairy products constitute a food of considerable dietetic value and interest for they are often more easily accepted than milk itself. Presently, there is a considerable development, in many countries, of fermented milk products prepared on an industrial scale. The dairy industry must have at its disposal microorganisms capable of fermenting milk satisfactorily. The object of this paper is to describe the selection, maintenance, and use of microbial cultures to ensure the success of fermented milk products at an industrial scale.

Introdução

Os Microrganismos — Com poucas exceções, os microrganismos mais comumente usados na indústria de produtos fermentados de leite, seja na sua forma pura ou em mistura, fazem parte do grupo de bactérias lácticas. Este é um dos grupos mais bem definidos no campo da bacteriologia, a partir dos estudos conduzidos por Storch e Orla-Jensen, na Dinamarca, e por Henneberg, na Alemanha.

As bactérias lácticas podem ser divididas em dois grupos principais: *Streptococcus* e *Lactobacillus****. O primeiro grupo apresenta células redondas, em pares e em cadeias de vários comprimentos; o segundo, células em forma de bastonetes, que podem agrupar-se em cadeias de vários comprimentos. Estes microrganismos são encontrados em "habitats" bem definidos, como plantas, leites e derivados, e em animais. São completamente inofensivos ao homem e ocorrem naturalmente no leite e seus derivados. Têm propriedade de fermentar a lactose com grande proficiência.

Os Produtos Fermentados de Leite — Os produtos fermentados de leite são conhecidos desde tempos bem remotos, em certas regiões do globo, sendo, em alguns casos, preparados por métodos bem primitivos. Em geral, uma flora complexa se desenvolve, com predominância de algumas espécies características. Com o desenvolvimento da indústria de laticínios, no século passado, os países ocidentais tornaram-se também interessados nos produtos fermentados de leite, dando maior atenção às condições de higiene e preparação, com vistas ao completo controle da atividade microbiana, para a obtenção de um produto alimentício de melhor qualidade.

Os produtos fermentados de leite constituem alimento de grande interesse dietético (12), sendo, às vezes, de maior aceitação do que o próprio leite. Na realidade, tais produtos apresentam diferente digestibilidade, que os tornam mais aceitáveis como alimentos infantis e para pessoas de idade avançada. Mas o sucesso alcan-

---

* Trabalho desenvolvido no Dept. of Nutrition and Food Science, Massachusetts Institute of Technology, Mass., EUA.

** Endereço atual: ESAL — Depto. de Ciências dos Alimentos, 37200 Lavras, MG, Brasil.

*** Esta divisão não seria apropriada se se falasse de leites fermentados, ao contrário de produtos fermentados de leite.

çado pelos produtos fermentados de leite não é devido a seu aspecto terapêutico ou nutricional, mas às propriedades organolépticas consolidadas pelo seu sabor, aroma e consistência. Mais recentemente, com a adição de substâncias flavorizantes, tem sido possível atender ao gosto de uma grande faixa de consumidores.

Esta é talvez uma das principais razões do grande desenvolvimento da indústria dos produtos fermentados de leite, verificado nos países da Europa.

Na atualidade, um regime intenso de pesquisa vem sendo cumprido em diferentes partes do mundo e, como conseqüência, apreciável volume de informação tem sido publicado. A possibilidade de associação de bactérias lácticas a outros microrganismos tem sido comprovada, com vistas à obtenção de produtos intermediários cujas características organolépticas aumentem sua aceitação.

No presente trabalho, atenção especial será dada a três principais produtos: *leites fermentados* (que vários autores preferem chamar "coalhada natural"), *cremes acidificados* e *iogurtes.*

Leites Fermentados — Nos países de língua inglesa, o leite fermentado recebe o nome de "buttermilk", sem qualquer referência a um produto proveniente da fabricação de manteiga (butter), como o nome poderia sugerir. Na França (27), este produto é considerado derivado de leite e sua preparação industrial ainda é pequena.

Na fabricação de leites fermentados, um inóculo contendo os microrganismos apropriados é adicionado ao leite pasteurizado, o qual é incubado até que se alcance a acidez desejada. O principal produto desta fermentação é o ácido láctico, mas substâncias aromáticas podem ser produzidas ou adicionadas.

Cremes Acidificados — A aparência destes produtos, segundo os franceses, é de similar à do queijo fresco, razão pela qual são, em alguns países, conhecidos por esse nome.

O princípio de fermentação do creme é semelhante ao do leite fermentado. Na sua fabricação, além do nível de acidificação, a viscosidade do produto é fator importante, e dependerá principalmente da composição do leite (teor de gordura, proteínas e minerais), do tamanho dos glóbulos de gordura, tempo e condições de armazenamento, e das temperaturas de desnatamento e fermentação.

Para atender a tais requisitos especiais, cuidado deverá ser dado às condições de fermentação, durante o processo de inoculação e controle. Problemas de contaminação podem tornar-se muito sérios, com desenvolvimento de odores anormais e outros defeitos.

Iogurtes — Basicamente, o iogurte consiste de leite acidificado pela ação de duas espécies bem definidas de bactérias termofílicas, produtoras de ácido láctico, as quais se desenvolvem em simbiose: *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus.*

Tradicionalmente, o iogurte apresenta-se sob forma gelatinosa, sem qualquer aditivo aromatizante, além do produzido pelos próprios microrganismos. Nos últimos anos, porém, iogurte batido tem sido produzido, pela quebra do coágulo formado, alternando sua apresentação tradicional. Frutas e outras substâncias flavorizantes estão sendo também incorporadas, aumentando a atração para o produto.

Na maioria dos países onde é consumido, a flora microbiana deve ser mantida viva até o momento de consumo, excluindo-se qualquer tratamento bactericida.

A Seleção de Microrganismos

Origem e Isolamento — Para cada um dos produtos mencionados previamente, há vários fatores a levar em conta, notadamente no que concerne às condições para crescimento e isolamento das respectivas culturas.

No caso de leites fermentados ou coalhadas naturais, as espécies bacterianas mais comumente usadas compreendem principalmente: *Streptococcus lactis, Streptococcus cremoris, Streptococcus diacetilactis* e *Leuconostoc cremoris.* Estas espécies mesofílicas são comumente encontradas no leite e em outros produtos lácteos.

Para selecionar a melhor variedade microbiana, a melhor fonte é o leite cru proveniente de regiões onde este seja de reconhecida qualidade. Também é possível a utilização de linhagem já isoladas por laboratórios especializados.

O isolamento é geralmente feito em meio de agar cuja composição pode variar, de acordo com resultados de pesquisa obtidos em laboratório (1, 14). Nos Estados Unidos, o "Bacto Nutritive Caseinate Agar Difco nº 27" tem oferecido boas condições para desenvolvimento destas espécies mesofílicas para a fermentação do leite.

O uso de meios seletivos é recomendado nos casos em que as diferentes espécies presentes devem ser separadas. Tal é o caso da separação das colônias de *Leuconostoc cremoris* e *Streptococcus diacetilactis* das de *Streptococcus lactis* ou *Streptococcus cremoris* em meios contendo soro de leite, lactato de cálcio e amino-ácidos (17) ou outros contendo suco de tomate (31). Alguns meios têm a propriedade de inibir o crescimento das culturas de *Streptococcus lactis* (25), fazendo uso de substâncias químicas, como hidrocloreto de tetraciclina e azida de sólido, as quais favorecem o desenvolvimento de coloração nas colônias, para facilitar sua identificação e isolamento.

Para diferenciar *Str. lactis* de *Str. cremoris* pode ser usado meio contendo arginina (34). Em tal caso, *Str. lactis* poderá ser identificado através das colônias de cor vermelho brilhante, enquanto as de *Str. cremoris* apresentarão cor branca.

Em iogurte, para cuja produção é necessária cultura básica constituída de dois microrganismos, o uso de

Streptococcus thermophilus é freqüente em leites previamente pasteurizados, provocando uma acidificação espontânea. Nos países onde a fabricação de iogurtes segue os métodos mais tradicionais, *Lactobacillus bulgaricus* é o mais comumente usado. Estas duas espécies podem ser isoladas a partir de iogurtes comercialmente disponíveis, ou a partir de culturas fornecidas por laboratório especializado.

Para distinguir *Str. thermophilus* de *L. bulgaricus,* tem-se que levar em consideração o fato de que estas duas espécies desenvolvem-se distintamente sob diferentes temperaturas (26). Em leite mantido a 37°C, e curto período de incubação, *Str. thermophilus* desenvolve-se muito mais rapidamente do que *L. bulgaricus,* que eventualmente desaparece a esta temperatura, o que pode ser acompanhado sob o microscópio. A 43°C e incubação mais longa, a situação se inverte, beneficiando *L. bulgaricus.* Há, no entanto, certos casos em que tais faixas de temperatura podem ser mais estendidas.

Após o isolamento, é feito o cultivo em leite tornassolado (contendo um indicador), no qual as bactérias termofílicas provocam sucessivamente acidificação, coagulação e redução (ACR). Novamente, para estes casos podem ser encontrados diversos meios disponíveis à obtenção de culturas puras.

No que concerne à identificação, *Str. thermophilus,* por sua marcante termoresistência, é bem mais fácil de ser identificado do que *L. bulgaricus,* o qual se associa tremendamente aos demais lactobacilos.

Outras espécies de lactobacilos têm sido identificadas em iogurtes procedentes do Oriente Médio (30), as quais têm recebido a conotação de *L. bulgaricus, L. jugurti* e *L. helveticus.*

Na seleção destes microrganismos, dever-se-á levar em conta os resultados organolépticos obtidos pelo cultivo individual e associado das diferentes variedades, com vistas à máxima possibilidade de aceitação pelo consumidor.

Produção de Ácido — A produção de ácido pode ser medida através de testes de atividade, sendo a técnica mais comumente usada a inoculação de uma cultura, de crescimento recente, em leite previamente aquecido (80°C durante, 30 minutos), medindo-se o nível de acidez depois de incubação a 30°C.

No caso das espécies usadas para a fabricação de iogurte, a máxima acidez é obtida nas temperaturas ideais desses microrganismos (23). Em alguns casos, certas associações podem estimular proteólise, com liberação de amino-ácidos (6, 13).

Aroma — A seleção de linhagens que produzem bom aroma é de grande importância. A presença de diacetil e acetil-metil-carbinol pode ser facilmente detectada em leites fermentados, através de simples testes qualitativos, como o Voges-Proskauer, modificado por Barrit, fazendo-se uso do alfa-naftol (21). Em todo caso, a apreciação do aroma e sabor deverá ser acompanhada de análise organoléptica com degustadores.

No iogurte, o aroma característico provém principalmente dos níveis de acetaldeído e acetona, produzidos por lactobacilos (7), sendo a proporção 2:8 a mais recomendável para a obtenção do aroma mais aceitável (27). Por isso, é muito importante a seleção de variedades que produzam substâncias aromáticas, favorecendo essa proporção, com vistas ao êxito comercial do produto.

Associação de Culturas — De um modo geral, culturas em associação se comportam de modo diferente ao que corresponde à sua individualidade. Na maioria dos casos, tal comportamento não é fácil de se prever (11). Um estudo cuidadoso, do que resulte dessa associação, deve ser levado a efeito, com vistas à obtenção de melhor produto.

Tal é o caso na associação de *Str. diacetilactis* e *Leuconostoc cremoris* com *Str. lactis* e *Str. cremoris,* a qual pode favorecer a obtenção do aroma desejado, sempre que não houver incompatibilidade entre tais variedades (28).

Na fabricação de iogurte, após a seleção das culturas, é importante proporcionar a associação que ofereça os mais vantajosos resultados técnicos e ótimas condições para incubação, para a obtenção dos níveis de acidez, aroma e consistência desejados. Uma vez que as melhores associações tenham sido encontradas, recomenda-se a preservação das variedades separadamente, efetuando-se a mistura somente pouco tempo antes do processamento. O uso mais recente da técnica de liofização, para a preservação de culturas associadas, poderá evitar tal exigência (18).

Resistência Ante Bacteriofagos — Há casos em que a produção de ácido por microrganismos é retardada pela ação de fagos. Collins, na University of California, Davis, tem oferecido várias hipóteses para a discussão da origem e possível meios de combate (10). Outros pesquisadores (29) tem oferecido algumas recomendações, com vistas a prevenir o desenvolvimento de bacteriófagos, destacando, entre outras: a necessidade de constante rotação das culturas selecionadas, manipulação asséptica e uma cuidadosa desinfecção de materiais e edifícios. Mais recentemente, alguns meios de cultivo, para prevenir a ação de bacteriófagos, têm sido propostos, destacando-se Marstar (Marchall Division, Miles Laboratory, Inc.), que sofre a remoção de cálcio (22). A literatura não oferece muita informação sobre bacteriofagia em *Streptococcus thermophilus* e em lactobacilos, usados na fabricação de iogurtes. Somente em raros casos a ação de bacteriófagos parece ter motivado a diminuição de ácido (9), devido principalmente ao ataque a *Str. thermophilus,* bem mais susceptível do que *L. bulgaricus.*

Do exposto, conclui-se que precauções especiais devem ser seguidas, com vistas ao estabelecimento de uma coleção de linhagens com resistência a bacteriófagos, disponível para os determinados e eventuais programas de fabricação.

Técnicas de Manutenção de Culturas

Métodos Tradicionais — Tradicionalmente, as linhagens usadas em produtos fermentados de leite são subcultivadas, diariamente no laboratório, em leite desnatado, esterilizado em autoclave. O subcultivo requer rigorosa rotatividade das culturas. Tal processo é desvantajoso, porque oferece a possibilidade de mutação nas culturas, afetando sua atividade.

Baixa Temperatura — Mais recentemente, foi desenvolvido processo que consiste na imersão, a baixa temperatura (−30°C), de tubos contendo leite inoculado com as culturas microbianas, onde podem ser mantidas de 6 a 7 meses. Conforme as necessidades, a cultura é retirada e inoculada em leite tornassolado (leite pasteurizado, contendo um indicador) e incubada a uma temperatura que pode variar entre 20°C e 30°C, dependendo de sua atividade, para ser então transferida a um volume maior de leite que servirá como base para a cultura. Este processo tem recebido boa aceitação na França, onde pesquisadores o consideram vantajoso (27), por não apresentar os problemas observados no método tradicional.

Liofilização — Este método é mais sofisticado e requer, além de equipamento especial, boas técnicas de laboratório. Embora este processo de preservação ofereça inúmeras vantagens, do ponto de vista do tempo de manutenção e facilidade de armazenamento, há casos em que a porcentagem de células mortas é elevada, podendo mesmo alcançar 80% (27). Para reativação, é necessária a transferência do inóculo, várias vezes, não sendo possível o uso de culturas, imediatamente após sua retirada do local de armazenamento.

Desidratação — Em grandes quantidades, as culturas poderão ser desidratadas por meio do processo de "spray-drying", fazendo-se uso de ar quente, cuja temperatura não poderá ultrapassar os 85°C.

Concentração e Congelamento — Nos Estados Unidos, Austrália e França, um novo processo tem sido empregado, o qual consiste na preparação de suspensões concentradas de células (em volta de 10^{11}/g), usando-se centrifugação no momento de máximo crescimento. A suspensão é então mantida em nitrogênio líquido, a −196°C (2).

A atividade dos microrganismos é preservada, de acordo com os resultados obtidos em laboratório, e tais culturas poderão ser usadas imediatamente, diretamente ou através de um "fermento", reduzindo o trabalho e custos de manutenção. Como vantagens deste processo, têm sido consideradas a redução do tempo de fermentação e a diminuição do risco de ataque por bacteriófagos (16).

Fatores a Considerar no Uso de Microrganismos na Fabricação de Produtos Fermentados de Leite

A Composição do Leite — O leite é um produto que apresenta qualidade variável para servir como meio de cultura de bactérias lácticas. No laboratório, é aconselhável usar leite reconstituído a partir de leite em pó, proveniente de um mesmo lote de fabricação.

Na preparação de leites acidificados, o conteúdo de gorduras e material sólido pode ser controlado. Em alguns casos, faz-se a adição de ácido cítrico ou citrado de sódio (0.1 a 0.2 por cento) para o melhor desenvolvimento de aroma e estabilidade (5). A composição do leite (conteúdo de gordura, por exemplo) poderá influenciar também a própria consistência do produto final, que pode ser melhorada através da homogeneização do leite (32).

Na fabricação de iogurtes, a composição do leite tem papel muito importante, porque a bactéria termofílica é susceptível a essas possíveis variações.

Estudos indicam que a natureza do solo, o tipo de alimento dado ao animal, e o seu estágio de lactação, além de variações genéticas, podem alterar a qualidade do leite, afetando o crescimento das bactérias em iogurtes (15). Os mesmos estudos indicam que tal efeito pode ser apreciavelmente reduzido, aumentando-se o tempo e temperatura de aquecimento do leite em questão.

As culturas são em geral muito susceptíveis à natureza do leite e também à possível presença de antibióticos no leite. É aconselhável, pois, a preparação de iogurtes com leite recebido no máximo 24 horas antes, na fábrica, que tenha sido distribuído em vários tanques e resfriado a um nível de temperatura por volta de 10°C. Durante este período (recepção-uso do leite), o laboratório poderá testar diferentes culturas, com respeito à sua atividade, e determinar em que tanques está o leite para preparação de iogurtes com boa acidez, aroma e consistência.

Em certos casos, o uso de leite cru oferece certas vantagens sobre o leite pasteurizado, devido à presença de uma flora mais complexa que, atuando em certos componentes do leite, principalmente substâncias nitrogenadas, favorece o crescimento da bactéria termofílica. Esta flora pode também ajudar na destruição de penicilina, que pode ainda estar presente para impedir uma boa fermentação (35). No caso em que se faça uso de leite que tenha sido previamente pasteurizado, é recomendável efetuar uma inoculação (0,2%), com um fermento mesofílico, para reposição da flora natural e melhoria das propriedades do leite como meio de cultura para o crescimento de microrganismos termofílicos.

Tratamento Térmico — As condições em que o leite é aquecido podem afetar a atividade da bactéria láctica (3). O tratamento térmico pode oferecer ação estimulante, ao destruir inibidores naturais, presentes no leite, ao promover a formação de fatores de crescimento ou a eliminação de oxigênio (32), ou um efeito inibitório, pelo bloqueio de amino-ácidos com a lactose.

Alguns autores (19, 32) têm demonstrado que algumas combinações de tempo e temperatura são favoráveis e outras desfavoráveis. A maioria reconhece que o leite nunca deve ser aquecido por períodos muito longos, a altas temperaturas.

O tratamento térmico poderá também afetar a consistência do meio, pela precipitação das proteínas solúveis no leite (32) e, em tais casos, deve lançar-se mão de um bom critério de julgamento para se estabelecer uma combinação de tempos e temperaturas que constitua a melhor escolha para a necessária consistência do produto final e o bom desenvolvimento das bactérias do ácido láctico.

As bactérias termofílicas não crescem bem em leites insuficientemente aquecidos. Tendo isso em conta, é recomendável dar um tratamento térmico ao leite, no mínimo até 100°C, durante 45 minutos (32), quando da fabricação de iogurtes. Outros autores (4) têm indicado que o leite aquecido em autoclave estimula o crescimento de lactobacilos, devido à influência do ácido fórmico.

Nos casos em questão, o tratamento térmico poderá ser conduzido em sistemas contínuos ou descontínuos.

Técnicas de Subcultivo e Incubação — Dependendo dos programas de fabricação em curso, o número e volume das culturas intermediárias, necessárias para formar o fermento, é estabelecido. Em geral, no laboratório da fábrica tem lugar o subcultivo, partindo-se da cultura original até o tanque de fermentação. A quantidade do inóculo varia com o tipo de fermento e do produto que se deseja obter. No caso particular do iogurte p. ex., o utilizado varia entre 2 e 3 e a incubação é feita numa incubadora a temperatura próxima à ótima requerida pela cultura em questão.

Após a coagulação — que terá lugar a pH entre 4. 8 e 5. 0 — a incubação deve ser interrompida e a cultura mantida a baixa temperatura (5°C), para se evitar a produção de ácido em excesso.

É importante que o volume envolvido na preparação do inóculo seja cuidadosamente considerado, com vistas a facilitar as rápidas trocas de calor envolvidas antes, durante e depois da fermentação.

Para a fabricação dos leites fermentados, o leite originalmente recebe um inóculo de 1 a 3%. É muito importante que o inóculo seja usado cuidadosamente, com vistas a alcançar os melhores resultados. Em geral, espera-se uma acidez final entre 2 e 3 ppm e aroma e consistência satisfatórios.

No momento de iniciar um programa de fabricação, quando grandes quantidades de leite serão usadas, decisões importantes devem ser feitas com antecipação. Tal é o caso do tempo e temperatura de fermentação, bem como a quantidade de cultura a incubar e transferir. O estágio final de fermentação reveste-se de especial importância, quando o nível final de acidez pode ser função do tempo de resfriamento, com conseqüente efeito no sabor e aroma do produto. Em leites fermentados, mesmo na etapa de engarrafamento (ou enlatamento), deverá haver cuidado especial, evitando possíveis alterações no produto, provenientes da incorporação de ar, devido a mal funcionamento de equipamento ou erros operacionais no processo.

Em iogurtes, as culturas mantidas em simbiose deverão ser subcultivadas diariamente, em leite desnatado, esterilizado em autoclave. O balanço de crescimento entre os lactobacilos e os estreptococos poderá ser seguido ao microscópio.

Em alguns casos, é aconselhável a preparação simultânea dessas culturas em diversas proporções e fazer a escolha da proporção mais conveniente. A possibilidade de crescimento em separado, e posterior mistura, tem oferecido interessantes alternativas para alguns fabricantes. Isto facilita o melhor balanço das populações microbianas, logo no início da fermentação.

Possíveis Defeitos — Defeitos bacteriológicos podem trazer sérias conseqüências num processo de fabricação. O desenvolvimento de sabores e odores estranhos pode ser provocado por mutações ou erros na seleção de culturas. Em outros casos, contaminações por microrganismos indesejáveis podem ser aceleradas por incentivo na acidez do meio.

No caso de cremes acidificados, em virtude do alto conteúdo de gordura, além dos defeitos encontrados em leites fermentados, defeitos por rancidez e oxidação podem ocorrer.

Conclusões

No presente trabalho, considerações importantes, referentes a seleção, manutenção e uso de microrganismos para a fabricação de produtos fermentados de leite, foram apresentadas.

O sucesso na comercialização destes produtos, num país em crescimento industrial, tal como o Brasil, dependerá principalmente do uso eficiente de microrganismos apropriados, dentro da sistemática e precauções que a natureza desses produtos requer.

Possibilidades há que, com o desenvolvimento de novas técnicas de inoculação e isolamento, maior número de fabricantes possa incluir novos produtos fermentados de leite em suas linhas de fabricação, com menores riscos técnicos, atendendo assim a um novo mercado de produtos derivados de leite, que deverá, muito em breve, estender-se enormemente.

Referências Bibliográficas

1. ABD-EL-MALEK, Y. & GIBION, T. — *J. Dairy Research*, 15:233, 1948.
2. ACCOLAS, J.-P. & AUCLAIR, J. — *Lait.*, 47:523, 1967.
3. AUCLAIR, J.E. & PORTMANN, A. — Proc. 14th International Dairy Congress, I Part., 2:17, 1956.
4. AUCLAIR, J.E. & PORTMANN, A. — *Lait.*, 39:496, 1959.
5. BABEL, F.J. — *Dairy Science*, 50:431, 1967.
6. BAUTISTA, E.S.; DAHIYA, R.S. & SPEACK, M.L. — *J. Dairy Research*, 33:299, 1969.
7. BOTTAZZI, V. & VESCOVO, M. — *Neth. Milk Dairy J.*, 23: 1971, 1969.
8. CHANDA, R.C.; GORDON, J.F. & WALKER, D.A. — *Process Biochem.*, 4(2):13, 1969.
9. CHEVALIER, R. Citado em 26, 1970.
10. COLLINS, E.B. — *J. Dairy Science*, 45:552, 1962.
11. DAHIYA, R.S. & SPECK, M.L. — *J. Dairy Sci.*, 45:607, 1962.
12. DAVIS, J.G. — Cheese I 212. London: Churchill, 1965.
13. DAVIS, J.G. — *Dairy and Ice Cream Industries Directory*, 5, 1967.
14. DEVOYOD, J.J. & MULLER, M. — *Lait.*, 49:369, 1969.
15. FRANK, H.K. — *Milcwissenschaft*, 24:269, 1969.
16. FRIDMAN, E. — Thesis Doct. Fac. Science, Poitiers (France), 1969.
17. GALESLOOT, TH. E.; HASSING, F. & STSDHOUDERS, J. — *Neth. Milk Dairy. J.*, 15:127, 1969.
18. GAVIN, M. — Ecole Polytechn. Fed. Zurich Tese 4227, 1968.
19. GREENE, V.W. & JEZESKI, J.J. — *J. Dairy Sci.*, 40:1046, 1957.
20. GUSS, M.L. & DELWICHE, E.A. — *J. Bacteriol.*, 67:714, 1954.
21. HARRIGAN, W.F. & col. Laboratory Methods in Microbiology. Academic Press, London 362, 1966.
22. HENNING, D.R.; SANDINE, W.E.; ELLIKER, P.R. & HAYS, H.A. — *J. Milk Food Technol.*, 28:273, 1965.
23. KURMANN, J. — *Lait. Romand*, 43(67):508, 1967.
24. MAN, J.C.; ROGOSA, M. & SHARPE, M.E. — *J. Applied Bacteriol.*, 23:130, 1960.
25. MCDONOUGH, F.E.; HARGRONE, R.E. & TITTSLER, R.P. — *J. Dairy Sci.*, 46:383, 1963.
26. MOCQUOT, G.; ACCOLAS, J.P. & MORQUES, R. — *Industrie Lait. Paris*, nº 242, 1961.
27. MOCQUOT, G. & HUREL, C. — *J. Dairy Technol.*, 23:3, 1970.
28. POINTURIER, H. & ADDA, J. — Beurrieri Industrielle. Paris La Maison Rustique., 1969.
29. REITER, B. & MOLLER-MADSEN, A. — *J. Dairy Research*, 30:419, 1963.
30. SHARPE, M.E. — *Dairy Science Abstract*, 24:109, 1962.
31. SKEAN, J.D. & OVERCAST, W.W. — *Dairy Science*, 45:1530, 1962.
32. STORGARDS, T. — *Bull. Ins. Dairy Fed. part*, 3:65, 1964.
33. SWARTLING, P. & MUKHERJI, S. — Proc. 17th international Dairy Congress c., 337, 1966.
34. TURNER, N.; SANDINE, W. E. & ELLIKER, P.R. — *J. Dairy Sci.*, 45:656, 1962.
35. VASSAL, L. & AUCLAIR, J. — *Industrie lait, Paris*, 221:253, 1965.

Cultivo contínuo de microrganismos em regime transitório

Walter Borzani, Marina L. R. Vairo*, Rosana E. Gregori**,
Margarida M. dos A. Magalhães*** & Lilian B. Chueiri**

Resumo

Com o principal objetivo de ressaltar a aplicabilidade do método dinâmico (cultivo contínuo em regime transitório) ao estudo do comportamento de sistemas microbianos em diferentes condições experimentais, os autores apresentam resultados obtidos em cultivo contínuo aeróbio de *Saccharomyces cerevisiae*, em meio de melaço de cana, variando-se a vazão do ar, a freqüência do agitador e a concentração de sais.

Summary

Unsteady-state continuous culture of yeast cells

With the main purpose to point out the applicability of the dynamic method (unsteady-state continuous culture) to the study of the response of microbial systems when submitted to different experimental conditions, the authors present the results obtained in aerobic continuous cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* on sugar-cane molasses media varying the air rate, the impeller speed and the salts concentration.

Introdução

O cultivo contínuo de microrganismos, além da importância decorrente de suas aplicações industriais, apresenta indiscutível interesse no desenvolvimento de estudos microbiológicos de natureza fundamental.

Dois modos diferentes de agir são possíveis neste caso. No primeiro, procura-se manter inalteradas todas as condições experimentais (temperatura, pH, composição do meio, vazão de ar, vazão de meio de alimentação, estado de agitação, etc.) de modo que o sistema atinja um regime estacionário no qual o microrganismo, continuamente produzido, é estudado. No segundo caso, uma ou mais condições experimentais são propositadamente alteradas durante o ensaio, procurando-se acompanhar as respostas do sistema às perturbações produzidas e, a partir delas, colher informações relacionadas com o microrganismo em estudo. Ao que tudo indica, este último método de estudo, chamado método dinâmico ou também de cultivo contínuo em regime transitório, é particularmente aplicável quando se procura estudar o metabolismo de um microrganismo em condições experimentais diversas, ou quando se procura determinar as condições ótimas para o desenvolvimento de um dado processo fermentativo.

Em trabalho anterior**** foi feita referência à atual relativa escassez de informações experimentais sobre o assunto, fato este que impossibilita, no momento, chegar a conclusões de caráter geral. No citado trabalho, tivemos a oportunidade de mostrar de que maneira, lançando-se mão do método dinâmico, é possível, com ensaios simples e relativamente rápidos, identificar o substratc

* Laboratório de Engenharia Bioquímica, Departamento de Engenharia Química, Escola Politécnica da USP, C.P. 8174, São Paulo, Brasil.
** Companhia Estadual de Tecnologia de Saneamento Básico e de Defesa do Meio Ambiente (CETESB), Av. Prof. Frederico Hermann Jr., 465, São Paulo, Brasil.
*** Bolsista do Centro de Pesquisas e Desenvolvimento (CEPED), Camaçari, Bahia, Brasil.
**** Vairo, M.L.; Gregori, R.E. & Borzani, W. — Respostas de um cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* a perturbações por impulso provocadas por adição de sulfato de amônio. *Rev. Bras. de Tecnologia* (no prelo).

limitante no cultivo de um dado microrganismo.

Nesta nota procura-se mostrar, sempre através do método dinâmico, de que maneira pode ser estudada a influência dos seguintes fatores no cultivo aeróbio de leveduras: vazão do ar, freqüência do agitador e concentração de sais.

Materiais e Métodos

Microrganismo — Em todos os ensaios utilizou-se *Saccharomyces cerevisiae* isolado de fermento prensado comercial e conservado, à temperatura ambiente, em meio de cultura sólido (extrato de carne: 3,0 g; peptona: 5,0 g; glicose: 10,0 g; agar-agar: 15,0 g; água destilada: 1.000 ml). Os repiques da cultura eram realizados cada dois meses, mantendo-se os tubos em estufa a 30°C durante 24 a 48 h após a inoculação.

Melaço — A principal fonte de carbono utilizada no preparo dos meios de cultivo foi melaço de cana-de-açúcar, possuindo 56,3% de açúcares redutores totais (calculados como glicose).

Meios de fermentação — Os ensaios foram efetuados com meios de melaço de cana-de-açúcar, preparados da seguinte maneira:

a) diluir 2,25 litros de melaço em 7,75 litros de água potável (o meio resultante contém, aproximadamente, 200 g de açúcares redutores totais por litro); b) adicionar 15,0 g de $NaH_2PO_4H_2O$, previamente dissolvido em 250 ml de água potável; c) aquecer a 100°C durante 15 min e, em seguida, a 115-120°C por 15 min; d) manter em repouso por 24 a 48 h e sifonar não mais da metade do sobrenadante clarificado, diluindo-o com igual volume de água potável; e) adicionar 45 ml de solução concentrada de HCl (d = 1,18) para cada litro de meio e aquecer a 65-70°C por 10 min; f) ajustar o pH do meio, à temperatura ambiente, entre 4,5 e 4,7 com solução 4,0 N de NaOH; g) diluir com água potável, de maneira a se alcançar uma concentração de açúcares redutores totais próxima de 30 g/l; h) distribuir o meio diluído em erlenmeyer de 500 ml (100 ml em cada frasco), em balões de 12 litros (10 litros de meio em cada um) e no fermentador de 7 litros (2,7 litros de meio); i) esterilizar a 120°C durante 30 min; j) ao meio esterilizado e frio, adicionar volumes convenientes de soluções de $MgSO_47H_2O$ (250,0 g/l), de $NaH_2PO_4.H_2O$ (240,0 g/l) e de $(NH_4)_2SO_4$ (300 g/l), previamente esterilizadas em separado (120°C; 30 min), de maneira a se alcançar, no meio final, concentrações daqueles sais respectivamente iguais a 0,25 g/l, 2,4 g/l e 3,0 g/l.

No ensaio realizado com a finalidade de observar a influência da concentração de sais, o preparo do meio foi realizado da maneira descrita, até a fase correspondente ao ajuste do pH (item *f*), inclusive. A partir desse ponto, operou-se do seguinte modo: 1) desmineralizar o mosto com auxílio de resinas aniônicas e catiônicas; 2) diluir o mosto resultante com água desmineralizada de maneira a se conseguir uma concentração de açúcares redutores totais aproximadamente igual a 30 g/l; 3) proceder de acordo com os itens *h* e *i*; 4) adicionar os sais citados em *j*, previamente dissolvidos em água desmineralizada.

Na clarificação do meio (ítens *a, b, c* e *d*), necessária para que não se forme precipitado na esterilização (item *i*), utilizou-se a técnica descrita por Borzani & col. (1). A hidrólise descrita no item *e* foi realizada seguindo as recomendações de Falcone & col. (4). A correção do meio quanto aos teores das fontes de fósforo e de magnésio foi efetuada segundo Borzani & Vairo (3).

Para simplificação, a expressão "açúcares redutores totais" será representada, neste trabalho, pela sigla A.R.T. Na medida das concentrações de A.R.T., estes são considerados como glicose.

Equipamento utilizado nos ensaios — Os ensaios foram realizados em um fermentador, do tipo Microferm, de 7 litros de capacidade nominal, fabricado pela New Brunswick Scientific Co. Inc., com controles da temperatura, do pH (por adição automática de solução 4,0 N de NaOH), da vazão de ar e da freqüência do agitador. Utilizou-se o alimentador de vazão descrito por Borzani & Vairo (2).

Verificação da homogeneidade do sistema — A homogeneidade do sistema foi verificada segundo a técnica descrita em trabalho anterior*. (ver nota na p. 88)

Preparo do inóculo — O microrganismo foi inoculado em tubos contendo meio glicosado sólido (item 1) e incubado a 30°C durante 48 h. Cada tubo recebeu 2,0 ml de meio de melaço e foi agitado de maneira a suspender as células no meio. Os conteúdos de três tubos foram adicionados a um erlenmeyer de 500 ml, contendo 100 ml de meio. Os erlenmeyers foram então incubados a 30°C, em agitador rotativo tipo NBS Girotory Shaker, modelo G 25 (freqüência = 400 rpm; excentricidade = 3 cm) durante 12 a 14 horas. Os conteúdos de três erlenmeyers foram utilizados para inocular o fermentador. Lembrando-se de que o fermentador continha 2,7 litros de meio, a adição do inóculo elevava o volume de líquido, na dorna, a 3 litros.

Descrição de um ensaio — Uma vez inoculado o fermentador aguardava-se, nas condições experimentais escolhidas, um período de 4 a 8 horas, suficiente para garantir o microrganismo em fase exponencial de crescimento, antes de se dar início à fermentação contínua. O andamento desta última era acompanhado, colhendo-se, periodicamente, amostras (10 a 25 ml) do líquido do fermentador para as determinações descritas mais adiante.

Os ensaios foram realizados a (30,0 ± 0,5)°C, pH = 4,5 a 4,7 e, a não ser observação em contrário, freqüência do agitador igual a 500 rpm e vazão de ar igual a 4 litros/min.

Controles analíticos — O andamento dos ensaios foi acompanhado, medindo-se os aspectos mencionados a seguir:

a) Concentração de A.R.T. no meio: utilizou-se o método de Somogyi (5).

b) Concentração de células: 5 ml do meio foram centrifugados (4.000 rpm; 1.300 × g; 10 min), o sedimento era lavado com água, novamente centrifugado e suspenso em água destilada em balão volumétrico; mediu-se então a transmitância da suspensão a 610 nm, em espectrofotômetro Coleman Jr II, modelo 6/20, previamente calibrado. A calibração do espectrofotômetro foi realizada com suspensões, de concentrações conhecidas, de células cultivadas em meio de melaço. A unidade das células foi medida por secagem em estufa a 100-105°C durante 3 horas, tempo este suficiente para se conseguir massa constante. As concentrações de células são expressas em gramas de matéria seca por litro.

Resultados e Conclusões

A Figura 1 mostra os resultados obtidos no ensaio realizado com a finalidade de observar a influência da vazão do ar e da freqüência do agitador.

A Figura 2 reúne os resultados obtidos no ensaio desenvolvido com o objetivo de verificar a influência da concentração de sais.

As curvas das Figuras 1 e 2 apresentam, de maneira muito clara, a influência dos fatores em apreço no cultivo estudado, dispensando comentários adicionais.

Interessante observar, na Figura 2, que o aumento da concentração de células (trecho BC) não acarreta diminuição da concentração de A.R.T. Muito provavelmente, os açúcares consumidos no trecho AB são parcialmente transformados em compostos intermediários oxidáveis, que passam a ser metabolisados pelo microrganismo quando o fermentador é alimentado com mosto preparado com água potável.

A relativa rapidez com que puderam ser obtidos os resultados experimentais, coloca em nítido destaque uma das grandes vantagens do método dinâmico.

Agradecimentos

Os autores agradecem a colaboração de Euclides Gomes de Lima e de Maria de Lourdes Guedes Dutra. O presente trabalho contou com auxílio fornecido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

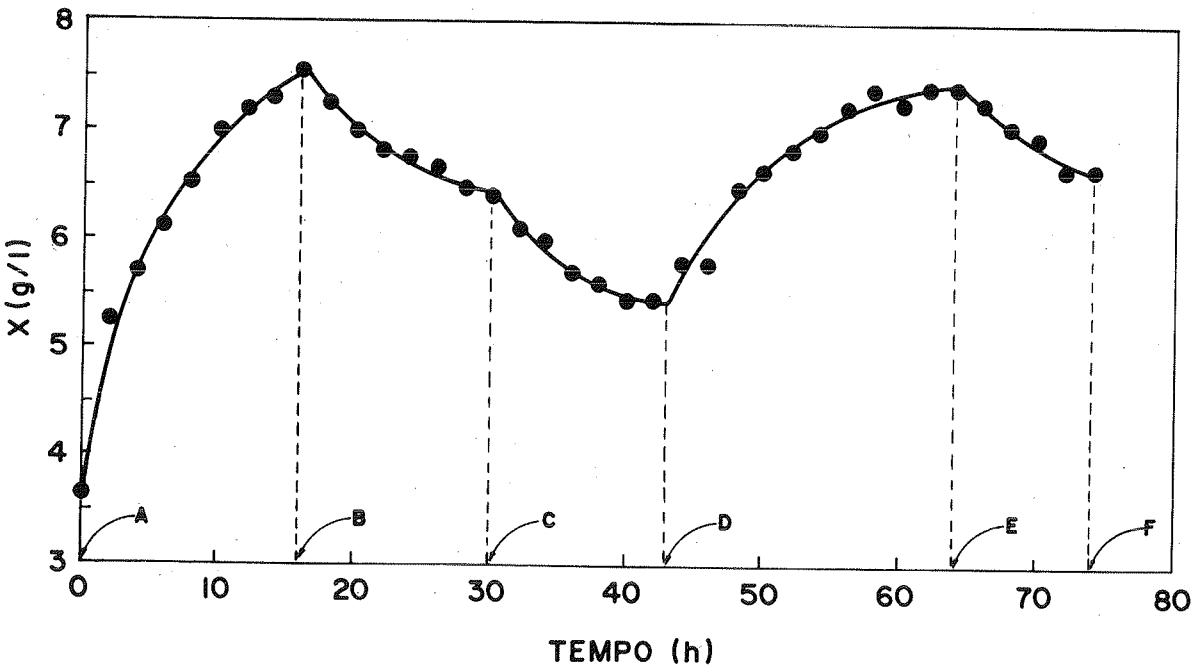


Fig. 1 — Influência da vazão de ar e da freqüência do agitador no cultivo contínuo de *Saccharomyces cerevisiae*. X = concentração de células. Concentração de A.R.T. no meio de alimentação = 35,9 g/litro. Vazão específica de alimentação = 0,16 h^{-1}. Início da fermentação contínua no ponto A. Condições de aeração e agitação:

Trecho	*Vazão de ar (litro/min)*	*Freqüência do agitador (rpm)*
AB	4,0	500
BC	4,0	300
CD	2,0	300
DE	4,0	500
EF	2,0	500

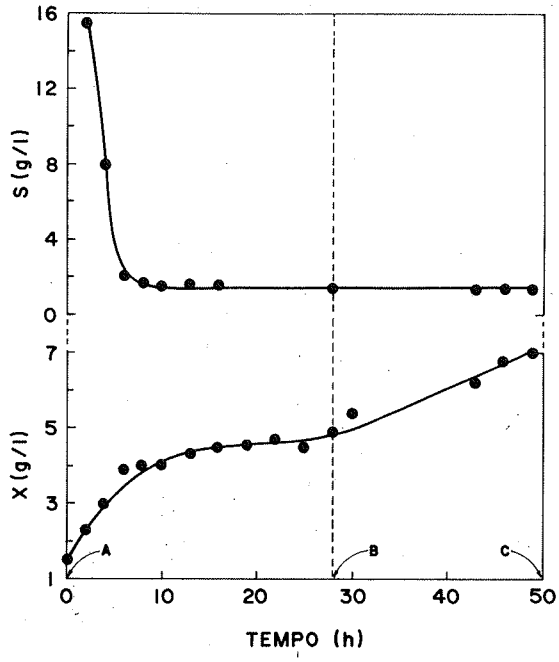


Fig. 2 — Influência da concentração de sais no cultivo contínuo de *Saccharomyces cerevisiae*. S = concentração de A.R.T. no meio em fermentação. X = concentração de células. Concentração de A.R.T. no meio de alimentação = 29,3 g/litro. Vazão específica de alimentação = 0,16 h^{-1}. Início da fermentação contínua no ponto A. Trecho AB: mosto preparado com água desmineralizada. Trecho BC: mosto preparado com água potável.

Referências Bibliográficas

1. BORZANI, W.; FALCONE, M. & VAIRO, M.L.R. — Kinetics of the continuous alcoholic fermentation of blackstrap molasses. *Appl. Microbiol.*, 8:136-140, 1960.
2. BORZANI, W. & VAIRO, M.L.R. — Liquid feeder for constant low rates. *Ind. Eng. Chem.*, 51:71-72, 1959.
3. BORZANI, W. & VAIRO, M.L.R. — Observations of continuous culture responses to additions of inhibitors. *Biotechnol. Bioeng.*, 15:299-308, 1973.
4. FALCONE, M. & MARQUES, A.B. — Estudo sobre as condições de hidrólise pelo ácido clorídrico na dosagem de açúcares redutores totais. *Tecnol. Alim. Beb.*, 4:24-30, 1965.
5. SOMOGYI, M. Notes on sugar determinations. *J. Biol. Chem.*, 195:19-23, 1952.

Estudo preliminar da vinhaça como substrato para leveduras

Sâmia Maria Tauk*

Resumo

Leveduras do gênero *Candida* e *Torulopsis* (*Torula*) utilizaram os compostos do meio de cultura preparado com vinhaça, com diferentes níveis de atividade. O pH ótimo de desenvolvimento foi determinado entre 4,6—4,8, através de curva de crescimento em diferentes pH. Após 48 horas de crescimento, as culturas foram centrifugadas para determinação de proteína, biomassa, matéria seca, N total e fósforo.

Summary

Preliminary study of the vinesse as a substrate for yeast growth

Strains of Candida and Torulopsis (Torula) species maintained in submerged culture were able to utilize the compounds of the vinesse media with different levels of activity. Optimal pH was 4.6-4.8. Total biomass, dry weight, total N, protein and pH values of the medium were followed during a 48 hr culture period.

Introdução

O aproveitamento da vinhaça, como substrato para crescimento de levedura, já está se desenvolvendo entre nós.

Pesquisas realizadas em várias partes do mundo são acordes em apontar as leveduras *Torulopsis utilis* (*Candida utilis*) como as que oferecem melhores resultados, por serem organismos pouco exigentes e de rápido crescimento.

Lefrançois (3) discutiu o problema de recuperação das leveduras nas fermentações alcoólicas e a produção de proteína a partir da vinhaça. Goering & Houle (2) verificaram a obtenção de leveduras a partir de cevada, determinando a utilização do nitrogênio (N), carboidratos e efeito do fosfato na assimilação do N por *Candida utilis.* Malanowska & Koslowska (6) utilizaram meio de vinhaça, contendo 10% de melaço, no cultivo de *Torulopsis utilis* (*Torula utilis*).

As proteínas de *Torulopsis utilis* foram isoladas para uso em alimentação por Mitsuda & col. (10). Soth (18), procurando meio de cultura para *T. utilis* e *C. mycoderma,* verificou que, em líquido sulfítico, a massa celular foi de 11,5 g/12 horas, quando trabalhando com cultura mista das duas linhagens.

Em líquido obtido do melaço, após separação do açúcar com cálcio (Ca), contendo 0,32-1,0% de açúcar redutor, Notkina & col. (11) obteve massa de células de *T. utilis* com 47 a 60% de proteína.

Matsuo & col. (8) obtiveram células de *C. utilis* em substrato de vinhaça contendo 1,6% de açúcar total, 1,2% de N total e 7,3% de matéria orgânica. A levedura obtida continha 45% de proteína. Os mesmos autores (9) obtiveram leveduras com 50% de proteína de *C. utilis* e 45% de proteína de *C. arborea.*

Vários autores (7, 12, 15, 18) obtiveram resultados satisfatórios na produção de proteína de leveduras em meios de cultura de baixo custo.

O presente trabalho não visa apresentar um método que venha a substituir os já tradicionais, mas adiciona dados que, em tentativa preliminar, forneçam condições para melhores rendimentos na produção de proteína de leveduras.

* Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Presidente Prudente — Rua Roberto Simonsen n.º 305 — 19.100 Presidente Prudente - SP.

Material e Métodos

Organismos e métodos de cultura — As leveduras utilizadas foram originariamente obtidas no Instituto Zimotécnico Prof. Jayme Rocha de Almeida, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP, em meio de glicose-peptona, a que chamamos de meio completo para leveduras.

As linhagens compreendem: *Candida brumpti, C. zeilanoidea, C. robusta, C. stellatoidea, C. parapsilosis, C. quilliermondi, C. intermedia, C. pseudotropicalis* ATCC, *C. solani, C. melinii, C. melibiose, C. membranofaecalis, C. vartiovaarai, C. krusei, Torulopsis utilis* e *T. asperula.*

Foram feitas transferências em Erlenmeyers de 500 ml de capacidade contendo 90 ml de meio, colocados em mesa agitadora, para aeração.

Dosagem de vinhaça pura — Na vinhaça, foram determinados, quantitativamente, carbono, potássio, cálcio, cinza, açúcar redutor, nitrogênio, matéria seca e proteína total. Os resultados obtidos foram determinados a partir de três amostras de vinhaça, antes do cultivo das leveduras. As formas de açúcar redutor foram determinadas segundo Somogyi (17), nitrogênio total e proteína total por Kjeldahl (4), fósforo segundo os métodos descritos por Lott & col. (5), potássio por fotometria de chama de absorção Perkin & Elmer (13) e cálcio pela mesma técnica de Bataglia & Gallo (1).

Desenvolvimento das leveduras em meio de vinhaça — As leveduras foram inoculadas em 90 ml e meio de vinhaça a 100%, pH 4,6 durante 48 horas, em temperatura de 30 a 32°C. Após o cultivo, foram determinados massa seca, N, P, P_2O_5, resíduo seco, gordura, proteína total segundo os métodos descritos pelos autores acima citados.

A curva de crescimento das leveduras em substrato de vinhaça foi determinada através da massa seca obtida.

Para determinação da curva de crescimento em diferentes gradientes de pH, de 4,2 a 5,8, o acerto do meio foi feito com HCl ou NH_4OH.

Resultados

A vinhaça pura sofre alterações, de acordo com a safra da cana, época da safra e com a região do cultivo.

Com base nesses fatores, os primeiros ensaios foram estabelecidos em vinhaça de 1974, da Usina Santana, da região de Rio Claro, SP, coletada nos meses de junho-julho. Os dados obtidos estão distribuídos na Tabela 1.

Os resultados obtidos no desenvolvimento de leveduras em vinhaça a 100%, estão na Tabela 2.

Através dos resultados da Tabela 2, foram selecionadas 11 linhagens para determinação da curva de crescimento e sensibilidade ao pH.

As curvas de crescimento foram determinadas por mg de matéria seca / 100 ml de vinhaça (Figs. 1-4).

O crescimento das linhagens selecionadas, sob diferente pH, através da matéria seca (mg/100 ml de meio), está indicado nas Figs. 5-8.

Discussão

Os dados da Tabela 1 permitem concluir que a vinhaça é um substrato que, embora pobre, tem condições de apresentar macronutrientes como carbono, potássio e cálcio.

O uso da vinhaça como meio de cultura para produção de proteína de leveduras é restrito, como podemos observar na Tabela 2.

As leveduras do gênero *Torulopsis* têm composição química de: água, 5,85%; cinzas, 9,07%; fósforo, 1,92%; cálcio, 0,85%; proteína, 47,43%; gorduras, 1,01-4,84% e fibra, 0,82%.

Comparando com essas porcentagens, as leveduras citadas na Tabela 2 apresentam baixa porcentagem de proteína total, fósforo e cinzas. Quanto a porcentagem de N total, nossos resultados foram superiores aos de Matsuo & col. (8).

Baseando nesses resultados selecionamos 11 linhagens de leveduras que apresentaram quantidades mais elevadas de proteína total, massa seca, N total e P, quan-

TABELA 1

AMOSTRA	MATÉRIA SECA g/1	CARBONO	NITROGÊNIO	AÇÚCAR REDUT. g/1	CINZA	PROTEÍNA TOTAL %	K	Ca
1	3,60	6,19	4,7	5,6	2,86	29,38	2,5	2,8
2	4,18	6,20	4,5	5,6	2,80	29,88	2,6	2,7
3	3,98	6,18	4,2	5,6	2,79	23,62	2,6	2,6
4	3,40	6,20	4,1	5,6	2,82	24,38	2,4	2,8
5	3,45	6,10	4,4	5,6	2,83	26,25	2,5	2,8
Média	3,72	6,19	4,4	5,6	2,80	26,70	2,5	2,7

Análise de macronutrientes de vinhaça obtida na Usina Santana - Rio Claro - SP - 1974.

TABELA 2

Levedura	pH	Massa Seca g/1	Proteína total %	N %	Resíduo mg/1	P %	P_2O_5 %	Gord. %
C. brumpti	5,0	18,52	26,25	4,2	0,79	0,6	1,35	1,02
C. zeilanoidea	5,2	13,48	38,12	6,1	0,72	0,5	1,09	1,12
C. robusta	5,3	13,58	32,19	5,2	0,89	0,4	0,93	1,14
C. stellatoidea	5,5	24,87	30,94	5,0	0,95	0,5	1,14	2,08
C. parapsilosis	4,9	30,31	27,44	4,4	0,88	0,4	0,98	1,04
C. quilliermondi	4,8	12,64	23,75	3,8	9,75	0,4	0,82	1,18
C. pseudotropicalis IOC	4,3	37,71	27,81	4,5	0,75	0,4	0,87	1,24
C. utilis	4,1	18,59	32,00	5,1	0,82	0,5	1,19	1,85
C. intermedia	5,3	45,62	25,37	4,1	0,50	0,6	1,37	2,07
C. pseudotropicalis ATCC	4,9	32,38	26,25	4,2	0,63	0,6	1,42	1,92
C solani	5,0	10,30	33,56	5,4	0,74	0,5	1,14	1,61
C. melinii	4,8	68,73	15,62	2,5	0,71	0,6	1,29	1,23
C. membranofaecalis	5,4	94,50	19,69	3,2	0,61	0,2	0,29	1,50
C. vartiovaarai	5,3	71,50	20,00	3,2	0,71	0,3	0,76	1,84
C. krusei	5,4	55,18	23,31	3,7	0,72	0,6	1,35	2,02
T. utilis	5,4	28,25	32,56	5,2	0,88	0,6	1,35	2,20
T. asperula	5,3	22,82	15,81	2,5	0,82	0,3	0,69	1,89

Determinação do rendimento de leveduras cultivadas em meio de vinhaça a 100% obtida na Usina Santana - Rio Claro - SP

do cultivadas em vinhaça 100%. Destas 11 leveduras, verificamos o comportamento quanto ao pH e curva de crescimento em vinhaça. (Figs. 1-8).

Além da composição química da massa celular, verificamos que, na vinhaça utilizada, as condições de cultivo para resultados satisfatórios são pH 4,6-4,8, em 48 horas. No entanto, Soth (18) encontrou melhores resultados com cultura mista de *T. utilis* e *C. mycoderma*, em vinhaça 100%.

As leveduras consideradas "selvagens" têm sido utilizadas como fonte de proteína, na substituição daquelas provenientes de gado e peixes.

Cientistas de todo mundo têm procurado meios para se conseguir aminoácidos, de maneira a se tornarem acessível a população, como fonte de alimento. Todavia a dificuldade está em se conseguir leveduras que se desenvolvam bem em meio relativamente pobre, que compense a extração economicamente.

No início do projeto, propusemo-nos a estudar o desenvolvimento de leveduras dos gêneros *Candida* e *Torulopsis* em vinhaça. Nesse meio de cultura, as leveduras inicialmente apresentaram resultados inferiores aqueles necessários à sua industrialização (Tabela 2).

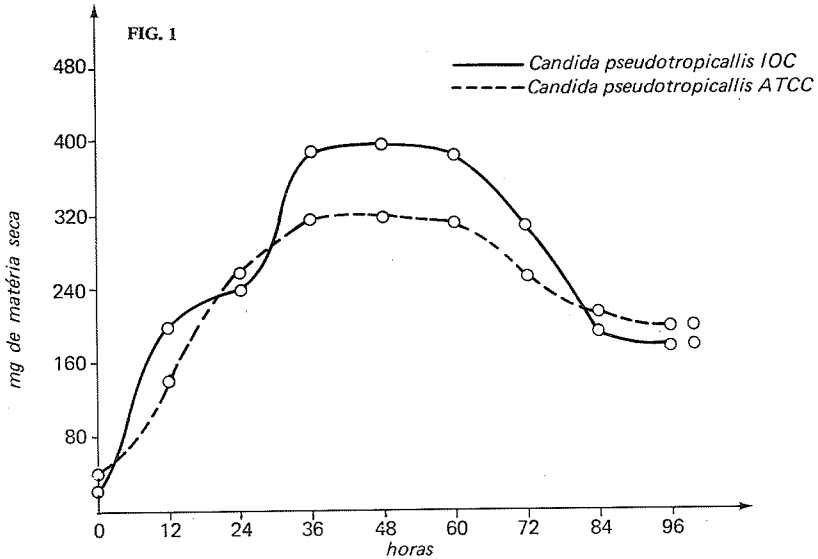
No entanto, já estão sendo desenvolvidos testes de adaptação de leveduras em vinhaça com cultivos seriados, havendo resultados preliminares satisfatórios que justificam a continuidade dos experimentos.

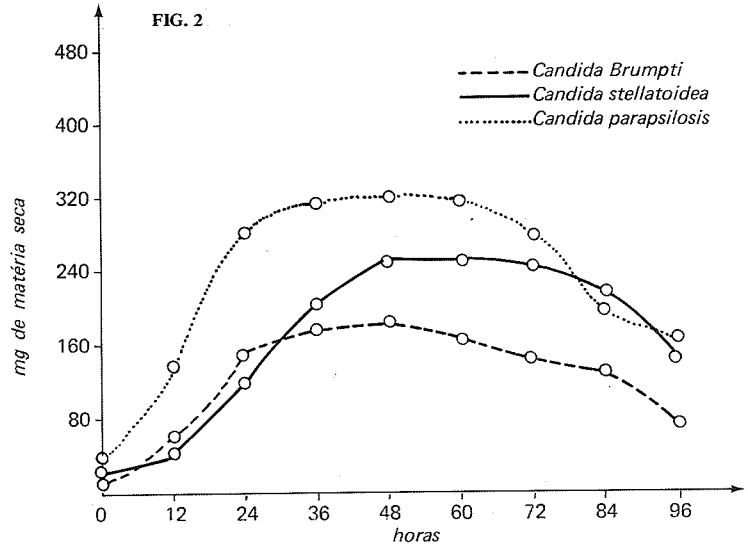
Serzedello & col. (15) chegaram à conclusão de que a vinhaça é um substrato pobre para a obtenção de massa celular de levedura e, com a simples adição de seu próprio resíduo autolizado, é possível melhorar em 50% a sua capacidade alimentadora para *Torulopsis.*

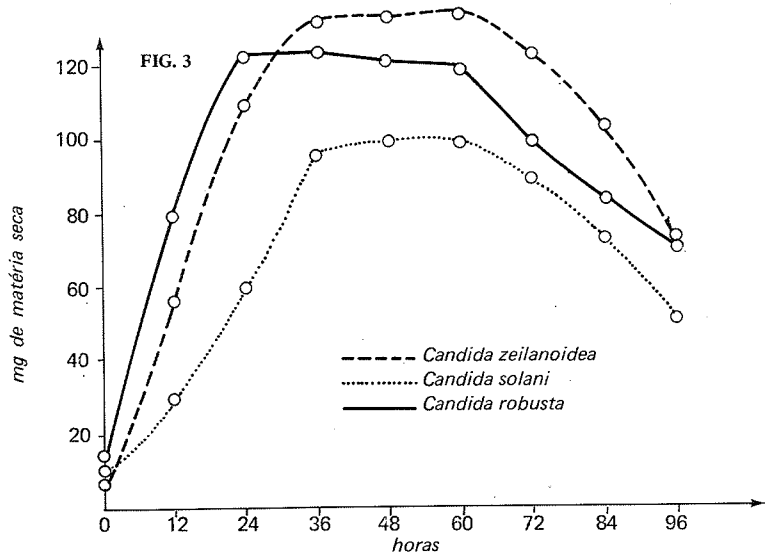
Entretanto, achamos que os métodos que não exigem e não complementação à vinhaça seriam mais acessíveis aos usuários, para aplicação em suas usinas de cana-de-açúcar.

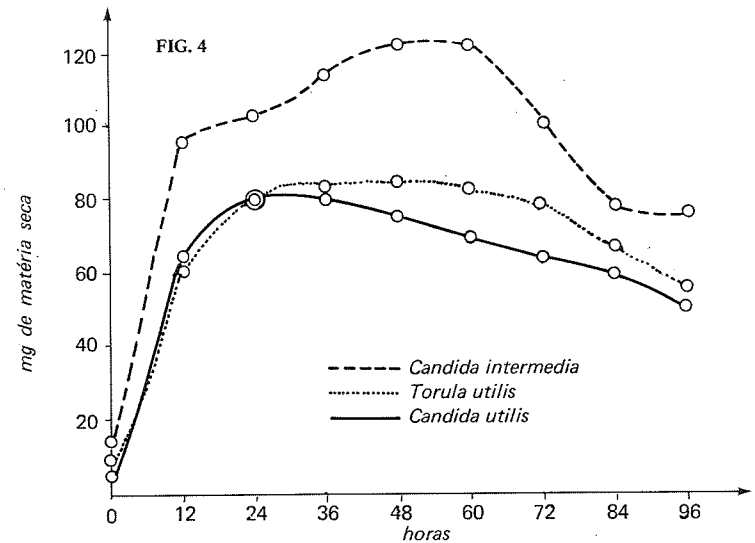
A obtenção de linhagens de leveduras adaptadas à vinhaça poderia facilitar o uso industrial desses microrganismos para a produção de massa proteica como complementação alimentar.

DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO DE LEVEDURAS EM VINHAÇA A 100%, ATRAVÉS DE mg DE MATÉRIA SECA POR 100 ml DE MEIO









DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO DE LEVEDURAS EM VINHAÇA A 100% EM DIFERENTES pH

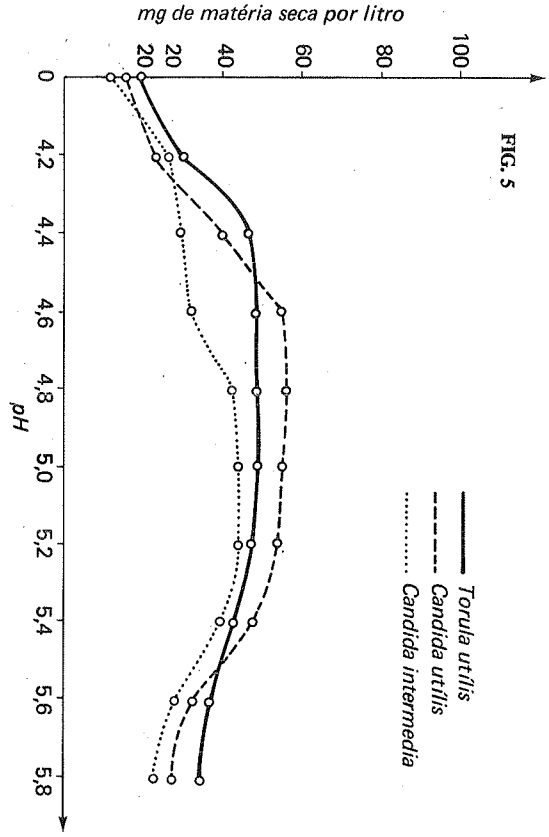


FIG. 5

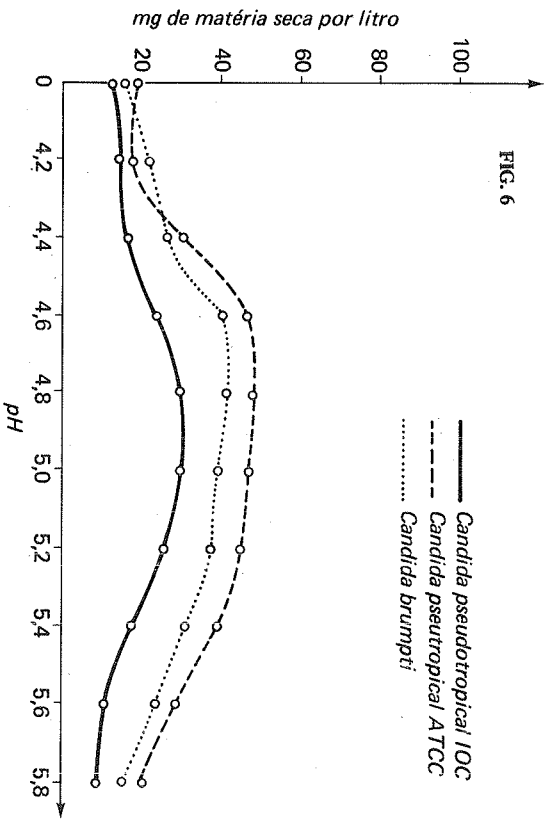


FIG. 6

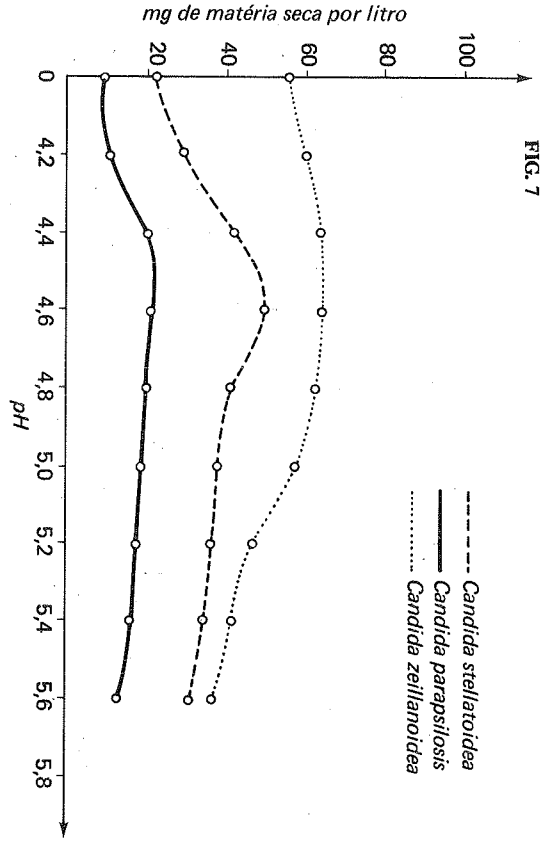


FIG. 7

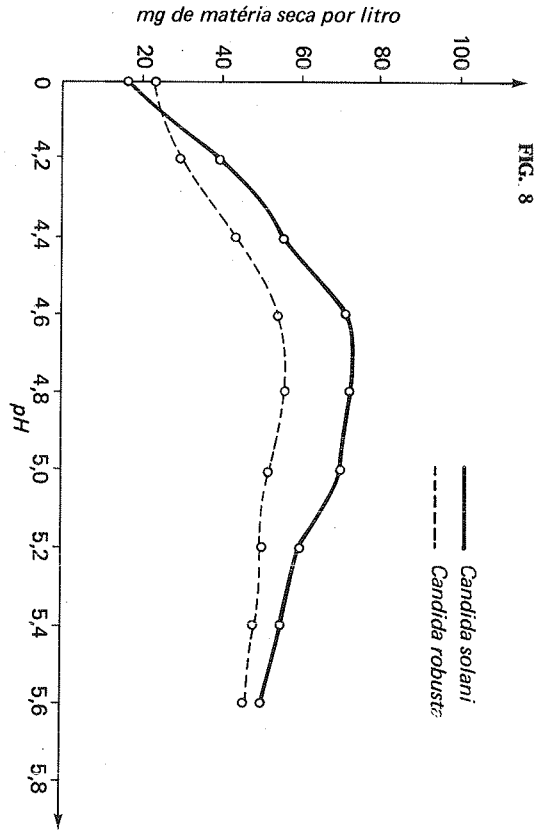


FIG. 8

Referências bibliográficas

1. BATAGLIA, O.C. & GALLO, J.R. — Determinação de cálcio e magnésio em plantas, por fotometria de chama de absorção. *Bragantia,* 31:57-72, 1972.
2. GOERING, K.H. & HOULE, M.H. — Production of fodder yeast from barley. Preliminary studies on the use of the Waldhof fermentor. *Cereal Chem. Amer. Assoc. of Cereal Chem.,* 40(1):18-30, 1963.
3. LEFRANÇOIS, M. — La récupération des levures dans la fermentation alcoolique. Industries Agricoles et Alimentaires, 70:9-10, 1953.
4. KJELDAHL, J. — Determination of N total. A.O.A.C. — Official methods of analysis. A.O.A.C., Washington, 9th ed. 1960.
5. LOTT, W.L.; NERY, O.P.; GALLO, J.R. & MEDCALF, J.C. — A técnica de análise foliar aplicada ao cafeeiro. Campinas, Instituto Agronômico, 29 p. 1956.
6. MALANOWSKA, J. & KOSLOWSKA, E. — Utilization of some compounds from vinasse and molasses and vinass, containing worts during yeast production. *Przemysl Ferment,* 8(11):88-89, 1965.
7. MALANOWSKA, J.; SKIBS, M.; LEBENDZINSKI, S. & WOJCIESZAK, P. — Yeast cultivation on the molasses slops, supplemented with molasses. *Pr. Inst. Lab. Inst. Przem. Ferm,* 17(3):27-48, 1967.
8. MATSUO, T.; INSHIKAWA, F.; YAMANAKA, M.; ISHIOKA, S.; KAWAKI, U. & KONISHI, J. — Yeast production from alcohol distillation slops of cane molasses. *Minist. Intern. Trade Ind. Tokyo,* 24(2): 67-70, 1966.
9. MATSUO, T.; ISHIKAWA, F. ; YAMANAKA, M.; ISHIOKA, S. & KONISHI, K. — Yeast production from alcohol distillation slops of cane molasses — II. *Minist. Intern. Trade Ind. Tokio,* 24(3):68-70, 1966.
10. MITSUDA, H.; KAWAI, F.; MIBU, R. & SHIKANAI, T. — Protein foods — I Isolation of protein from Torula Yeast. *Kyoto - Japan. Eiyo Shokuryo,* 17(5):342-346, 1965.
11. NOTKINA, L.G.; ZAPARA, E.M. & BALYBERDINA, L.M. — Growth of nutrient yeasts in liquors from sugar-free molasses. Ed. Pidoplichko M.M. Vidavitstwo, 1965.
12. NOTKINA, L.G.; ZAPARA, E.M.; GOLUBHIK, M.G. & BALYBERDINA, M. — Nutrient yeasts from mother liquor after separation of sugar molasses. *V. Biokhim. Teknol. Pishch. Proizvod.,* (5):179-186, 1967.
13. PERKIN-ELMER. — Revision of analytical methods for atomic absorption spectrophotometry. Norwalk, Connecticut, 1971.
14. SERZEDELLO, A. — Vinhaça como substrato para a produção de proteína alimentar. III Semana de Fermentação Alcoólica: Fermentação do caldo de cana. 2:303-312, 1962.
15. SERZEDELLO, A.; MIGUEL, A.P.N.; CAMARGO, I.H.B. & BARBIERI, G. — Estudos sobre obtenção de levedura alimentar em substratos de vinhaça. *Rev. Agr.,* 45(1):22-27, 1970.
16. SHAMIS, D.L. & DENISENKO, L.E. — Cultivation of pentose Yeast in sulfite liquor and the selection of industrially useful strains. *Tr. Mikrobiol. Virusol.,* Akod. Nauk Taz. 11:30-33, 1968.
17. SOMOGYI, M. — A new reagent for determination of sugars. *J. Biol. Chem.,* 160:61, 1945.
18. SOTH, B. — Changes occuring during the yeast fermentation of wast sulfite liquors. *Acta Chim. Ac. Sci.,* 47:431-449, 1966.
19. ZABRODSKII, A.G.; PARKHOMCHUK, M.A. & VOS'KO, T.P. — Condiction for molasses spent wash. *Tr. Ucr. Nauch.* 11:114-124, 1967.

Microbiologia nos planos de governo: pesquisa e desenvolvimento*

João S. Furtado**

Resumo

Análise de planos do governo federal brasileiro, para identificação das oportunidades em pesquisa e desenvolvimento para a microbiologia, com o objetivo de disseminar as intenções e programas governamentais e de criar maiores oportunidades para a participação da comunidade científica e tecnológica para a definição de metas e prioridades. Identificação de setores sócio-econômicos para os quais a microbiologia contribui e motivação a entidades e especialistas para acompanharem o desempenho dos referidos planos governamentais.

Summary

Microbiology in governmental programs: research and development

Analysis of PBDCT — "Plano Básico de Desenvolvimento Científico e Tecnológico", the Brazilian basic plan for scientific and technological development. Approximately Cr$ 22 billions (currency value for 1975) shall be allocated during 1975-1977, from several Federal Funds and Agencies. The opportunities for R & D in microbiology have been identified with the purpose to stimulate a higher participation of scientists and technologists in goal propositions and priorities definition, and to motivate a follow up of the governmental performance in science and technology.

A análise dos planos governamentais em ciência e tecnologia tem duplo objetivo: estimular a participação de pesquisadores e tecnólogos para a proposição de metas e diretrizes e criar condições para o acompanhamento de programas governamentais, pela comunidade especializada que integra as Sociedades Científicas.

Na avaliação da pesquisa fundamental e pós-graduação em microbiologia, no Brasil, a comissão encarregada de propor subsídios para o II PBDCT — Segundo Plano Básico de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (1) fez os seguintes comentários em seu relatório:

- A pós-graduação e a pesquisa em microbiologia no Brasil caracterizam-se por apresentar um grupo de microbiologistas qualificados, especialmente pelas facilidades que tiveram de estudar em outros centros.
- Se comparadas a países em desenvolvimento, a pesquisa e pós-graduação em microbiologia no Brasil está ganhando terreno, aos poucos, e consolidando sua posição. Se comparadas a países desenvolvidos, todavia, onde a tradição de pesquisa e de ensino acadêmico, nos moldes da atual pós-graduação brasileira, já ultrapassaram a várias décadas, ainda tem muito o que avançar.

Para recuperar o déficit em recursos humanos para a pesquisa fundamental e pós-graduação, foram apresentadas alternativas visando:

- a integração de maior número de orientadores para a pós-graduação
- a criação de condições para aumentar a produtividade dos atuais orientadores
- e a criação de condições para elevar o nível do corpo docente de nossos centros universitários.

A limitação metodológica imposta para a ação da comissão restringia a busca de informações e a apresentação de subsídios unicamente a "centros de pós-graduação reconhecidos pelo Conselho Federal de Educação" ou a "centros de excelência, reconhecidos pelo CNPq — Conselho Nacional de Pesquisa".

Não foram considerados os núcleos de pesquisa e desenvolvimento nos quais a microbiologia exerce papel preponderante, na área de execução de projetos, prestação de serviços e formação de recursos humanos, responsáveis por apreciável capacitação para a inovação e

* Conferência; VII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Porto Alegre RS, 25-29 de julho de 1976.
** Instituto de Botânica, Secretaria da Agricultura, Caixa postal 4005, 01 000 São Paulo SP Brasil.

desenvolvimento de tecnologias.

Seus nomes não serão mencionados, em parte para não se cometer a injustiça de omissão de várias entidades, por falha de omissão ou mesmo por seu desconhecimento ao autor.

Visão geral da microbiologia

A microbiologia é um dos mais abrangentes ramos das ciências biológicas (1).

. *A microbiologia médica* abrange o estudo dos microrganismos patogênicos para o homem. Seus estudos têm por objetivo o conhecimento detalhado do agente e de suas relações com o hospedeiro. Destes conhecimentos, resultam os recursos para o reconhecimento etiológico, profilaxia e tratamento das doenças microbianas. A microbiologia médica também se encarrega do estudo de microrganismos patogênicos para os animais, com os mesmos objetivos já mencionados.

. *A microbiologia agrícola* cuida dos microrganismos envolvidos na fertilidade do solo, transformações dos compostos de carbono, nitrogênio e enxofre; com os agentes etiológicos de moléstias vegetais e no controle biológico de pragas que assolam os campos de plantação. Estão incluídos, na microbiologia agrícola, os microrganismos envolvidos no processo digestivo de bovinos e outros ruminantes; os efeitos benéficos e maléficos dos microrganismos nos processos relacionados ao aumento das colheitas e na produtividade animal.

. *A microbiologia de alimentos* cuida do papel dos microrganismos no preparo e degradação de alimentos; os alimentos como veículo de patógenos; e os diferentes processos de detecção de microrganismos e de preservação de alimentos.

. *A microbiologia industrial* estuda o papel dos microrganismos na produção de proteínas microbianas ("single cell protein"), bebidas, antibióticos e outros medicamentos, alcoóis, ácidos, solventes, aminoácidos, enzimas e outros compostos químicos; processos de mineração (geomicrobiologia); prospecção de campos petrolíferos, decomposição do petróleo, madeiras, e outros materiais de construção; decomposição de despejos (domésticos e industriais) e resíduos da agro-indústria.

A microbiologia ambiental representa campo de estudo bastante amplo e, por natureza, interdisciplinar, com grandes reflexos em saúde pública.
Está ligada a processo de purificação de águas, monitoração ambiental, minimização ou correção de poluição ambiental, no solo, água e ar.
A estas, dever-se-ia acrescentar a seguinte:

. *A microbiologia básica* envolve a genética, fisiologia, ecologia, estrutura, taxonomia e outras disciplinas, convencionalmente designadas básicas ou fundamentais.
Os estudos incluídos nesta categoria são os que não se enquadram nos setores aplicados da microbiologia, anteriormente citados.

A microbiologia participa na formação de universitários em diversos campos profissionais: medicina, veterinária, farmácia, enfermagem, odontologia, agronomia, biologia, engenharia sanitária e industrial, tecnologia ambiental, de alimentos, florestal, etc.

Estima-se que 35.000 alunos recebam, anualmente, ensinamentos em microbiologia.

Como ramo da pesquisa, apresenta vínculos bastante fortes com numerosos setores na área social e econômica.

A microbiologia e as atividades em ciência e tecnologia

Sem entrar em discussões semânticas ou conceituais, mas apenas para se adotar um denominador comum para comunicação, as atividades em ciência e tecnologia podem ser assim categorizadas:

. PESQUISA: atividade criativa, original, desempenhada para aumentar a capacitação científica nos mais diferentes setores do conhecimento humano. A *pesquisa básica* busca o conhecimento científico sem compromisso de aplicação pré-determinado dos resultados pretendidos. A *pesquisa aplicada* visa a aplicação pré-determinada dos resultados pretendidos.

. DESENVOLVIMENTO: atividade de aplicação de conhecimentos acumulados, com o objetivo de gerar novos produtos, processo ou serviços. O desenvolvimento corresponde à tecnologia propriamente dita.

. SERVIÇOS TÉCNICO-CIENTÍFICOS: exames, análises, testes, controle de qualidade, padronização, normalização e atividades afins.

. FORMAÇÃO DE RECURSOS HUMANOS: cursos, estágios e treinamento de pessoal, em nível de pós-graduação ou de especialização pós-universitária.

A microbiologia é parte integrante de considerável número de projetos incluídos nos planos de governo.

Pelo fato de serem desconhecidos planos Estaduais, serão considerados, no presente, apenas os programas e projetos a nível do Governo Federal, contidos no II PBDCT (2).

PBDCT: conteúdo filosófico e programático

O II PBDCT representa o conjunto de programas, projetos e intenções em ciência e tecnologia, a serem desenvolvidos com recursos provenientes de fontes federais e resultantes de investimentos feitos por outros setores (público e privado) nas atividades de pesquisa e desenvolvimento.

O PBDCT representa o desdobramento de capítulo específico do PND — Plano Nacional de Desenvolvimento, referente à política de ciência e tecnologia.

As iniciativas partem fundamentalmente do âmbito dos Ministérios e empresas públicas federais. A evolução deve ser feita de maneira a permitir a efetiva implementação do Sistema Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, sob a coordenação geral da SEPLAN — Secretaria de Planejamento, da Presidência da República.

O PBDCT terá como esquema financeiro um orçamento-programa trienal, o qual constituirá, no orçamento geral da união, o elemento "CIÊNCIA E TECNOLOGIA". As dotações principais serão procedentes das seguintes fontes:

. FNDCT — Fundo Nacional de Desenvolvimento Científio e Tecnológico
. CNPq — Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
. CAPES — Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior
. BNDE — Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico
. FINEP — Financiadora de Estudos e Projetos

O volume de aporte financeiro, previsto para o triênio, é da ordem de Cr$ 22 bilhões (a preços de 1975).

A elaboração e o acompanhamento da execução do PBDCT são da responsabilidade do CNPq, cuja reforma administrativa e jurídica foi feita com a intenção de conferir, à entidade, a necessária base operacional.

Os programas setoriais, contidos no PBDCT, estão assim sistematizados:

. *Programas setoriais prioritários,* que incluem:
— Desenvolvimento de novas tecnologias (energia nuclear, atividades espaciais, recursos do mar e fontes e formas não-convencionais de energia)
— Tecnologia de infra-estrutura, energia, transportes e comunicações (energia elétrica, petróleo, transportes, comunicações)
— Tecnologia industrial
— Desenvolvimento da agropecuária (tecnologia agropecuária, recursos florestais e recursos pesqueiros)
— Tecnologia aplicada ao desenvolvimento regional e social (programas regionais integrados, meio-ambiente, habitação e saneamento, saúde, alimentação e nutrição, e tecnologia educacional).

. *Desenvolvimento científico e formação de recursos humanos para a pesquisa*

. Organização institucional e atividades de apoio para o desenvolvimento científico e tecnológico
— Organização institucional para o desenvolvimento científico e tecnológico
— Atividades de apoio para o desenvolvimento científico e tecnológico

A microbiologia no II PBDCT

A leitura de programas e projetos incluídos no II PBDCT revela que a microbiologia assume papel relevante para a consecussão das metas contidas nos planos de governo. Ora se destaca como parte integrante, claramente explícita; ora como alternativa implícita.

Como grande parte das informações aqui incluídas é derivada de interpretação pessoal, recomenda-se que o texto original seja consultado, sempre que seu uso deva ser formalizado.

O número citado entre parênteses corresponde à página do PBDCT da qual a referência foi extraída.

1. ENERGIA NUCLEAR

Através de diretrizes específicas contidas no II PND, a energia nuclear, até o final da presente década, deverá ser utilizada consideravelmente para o suprimento energético. Entre as expectativas do II PBDCT, a oportunidade para a microbiologia se revela nos seguintes principais setores:

1.1. Prospecção de minérios nucleares (p. 40)
1.2. Aplicação de radioisótopos (p. 40), particularmente na medicina (diagnóstico e terapia), agricultura (genética, melhoramento, controle de agentes fitopatológicos, traçadores aplicados à pesquisa sobre a fertilidade do solo, nutrição, fisiologia e bioquímica, nitrologia)

2. FONTES NÃO-CONVENCIONAIS DE ENERGIA

Pesquisa de novas fontes, levando-se em conta a tecnologia de geração de energia, sua utilização racional e adequada e seu impacto sobre o meio-ambiente. Em relação à microbiologia, destaca-se, em particular:

2.1. Bioconversão (p. 49), envolvendo: mecanismo de fotossíntese (cultura de algas para a obtenção de proteínas); pirólise de materiais e detritos orgânicos para obtenção de produtos químicos líquidos e gasosos (combustíveis); desenvolvimento de processos especiais para diferentes tipos de vegetais e/ou detritos orgânicos; estudos experimentais e de viabilidade para a fermentação de vegetais para a produção de álcool e para fermentação anaeróbia de detritos orgânicos sólidos.

3. TECNOLOGIA INDUSTRIAL

Desenvolvimento de tecnologia para garantir o suprimento requerido para a expansão e modernização do

parque industrial brasileiro. As oportunidades para a microbiologia, no setor industrial, destacam-se nos seguintes casos:

3.1. Padronização industrial (p. 80): metrologia, normalização, controle de qualidade
3.2. Engenharia, informações e estrutura tecnológica industrial (p. 84): planejamento e coordenação de implantação de complexos tecnológicos; avaliação de alternativas tecnológicas
3.3. Indústria farmacêutica (p. 87): estudos farmacoclínicos (seleção de novos fármacos e medicamentos; aferição de eficácia e segurança dos medicamentos em uso ou em perspectiva de lançamento no mercado farmacêutico); pesquisa e desenvolvimento de processos (obtenção de fármacos prioritários, especialmente antibióticos, hormônios e enzimas, etc.); engenharia de processos para a elaboração de projetos de instalação industrial
3.4. Desenvolvimento de processo para obtenção de concentrado proteico de pescado (p. 89)
3.5. Mineração (p. 91, 92, 93)
3.6. Estudos de fertilizantes (p. 91, 93)
3.7. Tecnologia de alimentos (p. 93, 94, 128, 129)

4. RECURSOS NATURAIS

4.1. Recursos do mar (p. 45): aproveitamento dos recursos biológicos
4.2. Recursos florestais (p. 103-105): produtividade, controle de pragas
4.3. Recursos pesqueiros (p. 107): recursos pesqueiros de águas interiores (características das águas, para embasamento à piscicultura e limnologia); cultivo de espécies marinhas e estuarinas (doenças e parasitas de espécies de interesse econômico); cultura de microrganismos relevantes para as criações experimentais de peixes crustáceos; tecnologia da industrialização do pescado

5. AGRICULTURA

5.1. Defesa fitossanitária (p. 100): mapeamento, estudos biológicos, controle, experimentação; introdução de microrganismos para controle biológico
5.2. Projetos agropecuários regionais (p. 99-101): desenvolvimento de sistemas integrais de produção para as regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste, Sul

6. PROGRAMAS REGIONAIS INTEGRADOS

Conjuntos de programas dedicados ao desenvolvimento de regiões brasileiras: POLONORDESTE, POLAMAZÔNIA e POLOCENTRO.

6.1. Programa do trópico semi-árido (p. 112): desenvolvimento de técnicas de combate às pragas e doenças de cada cultivo animal ou vegetal
6.2. Programa do trópico úmido (p. 117): pesquisa sobre produção agrícola (estudos sobre transformações sofridas pelos fertilizantes e sua interação com a biosfera do solo)
6.3. Programa dos cerrados (p. 118): pesquisa e experimentação agropecuária (fertilidade química e microbiologia de solos; manejo de pragas, doenças)

7. MEIO-AMBIENTE

Atividade, principalmente através da Secretaria Especial do Meio-Ambiente, para garantir a utilização racional de nossos recursos naturais, através dos seguintes aspectos:

7.1. Implantação de Estações Ecológicas (p. 119) para preservação de recursos genéticos; estudos das alterações ecológicas causadas pelo homem e uso adequado do solo
7.2. Tecnologia do controle da produção ambiental (p. 119): levantamentos, estudos e controle da poluição do solo, ar e água de bacias hidrográficas (praias mananciais para abastecimento)
7.3. Controle da poluição e tratamento de rejeitos agroindustriais (p. 119): controle da poluição industrial e melhor aproveitamento de resíduos agroindustriais como matéria-prima para outros fins
7.4. Diagnóstico e difusão de informações sobre o meio-ambiente (p. 170): diagnósticos para ação educativa e identificação de necessidades de formação e treinamento de recursos humanos
7.5. Ampliação da oferta de serviços de apoio (p. 120): microrganismos e a poluição ambiental (comportamento de germes frente a drogas); tratamento de efluentes líquidos; capacitação para a fiscalização do meio-ambiente

8. HABITAÇÃO E SANEAMENTO

8.1. Tecnologia de tratamento de esgotos (p. 123)
8.2. Tratamento de esgoto sanitário para aproveitamento de efluentes para irrigação (p. 123)

9. SAÚDE

Atividades prioritariamente desenvolvidas principalmente pelo Ministério da Saúde, Universidades, voltadas para: (a) melhor conhecimento de processos mórbidos, os meios de tratá-los e controlá-los e (b) organização da assistência médico-sanitária e controle de doenças das comunidades.

9.1. Equacionamento de grandes endemias (p. 124-125): inquéritos; ecologia e controle biológico de setores e reservatórios silvestres; aprimoramento e meios de simplificação de diagnósticos; imunologia das grandes endemias; combate a doenças
9.2. Pesquisas integradas sobre doenças endêmicas (p. 125)

Volume 7, Número 1 — Janeiro/Março, 1976

Artigos originais

Dextranase bacteriana isolada de placa dental de humanos [*Bacterial dextranase isolated from human dental plaque*] — T. da Costa, L.C. Bier & F. Gaida 1

Ineficácia da tobramicina *in vitro* sobre *Pseudomonas* gentamicina-resistentes [*In vitro failure of tobramycin against gentamicin-resistant Pseudomonas*] — Marcelo Magalhães & Adelma Véras 4

Revisão:

Microbial Membranes I. Structure and Molecular Organization — Luiz R. Travassos & W. de Souza 7

Volume 7, Número 2 — Abril/Junho, 1976

Artigos originais

Comparação das propriedades de interferon de células L estimuladas por diferentes indutores. I. Cinética de liberação e sensibilidade à actinomicina D [*Comparison of the characteristics of the interferon from L cells stimulated by different inducers. I. Kinetics of the liberation and resistance to actinomycin D*] — Romain Rolland Golgher, Maria de Lourdes Petrillo Peixoto, José Mário da Silveira Mezencio & Paulo Cesar Peregrino Ferreira 31

A new leptospiral serotype isolated in Salvador, Bahia State — Irene Silva 35

Revisão:

RNA ribossômico em procariotos: estrutura e síntese [*Ribosomal ribonucleic acid of prokaryotes: structure and synthesis*] — Bianca Zingales & Walter Colli 38

Volume 7, Número 3 — Julho/Setembro, 1976

Artigos originais

Comparação das propriedades de interferon de células L estimuladas por diferentes indutores. II. Filtração em gel e centrifugação isopícnica [*Comparison of the interferon properties of L cells stimulated by different inducers. II. Gel filtration and isopicnic centrifugation*] — Romain Rolland Golgher, Paulo Cesar Peregrino Ferreira, Maria de Lourdes Petrillo Peixoto & José Mário da Silveira Mezencio 55

Atividade da nitrogenase na rizosfera de gramíneas tropicais forrageiras [*Nitrogenase activity in the roots of tropical forage grasses*] — Maria Cristina P. Neves, John M. Day, Adilson M. Carneiro & Johnna Dobereiner 59

Métodos de contagem de colônias em superfície e em profundidade como técnicas de referência para avaliação quantitativa de bacteriúria [*Surface and pour-plate colony counting as reference methods for quantitative evaluation*] — Alba Lúcia Solino Noleto, Alberto Strozemberg & Italo Suassuna 66

Volume 7, Número 4 — Outubro/Dezembro, 1976

Artigos originais

Ethionine resistence in the enteric yeast *Candida slooffii* — Eliana R.M. Barreto & L.R. Travassos 75

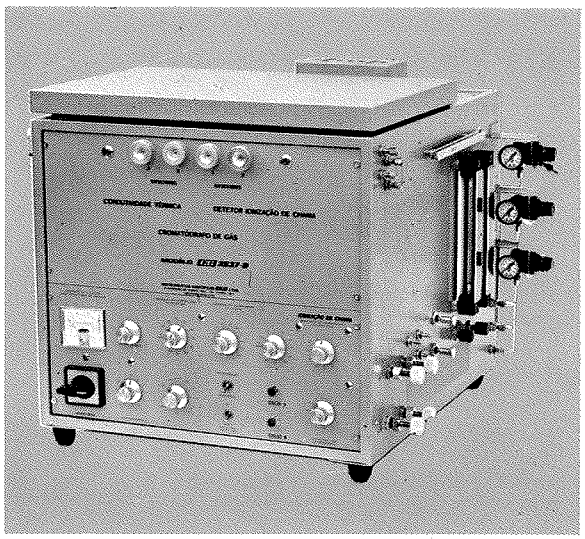
Seleção e uso de microrganismos com vistas à otimização dos processos de fabricação de produtos fermentados de leite [*Selection and use of microorganisms suitable for fermented dairy products*] — J. Cal-Vidal 82

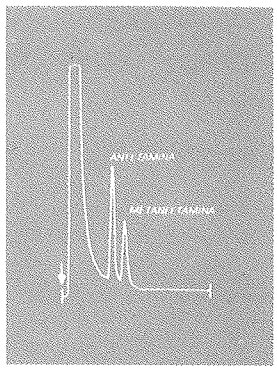
Cultivo contínuo de microrganismos em regime transitório [*Unsteady-state continuous culture of yeast cells*] — Walter Borzani, Marina L.R. Vairo, Rosana E. Gregori, Margarida M. dos A. Magalhães & Lilian B. Chueiri . . . 88

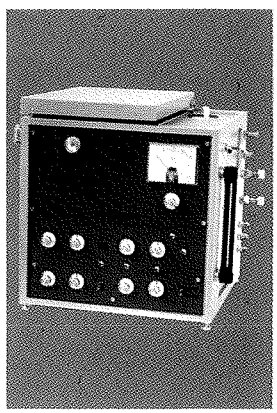
Estudo preliminar da vinhaça como substrato para leveduras [*Preliminary study of the vinesse as a substrate for yeast growth*] — Sâmia Maria Tauk 92

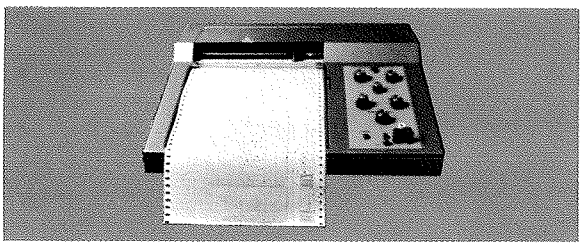
Microbiologia nos planos de governo: pesquisa e desenvolvimento [*Microbiology in governmental programs: research and development*] — João S. Furtado 98

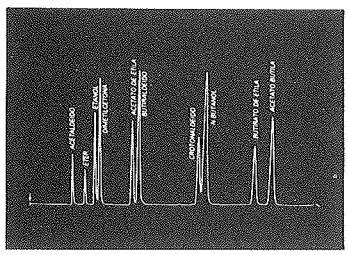
Em matéria de instrumentos científicos um nome se impõe: C.G.

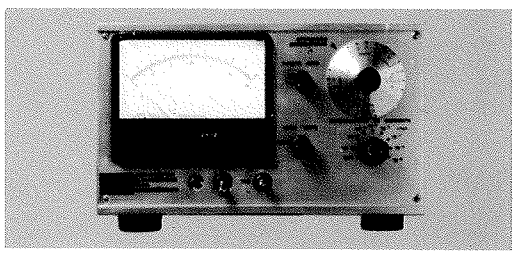


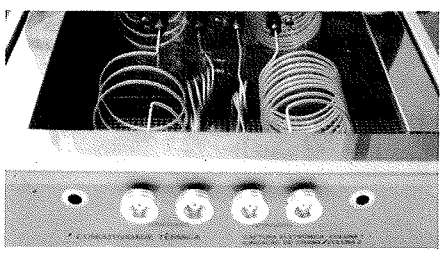


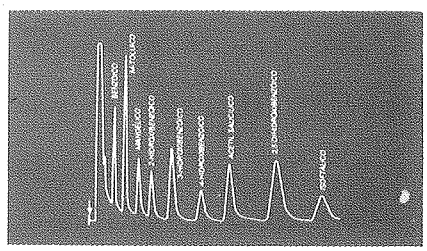












Há 15 anos a C.G. vem dotando os seus instrumentos do que existe de mais preciso no setor.

Graças a isso, tem solucionado o problema de análise de resíduos, ácidos, solventes, medicamentos, gases, óleos, aditivos e textil de mais de 500 emprêsas.

Preocupadas com a saúde pública, a Nestlé, Kibon, Anderson Clayton, Lepetit, Copersucar, Petrobrás, Phebo e Rhodia, têm, constantemente, usado os cromatógrafos da C.G.

Os cromatógrafos da C.G. são robustos, compactos e exatos.

Altamente sensíveis e compatíveis com computadores.

Inteiramente brasileiros, facilitam a reposição de peças.

São submetidas a um rigoroso controle de qualidade e contam com uma Assistência Técnica das mais perfeitas.

Conte com os instrumentos da C.G., para resolver os seus problemas de análise de medicamentos.

INDÚSTRIA BRASILEIRA

INSTRUMENTOS CIENTÍFICOS C.G. LTDA.

Catálogo CG - Série 30

Cromatógrafos de gás
Cromatógrafos de líquido
Integração eletrônica
Produtos químicos e
Acessórios para cromatografia

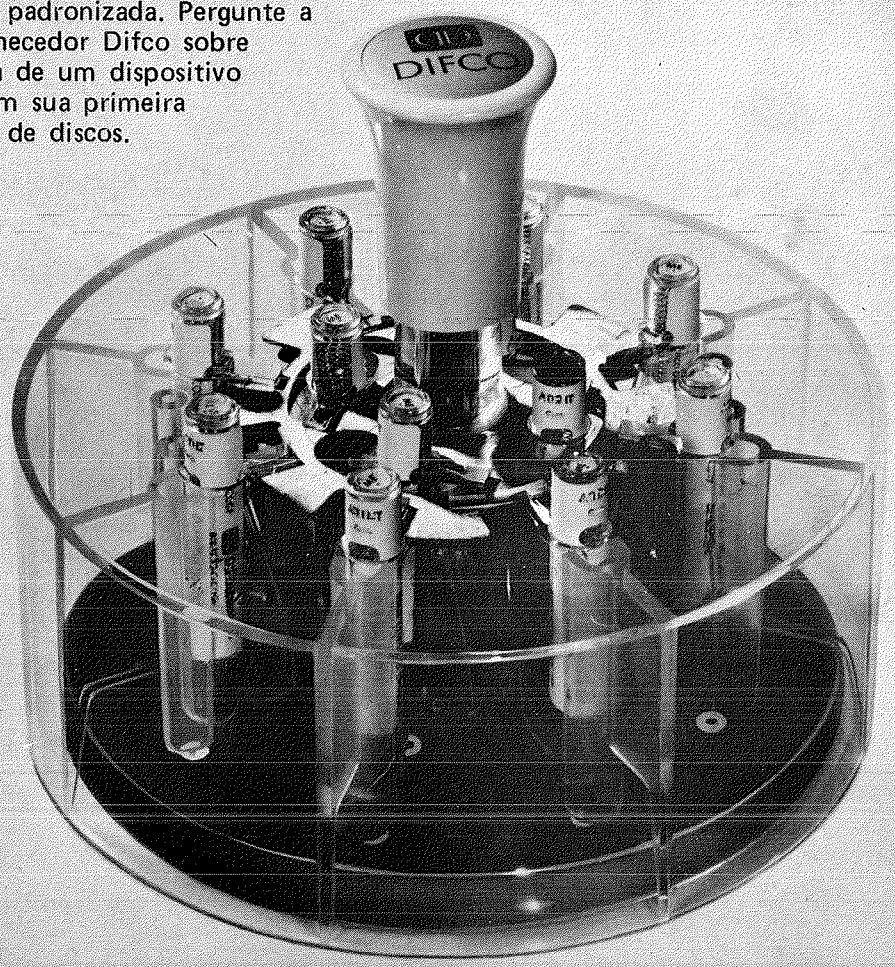
Rua Domingos de Moraes, 2423
FONE: 71.5459 e 71.8954
C.P. 12.839 CEP. 04035
SÃO PAULO - BRASIL

Por que nossos antibiogramas são os melhores?

O sistema *Dispens-O-Disc* da Difco oferece vantagens inigualáveis a seu laboratório para a realização de antibiogramas:

- discos em magazines individuais que funcionam como o próprio dispositivo e dispensam pinças ou adaptadores para utilização;
- coleção completa de discos e concentrações, inclusive Bactrim, Rifampicina e antimicrobianos mais recentes;
- dispositivos para 8 e 12 magazines, que permitem colocar os discos sobre a superfície do agar segundo posição padronizada. Pergunte a seu fornecedor Difco sobre a oferta de um dispositivo grátis em sua primeira compra de discos.

Se se preocupa com a qualidade de seus antibiogramas e valoriza seu tempo, não duvide — Difco lhe oferece o melhor sistema para antibiogramas e o processo mais econômico para seu laboratório.



INTERLAB

Imp. e Exp. de Artigos de Laboratórios Ltda.
Rua Luís Góes, 684 — Vila Mariana — São Paulo
Telefones — 276-8131 e 275-9308
Av. Senador Salgado Filho, 360 sala 94 — Porto Alegre RS
Telefone — 25-9262

DIFCO LABORATORIES
Detroit, Michigan 48232, USA