**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Metabólitos excretados na fermentação alcoólica como possíveis substratos
para o crescimento do gênero *Lactobacillus***

Mariane Soares Raposo

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2018**

Mariane Soares Raposo
Tecnóloga em Biocombustíveis

**Metabólitos excretados na fermentação alcoólica como possíveis substratos para o
crescimento do gênero *Lactobacillus***

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **LUIZ CARLOS BASSO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Raposo, Mariane Soares

Metabólitos excretados na fermentação alcoólica como possíveis substratos para o crescimento do gênero *Lactobacillus* / Mariane Soares Raposo. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2018.

99 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. *Lactobacillus* 2. Heterofermentativa 3. Homofermentativa 4. Metabólitos da fermentação 5. Fermentação alcoólica I. Título

**Dedico aos meus avós Onofre e Mafalda por construírem uma linda família sustentada
por muito amor.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe Arlete Soares pelo apoio, amor e por ser meu maior exemplo de força;

Ao meu pai Nilson Ferreira Raposo por sempre me apoiar em todas as decisões;

Aos meus irmãos Anderson, Maristela, Gabriel e minha cunhada Daniele pelo ombro amigo e pelos conselhos;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Carlos Basso, pela oportunidade e ensinamentos concedidos durante o desenvolvimento do trabalho;

Às amigas do laboratório e que levo para a vida, Renata, Camila, Carolina e Eliane pela ajuda, conselhos e por tornarem essa trajetória mais leve;

Ao técnico do laboratório e amigo Cometa pela amizade e por sempre estar à disposição para ajudar;

Ao Dr. Thiago Ollita Basso pela identificação das espécies e pelas análises de cromatografia;

Aos amigos que fiz em Piracicaba e que se tornaram como uma família para mim;

Ao programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola da ESALQ/USP;

À agência CAPES pela bolsa concedida durante o período do mestrado.

“Remember to look up at the stars and not down at your feet. Try to make sense of what you see and wonder about what makes the universe exist. Be curious. And however difficult life may seem, there is always something you can do and succeed at. It matters that you don't just give up.”

Stephen Hawking

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1. FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA INDUSTRIAL E A CONTAMINAÇÃO.....	11
2.2. <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	14
2.3. <i>LACTOBACILLUS SPP.</i>	18
2.4. INTERAÇÃO ENTRE <i>LACTOBACILLUS</i> E <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	23
3. HIPÓTESE.....	29
4. OBJETIVO.....	31
4.1. OBJETIVO GERAL	31
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
5. MATERIAL E MÉTODOS	33
5.1. LABORATÓRIO	33
5.2. MATERIAL BIOLÓGICO	33
5.3. REATIVAÇÃO DE LINHAGENS	34
5.4. IDENTIFICAÇÃO DE METABOLISMO.....	34
5.4.1. <i>CO₂</i>	34
5.4.2. <i>Manitol</i>	35
5.5. ENSAIO DE CRESCIMENTO EM MICROPLACA	35
5.6. ENSAIO DE CONSUMO DE METABÓLITOS.....	38
5.6.1. <i>Análise microbiológica</i>	39
5.6.2. <i>Análise de crescimento</i>	39
5.7. ANÁLISE DE METABÓLITOS	40
5.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
6.1. CLASSIFICAÇÃO DO METABOLISMO.....	41
6.2. ANÁLISE DE CRESCIMENTO	44
6.2.1. <i>Glicose e frutose</i>	44
6.2.2. <i>Glicerol, manitol, malato e piruvato</i>	48
6.2.2.1. Crescimento utilizando glicerol, manitol, malato e piruvato como única fonte	49
6.2.3. <i>Crescimento a partir da combinação entre glicerol, manitol, malato e piruvato</i>	52
6.2.4. <i>Influência de cada metabólito no crescimento com glicose e frutose</i>	59
6.2.5. <i>Influência da combinação de todos os metabólitos na presença de glicose e frutose</i>	66
6.2.6. <i>Influência da ausência seletiva dos metabólitos no crescimento</i>	71
6.3. ANÁLISE DE CONSUMO E PRODUÇÃO DE METABOLITOS	77
6.3.1. <i>Manitol e glicerol</i>	77
6.3.2. <i>Glicerol, manitol, malato e piruvato</i>	81
6.3.3. <i>Consumo de manitol e glicerol com aumento da concentração de açúcar</i>	84
7. CONCLUSÕES.....	89
REFERÊNCIAS.....	91

RESUMO

Metabólitos excretados na fermentação alcoólica como possíveis substratos para o crescimento do gênero *Lactobacillus*

As características do processo industrial brasileiro para a produção do bioetanol tornam as destilarias susceptíveis a presença de microrganismos contaminantes que ocasionam na queda de rendimento de produção. Dentre as etapas do processo, tem-se a fermentação alcoólica, que consiste na metabolização de açúcares pela cepa de levedura selecionada da espécie *Saccharomyces cerevisiae* produzindo o etanol. Nesta etapa ocorre a contaminação por leveduras do gênero *Saccharomyces*, leveduras não *Saccharomyces* e bactérias. As bactérias mais encontradas são as pertencentes ao grupo das bactérias lácticas (LAB), que por utilizarem diferentes vias para metabolizar os açúcares, são classificadas em heterofermentativa obrigatória, homofermentativa obrigatória e heterofermentativa facultativa. Entre os gêneros deste grupo, os *Lactobacillus* são os mais comuns devido à sua habilidade em tolerar altas concentrações de etanol e açúcares, altas temperaturas e baixo pH. As espécies *L. fermentum* e *L. plantarum* foram relatadas em diversos trabalhos como entre as espécies mais encontradas contaminando esse ambiente. Os *Lactobacillus* contaminantes estão em constante interação com a cepa de levedura que por consequência, tem sua eficiência fermentativa reduzida. Este trabalho teve por objetivo analisar os metabólitos produzidos durante a fermentação alcoólica industrial e que podem ser utilizados pelas bactérias contaminantes, obtendo assim, condições para serem competitivas e persistentes no processo. Para isso, foram utilizadas duas linhagens, isoladas de destilaria e identificadas como *L. fermentum* (I3a) com metabolismo heterofermentativo obrigatório e *L. plantarum* (I4a) com metabolismo heterofermentativo facultativo, apresentando nas condições estudadas um metabolismo homofermentativo. Ambas as linhagens foram submetidas ao crescimento na presença do glicerol, malato e piruvato, que são metabólitos produzidos e excretados pela levedura e o manitol produzido e excretado pela bactéria heterofermentativa obrigatória. Foi observado que o metabólito manitol é uma eficiente fonte de carbono para ambas as linhagens proporcionando crescimento mesmo sem a presença de açúcares. Além disso, a combinação entre glicose, frutose, manitol e malato foi capaz de aumentar o crescimento das linhagens. Já a presença do piruvato, apresentou estímulo de crescimento para a linhagem heterofermentativa. Em relação ao consumo, as linhagens foram capazes de metabolizar o manitol, malato e piruvato, entretanto, não apresentaram consumo do glicerol. Com isso, ambas as linhagens são beneficiadas pelo metabolismo da levedura e ainda a heterofermentativa é capaz de reabsorver o manitol quando os açúcares fermentescíveis são esgotados e de disponibilizar o metabólito para uso da homofermentativa.

Palavras-chave: *Lactobacillus*; Heterofermentativa; Homofermentativa; Metabólitos da fermentação; Fermentação alcoólica

ABSTRACT

Metabolites excreted in alcoholic fermentation as possible substrates for the growth of the genus *Lactobacillus*

The characteristics of the Brazilian industrial process to produce bioethanol make the distilleries susceptible to the presence of contaminating microorganisms that cause in the fall of production yield. Among the stages of the process, we have the alcoholic fermentation, which consists in the metabolization of sugars by the yeast strain selected from the *Saccharomyces cerevisiae* species producing the ethanol. At this stage contamination occurs by yeasts of the genus *Saccharomyces*, yeasts not *Saccharomyces* and bacteria. The most commonly found bacteria are those belonging to the group of lactic bacteria (LAB), which, because they use different routes to metabolize sugars, are classified as obligate heterofermentative, obligate homofermentative and facultative heterofermentative. Among the genera of this group, *Lactobacillus* are the most common because of their ability to tolerate high concentrations of ethanol and sugars, high temperatures and low pH. The species *L. fermentum* and *L. plantarum* have been reported in several studies as among the most frequent species contaminating this environment. *Lactobacillus* contaminants are in constant interaction with the yeast strain which consequently has its fermentative efficiency reduced. This work aimed to analyze the metabolites produced during industrial alcoholic fermentation and that can be used by the contaminating bacteria, thus obtaining conditions to be competitive and persistent in the process. For this, two strains were used, isolated from distillery and identified as *L. fermentum* (I3a) with obligate heterofermentative metabolism and *L. plantarum* (I4a) with facultative heterofermentative metabolism, presenting a homofermentative metabolism under the conditions studied. Both strains were submitted to growth in the presence of glycerol, malate and pyruvate, which are metabolites produced and excreted by yeast and mannitol produced and excreted by the obligate heterofermentative bacterium. It was observed that the metabolite mannitol is an efficient source of carbon for both strains providing growth even without the presence of sugars. In addition, the combination of glucose, fructose, mannitol and malate was able to increase strains growth. However, the presence of pyruvate presented growth stimulus for the heterofermentative strain. In relation to consumption, the strains were able to metabolize mannitol, malate and pyruvate, however, they did not present glycerol consumption. Thus, both strains are benefited by yeast metabolism and the heterofermentative can reabsorb mannitol when the fermentable sugars are depleted and to make the metabolite available for homofermentative use.

Keywords: *Lactobacillus*; Heterofermentative; Homofermentative; Fermentation metabolites; Alcoholic fermentation

1. INTRODUÇÃO

O bioetanol é um combustível renovável obtido a partir de matéria-prima vegetal, no qual, o Brasil é o segundo maior produtor mundial e o estado de São Paulo o maior produtor nacional (UNICA, 2018).

O processo industrial brasileiro é susceptível à presença de microrganismos contaminantes devido a fatores como, a qualidade da cana-de-açúcar (SOLOMON, 2009), o grande volume processado (BASSO et al., 2014), a não esterilização do substrato (mosto) (SILVA-FILHO et al., 2005) e ao reciclo celular da levedura ao final de cada fermentação (BASSO et al., 2008). Esses contaminantes estão presentes em todo o processo e são leveduras do gênero *Saccharomyces* (BASSO et al., 2008) e não *Saccharomyces*, fungos, arquea e bactérias (COSTA et al., 2015).

A fermentação alcoólica é a etapa do processo industrial em que ocorre a conversão de açúcares em álcool etílico pela cepa selecionada de levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (AMORIM et al., 2011). Além das leveduras, as bactérias contaminam a dorna de fermentação, sendo as produtoras de ácido lático as mais abundantes, destacando o gênero *Lactobacillus*, como o maior contaminante pertencente ao grupo das bactérias lácticas (LAB) (LUCENA et al., 2010). A presença desses microrganismos se dá pela habilidade de suportarem o ambiente fermentativo com baixo pH, além da habilidade de crescer rapidamente em altas concentrações de etanol e açúcar (LUCENA et al., 2010; NARENDRANATH et al., 1997).

As LAB podem ser divididas em três grupos em decorrência da via utilizada para metabolizar os açúcares. O primeiro grupo consiste nas bactérias homofermentativas obrigatórias em que o açúcar é convertido a ácido lático pela via Embden-Meyerhof (DELLIAS, 2014; KANDLER, 1983). Já o segundo grupo são das bactérias heterofermentativas obrigatórias que convertem o açúcar em ácido lático, ácido acético, etanol e CO₂ pela via fosfocetolase (DELLIAS, 2014; KANDLER, 1983). O terceiro grupo compreende as bactérias heterofermentativas facultativas que possuem metabolismo homofermentativo, contudo, em baixas concentrações de glicose, alteram o metabolismo para heterofermentativo (DELLIAS, 2014; KANDLER, 1983).

Durante a fermentação, os microrganismos contaminantes interagem de forma negativa com a cepa de levedura (BECKNER et al., 2011) em que as bactérias homo e heterofermentativas afetam de maneira distinta sua viabilidade e desempenho fermentativo (BASSO et al., 2014). Dentre os mecanismos envolvidos na interação, têm-se a produção

pelas LAB de ácidos orgânicos e outros metabólitos (BECKNER et al., 2011; REIS et al., 2018), competição por substrato (LEROI e PIDOUX, 1993) e nutrientes (BAYROCK e INGLEDEW, 2004). Além disso, as bactérias ocasionam a floculação celular da levedura em decorrência da presença da manose em sua parede celular, fazendo com que ocorra a aglutinação entre as células e biofilme bacteriano, afetando a eficiência fermentativa da levedura (PRETZER et al., 2005).

Basso e colaboradores (1997) relataram que a levedura também é capaz de competir com as bactérias contaminantes com a produção de álcool etílico e ácido succínico, que tornam o ambiente tóxico, comprometendo assim a viabilidade e crescimento das células bacterianas.

Em contraste do que ocorre na interação negativa, a levedura pode promover o crescimento das bactérias durante a fermentação, com a produção e excreção de fatores de crescimentos, como os aminoácidos (PONOMAROVA et al., 2017), além da quebra da sacarose com o uso da enzima invertase liberando glicose e frutose ao meio e que são açúcares fermentescíveis pelas bactérias (LEROI e PIDOUX, 1993).

A levedura excreta outros metabólitos durante a fermentação e que podem beneficiar as bactérias. Entre eles estão, o glicerol que consiste no subproduto produzido em maior quantidade pela levedura (LOPES et al., 2016), o ácido pirúvico produzido na glicólise (PRONK et al., 1996) e o malato produzido no citosol (YE et al., 2007).

Em consequência de colonizar um mesmo ambiente, ocorre também interação entre os contaminantes. Bactérias heterofermentativas obrigatórias produzem grande quantidade do metabólito D-manitol que pode ser metabolizado pelas bactérias homofermentativas, dessa forma, a bactéria hetero poderia cooperar com a homofermentativa durante o processo fermentativo (GARAI-IBABE et al., 2008; KANDLER, 1983).

Em decorrência dessas suposições, o presente trabalho teve como intuito verificar o crescimento e metabolismo de duas linhagens homo e heterofermentativa quando na presença de glicerol, manitol, malato e ácido pirúvico e a diferença de crescimento e metabolização quando com glicose e frutose. Dessa forma, se faz possível verificar se a cepa mantém a contaminação durante a fermentação e ainda, verificar se ocorre cooperação entre as bactérias com perfis hetero e homofermentativo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Fermentação alcoólica industrial e a contaminação

A fermentação alcoólica industrial para a produção do bioetanol consiste na conversão de açúcares presentes no mosto (substrato) no produto de interesse, o álcool etílico. O agente que realiza a fermentação é a levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (DE AMORIM et al., 2009) que será abordada em mais detalhes no Item 2.2. O mosto utilizado na indústria brasileira pode ser composto por caldo de cana-de-açúcar (ZABED et al., 2014) ou melaço, gerado na indústria de produção de açúcar. O caldo antes de ser destinado a fermentação passa pelas etapas de filtração, aquecimento, decantação e concentração de açúcar com o intuito de diminuir as impurezas e a população de microrganismos contaminantes. Já o melaço, precisa ser diluído com água para obtenção da concentração ideal de açúcares para a levedura (20-25%) (DE AMORIM et al., 2009).

Devido à deficiência de alguns nutrientes no caldo e a presença de inibidores no melaço, como o alumínio, por exemplo, algumas plantas industriais optam em utilizar proporções de caldo e melaço para compor o mosto, obtendo um substrato de maior qualidade para a levedura (DE AMORIM et al., 2009; DELLA-BIANCA et al., 2013).

O processo pode ser conduzido em batelada (Figura 1) ou de forma contínua, sendo em batelada empregado em 83% das indústrias devido a viabilidade econômica e eficiência (GODOY et al., 2008; LOPES et al., 2016). A fermentação nas destilarias tem duração de 6-10 horas, com concentração de 18-22% de açúcares redutores totais (ART) (DELLA-BIANCA et al., 2013), inóculo da cepa industrial de 8-17% v/v e temperatura variando de 33 a 35°C. Ao final do processo fermentativo, a concentração de álcool presente no vinho fermentado chega a valores de 8 a 11% v/v (WHEALS et al., 1999).

Figura 1. Processo de fermentação alcoólica industrial em batelada utilizado em 83% das indústrias brasileiras (LOPES et al., 2016).

O processo fermentativo no Brasil é conhecido como Melle-Boinot (BOINOT, 1941) que consiste no reciclo da biomassa de levedura (WHEALS et al., 1999) durante todo o período de produção, que se estende no decorrer da safra da cana (200-240 dias) (LOPES et al., 2016). Basicamente, ao final de cada fermentação, a biomassa é separada do vinho fermentado por centrifugação e encaminhada para tanques, onde será submetida ao tratamento com ácido sulfúrico em período de 1 a 2 horas para atingir pH de 2,0-2,5 (WHEALS et al., 1999). O tratamento ácido se faz importante, pois proporciona o decréscimo da população bacteriana em torno de 44,55% (GALLO, 1990), mantendo assim, a contaminação a níveis controlados (BECKNER et al., 2011; BONATELLI, 2016). Essa é uma das características que difere o processo industrial brasileiro dos outros países produtores do bioetanol, como os Estados Unidos, por exemplo (LOPES et al., 2016).

Diversos fatores ocasionam a entrada de microrganismos contaminantes no processo, dentre eles, a cana-de-açúcar, que se mostra um veículo para a entrada de microrganismos provenientes do solo e da própria planta, na qual quando em baixa qualidade, pode agravar ainda mais a contaminação.(DE SOUZA et al., 2016; SOLOMON, 2009). Além disso, o grande volume processado inviabiliza a esterilização do mosto, ocasionando assim, um

substrato a ser fermentado com alta carga microbiana (SILVA-FILHO et al., 2005). O reciclo celular da levedura também é um dos fatores que agravam a contaminação, pois no tratamento ácido somente uma parte das bactérias são eliminadas e as que não são, acabam inseridas novamente no processo. (BASSO et al., 2008; LOPES et al., 2016). Um fator preocupante para a indústria é a formação de biofilme bacteriano nas paredes de tubulações e equipamentos, formando assim um foco constante de contaminação no processo. (DELLIAS, 2014).

Estudos com o propósito de conhecer a ecologia microbiana de contaminantes do processo e da dorna de fermentação foram realizados e dentre os contaminantes identificados, estão, as leveduras pertencentes ou não ao gênero *Saccharomyces* (BASSO et al., 2008; BECKNER et al., 2011; COSTA et al., 2015; LUCENA et al., 2010) e bactérias (COSTA et al., 2015; DELLIAS, 2014; LUCENA et al., 2010). Dentre as bactérias contaminantes, o grupo das bactérias lácticas (LAB) é o mais comum durante a fermentação, dando destaque ao gênero *Lactobacillus* que é o mais resistente ao processo fermentativo (LUCENA et al., 2010; NARENDRANATH e POWER, 2005).

Além do tratamento ácido, algumas outras técnicas são empregadas pela indústria para controle das bactérias contaminantes. O emprego de antibióticos como a penicilina, tetraciclina, monensina, estreptomicina e virginiamicina têm sido a ação mais empregada pelas destilarias (MUTHAIYAN et al., 2011). Contudo, a venda do excedente de levedura para a produção de ração animal têm aumentado a preocupação quanto ao uso de antibióticos, que além de poder acarretar em bactérias resistentes (MUTHAIYAN et al., 2011) também ocasionam a contaminação do material, ficando impróprio para alimentação animal (LOPES et al., 2016).

O uso de peróxido de hidrogênio (MUTHAIYAN et al., 2011), dióxido de cloro (LOPES et al., 2016) e compostos naturais, como o lúpulo (LOPES et al., 2016; MUTHAIYAN et al., 2011), mostram-se alternativas eficazes, pois além de não deixar resíduos, apresentam eficiência na eliminação das bactérias (MUTHAIYA et al., 2011). Recentemente, observou-se que o emprego de bactérias benéficas para controle de contaminantes podem também ser uma alternativa interessante para controle de bactérias maléficas na fermentação (RICH et al., 2018).

2.2. *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo eucarioto pertencente ao filo *Ascomycota* com morfologia unicelular e sem filamentos (TORTORA et al., 2010). Sua reprodução pode se dar de forma assexuada, por meio de brotamento, ou sexuada, por meio de ascósporos (MADIGAN et al., 2016; STEWART, 2014). É anaeróbio facultativo, podendo crescer na presença e ausência de oxigênio (WIEBE et al., 2008) e tem seu crescimento favorecido em pH neutro ou ligeiramente ácido (PELCZAR et al., 1997; STEWART, 2014). Além disso, é capaz de crescer em ambientes com concentração alcoólica de 8-12% e sobreviver em concentrações de até 15%, podendo variar entre linhagens (STEWART, 2014).

Em anaerobiose, a espécie realiza a fermentação de hexoses para obtenção da molécula de ATP (Adenosina trifosfato) necessária para seu crescimento, manutenção e multiplicação (KRUCKEBERG e DICKINSON, 2004). Quando em meio contendo sacarose, realiza a quebra do dissacarídeo pela ação da enzima invertase obtendo mistura equimolar de glicose e frutose (KRUCKEBERG e DICKINSON, 2004; MARQUES et al., 2016). A hexose é oxidada na via glicolítica para a obtenção do piruvato que é fermentado a etanol e CO₂ (KRUCKEBERG e DICKINSON, 2004). Na Figura 2 é ilustrado o metabolismo da levedura durante a fermentação com os intermediários formados. Nesta figura o ciclo de Krebs é ilustrado como completo, contudo, na fermentação, o ciclo ocorre de forma incompleta no citoplasma produzindo apenas alguns intermediários, como o ácido málico.

celular, baixa formação de espuma e alta dominância e persistência no processo. (BASSO et al., 2008; DELLA-BIANCA et al., 2013).

Durante a fermentação, a levedura pode excretar, além do etanol, metabólitos como o glicerol, piruvato, o isômero L-malato, entre outros (LOPES et al., 2016; VAN DIJKEN e SCHEFFERS, 1986; WHITING, 1976). Quando o açúcar presente no meio é totalmente metabolizado, a levedura passa a expressar genes envolvidos na metabolização desses compostos para manter seu crescimento (KRUCKEBERG e DICKINSON, 2004; MERICO et al., 2011; MONOD, 1942; STRUCKO et al., 2018). A produção elevada de metabólitos e que resultam na sua excreção está ligada a altas concentrações de glicose no meio. Dessa maneira, a célula tende a acumular metabólitos, necessitando sua excreção (PACZIA et al., 2012).

O glicerol é o subproduto em maior proporção durante a fermentação e ocorre no desvio da glicólise, em que a dihidroxiacetona fosfato é reduzida a glicerol-3-fosfato que por sua vez é desfosforilado, resultando no glicerol (KRUCKEBERG e DICKINSON, 2004). Sua produção tem como finalidade manter o balanço redox da célula através da oxidação do excesso de NADH em NAD^+ (GUTIERREZ, 1997; PRONK et al., 1996; VAN DIJKEN e SCHEFFERS, 1986; ZHANG et al., 2013).

No início da fermentação alcoólica, a levedura necessita de ATP para seu crescimento, ocorrendo assim intensa atividade da via glicolítica, resultando na alta produção de NADH. Com o acúmulo de NADH, a atividade da enzima desidrogenase alcoólica é insuficiente em relação a atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Dessa forma, a regeneração do NAD será realizada pela atividade da glicerofosfato desidrogenase resultando no glicerol (GUTIERREZ, 1997; WANG et al., 2001; WHITING, 1976).

A produção de glicerol está inversamente relacionada a produção do etanol, ou seja, quanto mais glicerol a levedura produzir, menor será o rendimento fermentativo (YU et al. 2010). Isso se dá, devido ao desvio de açúcar, que pode variar de 5,5 a 8% (ALVES, 1994, 1997). Com isso, a baixa produção de glicerol está dentre as características buscadas pelos programas de seleção de novas cepas industriais. Basso e colaboradores (2008) ao comparar a produção de glicerol da linhagem selecionada PE-2 e da levedura de panificação, observou-se que a linhagem PE-2 produziu 3,38% enquanto a levedura de panificação resultou em 5,40% do metabólito.

Além do balanço redox, a produção de glicerol está ligada a proteção da célula em ambientes com estresse osmótico em que o acúmulo de glicerol no meio intracelular impede a

perda de água para o meio extracelular, mantendo assim o turgor da célula (MODIG et al., 2007; NEVOIGT e STAHL, 1997; YU et al., 2010).

Fatores como, aumento da concentração de açúcares (GUTIERREZ, 1991, 1997; MODIG et al., 2007) aumento do pH do meio, excreção ou desvio do piruvato para a produção de aminoácidos, produção de ácido acético e aumento da produção de ácido succínico estão relacionados ao excesso de NADH e consequentemente relacionado a produção do glicerol (ALVEZ, 1997; GUTIERREZ, 1991; GUTIERREZ, 1997; MODIG et al., 2007).

O ácido pirúvico, também excretado durante a fermentação, é considerado o metabólito central do metabolismo da levedura. Na rota fermentativa, o piruvato sofre a ação da enzima piruvato descarboxilase, sendo convertido a acetaldeído e CO_2 (KRUCKEBERG e DICKINSON, 2004). Pode ainda ser carboxilado a oxalacetato pela ação da enzima piruvato carboxilase biotina dependente (JITRAPAKDEE et al., 2008; WYATT et al., 2018) e também convertido em acetil-CoA pela atividade das enzimas do complexo piruvato desidrogenase (KRUCKEBERG e DICKINSON, 2004; PRONK et al., 1996).

Devido à grande produção de ácido pirúvico na glicólise, a enzima piruvato descarboxilase é insuficiente para a grande quantidade gerada do metabólito. Dessa forma, ocorre o acúmulo no meio intracelular e por consequência a diminuição do pH da célula, resultando na excreção ao meio extracelular (WHITING, 1976). Alvez (1997) observou que nos primeiros 20 minutos de fermentação inicia-se a excreção do piruvato que posteriormente é reabsorvido pela célula. O mesmo foi relatado por Trevelyan e Harrison (1954) que observaram o aumento da concentração de piruvato no meio enquanto a concentração de glicose diminuía, assim, quando a concentração de glicose apresentou-se muito baixa, notou-se o decréscimo de piruvato extracelular, evidenciando assim a reabsorção do metabólito após o esgotamento da fonte de carbono (TREVELYAN e HARRISON, 1954).

Dentre os fatores que contribuem para a sua produção, têm-se o aumento do pH, a queda da viabilidade celular e o aumento da temperatura (GUTIERREZ et al., 1990). A presença de fonte de nitrogênio no meio interfere no teor de piruvato excretado, pois ocorre desvio do metabólito para produção de aminoácidos (GUTIERREZ, 1997; WANG et al., 2002).

Para o isômero L-málico, a produção durante a fermentação pode variar entre 0,25 a 2g/L (ABBOTT et al., 2009; SCHWARTZ e RADLER, 1988; WHITING, 1976). O seu acúmulo no meio intracelular pode ser tóxico a célula, sendo então excretado, todavia, não se

tem conhecimento dos mecanismos que envolvem tal processo (CHI et al., 2016). No presente trabalho, para simplificar, o isômero L-malato será relatado somente como malato.

Segundo Fatichent et al. (1984), após excretado, o ácido málico é reabsorvido pela célula. Ao contrário, Schwartz e Radler (1988) relataram que, uma vez produzido o ácido não é metabolizado. Entretanto, Saayman e Viljoen-Bloom (2006) explica que ocorre a metabolização do ácido, porém em baixa intensidade devido a fatores como, falta de um sistema de transporte para o meio intracelular, ocorrendo assim a entrada por meio de difusão simples (CHI et al., 2016) e baixa afinidade da enzima málica, pelo fato de que a enzima é mitocondrial e não está presente no citosol (SCHWARTZ e RADLER, 1988).

Apesar de não se ter conhecimento sobre sua função biológica, quando em anaerobiose, o ácido málico é produzido e acumulado no citosol celular pela atividade da enzima piruvato carboxilase biotina dependente (SCHWARTZ e RADLER, 1988). A produção ocorre a partir da fixação de CO₂ pelo piruvato produzindo assim o oxalacetato, que por sua vez é reduzido a L-málico, dessa forma a ausência de CO₂ interfere na sua produção. (PINES et al., 1996; SCHWARTZ e RADLER, 1988; WHITING, 1976; YE et al., 2007). O fumarato e piruvato, precursores do metabólito, podem interferir na sua produção, contudo o oxalacetato, que também é precursor, não apresenta interferência direta (YÉRAMIAN et al., 2007). Outros fatores como, a presença de aspartato, glutamato e concentrações de glicose acima de 15% podem favorecer a produção do metabólito (SCHWARTZ e RADLER, 1988).

2.3. *Lactobacillus spp.*

Os *Lactobacillus* são bactérias Gram positivas, possuem morfologia de bacilos e são não formadoras de esporos (DE ANGELIS e GOBBETTI, 2016). Realizam a fosforilação a nível de substrato e são aeróbicos tolerantes, pois não apresentam sensibilidade ao oxigênio. O gênero faz parte do grupo das bactérias lácticas (LAB) por ter como produto principal do seu metabolismo o ácido láctico produzindo os isômeros L-lactato e/ou D-lactato pelas enzimas entereoespecíficas NAD-dependentes L-LDH e D-LDH (COSTA et al., 2008; MOZZI et al., 2010).

Obtém energia a partir da fermentação de açúcares e são organismos fastidiosos, necessitando da presença de aminoácidos, vitaminas, purinas e pirimidinas, ácidos graxos e sais (DE ANGELIS e GOBBETTI, 2016; MADIGAN et al., 2016). Por esse motivo são encontrados em ambientes ricos nutricionalmente, como em produtos lácticos, vegetais,

plantas, cereais e em produtos cárneos. Os *Lactobacillus* apresentam tolerância ao etanol (LUCENA et al., 2010), baixo pH e altas concentrações de açúcares (NARENDHRANATH e POWER, 2005), suportando assim o ambiente fermentativo. Por este motivo, são os principais contaminantes no processo de fermentação alcoólica (COSTA et al., 2015; DELLIAS, 2014; LUCENA et al., 2010).

Os *Lactobacillus* são classificados em 3 grupos em relação a rota utilizada para metabolizar hexoses. O primeiro grupo consiste nas bactérias homofermentativas obrigatórias que utilizam a via Embden-Meyerhoff (EMP) (Figura 3) (MOZZI et al., 2010).

Figura 3. Rota metabólica Embden-Meyerhoff (EMP) utilizada pelas bactérias homofermentativas obrigatórias para a metabolização de hexose, produzindo o ácido láctico (Adaptado de FUGELSANG e EDWARDS 2007; WISSELINK et al. 2002).

Nesta via, a cada 1 mol de hexose metabolizada, são produzidos 2 mols de ácido láctico pela enzima lactato desidrogenase (MOZZI et al., 2010) e 2 mols de ATP (JUTURU e WU, 2016). As bactérias deste grupo possuem genes para a produção da enzima aldolase

(JUTURU e WU, 2016) responsável pela quebra da frutose-1,6-bifosfato obtendo assim o gliceraldeído-3-fosfato e fosfato de dihidroxiacetona (KANG et al., 2013).

Quando em meio com hexose, as homofermentativas obrigatórias podem ainda produzir o isômero poliol D-manitol a partir da redução da frutose-6-fosfato em manitol-1-fosfato, catalisada pela enzima manitol-1-fosfato desidrogenase. Somente o isômero D-manitol é produzido, porém, para simplificar, neste trabalho o metabólito será relatado somente como manitol. O manitol-1-fosfato é então desfosforilado a manitol pela manitol fosfatase. Apesar de possuir os genes referentes as enzimas de produção do manitol, as homofermentativas não produzem grandes quantidades do metabólito, dessa forma, possivelmente, a sua produção se dá como via alternativa para regenerar NAD^+ (WISSELINK et al., 2002).

Ao contrário da produção, as bactérias pertencentes a esse grupo podem consumir com eficiência o manitol presente no substrato. A entrada para o citoplasma ocorre pelo transportador específico de manitol PTS, para então ocorrer a reação reversa da produção. Sendo assim, o manitol é fosforilado a manitol-1-fosfato pela manitol-1-fosfato desidrogenase obtendo a frutose-6-fosfato que entra na via glicolítica (WISSELINK et al., 2002).

Dentre as espécies que apresentam metabolismo homofermentativo obrigatório têm-se *L. acidophilus*, *L. amylophilus*, *L. delbruechii*, entre outras (STILES e HOLZAPFEL, 1997).

O segundo grupo é das bactérias heterofermentativas obrigatórias que fazem uso da via fosfocetolase (PKP) (Figura 4). As espécies pertencentes a esse grupo possuem genes que codificam a enzima D-xilose-5- fosfato fosfocetolase, responsável pela quebra da xilose-5-fosfato. Nesta via ocorre a metabolização de 1 mol de glicose dando origem a 1 mol de gliceraldeído-3-fosfato e 1 mol de acetil fosfato. A partir do gliceraldeído será produzido 1 mol de ácido lático enquanto o acetil fosfato dará origem a 1 mol de acetato ou a 1 mol de etanol, a depender do balanço oxirredução, e ainda 1 mol de ATP (MOZZI et al., 2010). Caso não ocorra a produção de etanol e sim de acetato, 1 mol de ATP adicional é produzido (WISSELINK et al., 2002). Além disso, nesta via tem-se a produção de 1 mol CO_2 pela ação da enzima gluconado-6-fosfato desidrogenase na conversão da hexose em pentose (MOZZI et al., 2010).

Figura 4. Rota metabólica fosfoacetolase (PKP) utilizada pelas bactérias heterofermentativas obrigatórias para a metabolização de hexose, produzindo ácido láctico, ácido acético, etanol e CO_2 (Adaptado de FUGELSANG e EDWARDS 2007; WISSELINK et al. 2002;).

Quando em anaerobiose, as heterofermentativas são capazes de utilizar a frutose como receptor de elétrons (WISSELINK et al., 2002). A frutose é reduzida a manitol pela enzima manitol desidrogenase (MDH) que requer NADH ou NADPH como cofatores (ORTIZ et al., 2017), podendo também ocorrer a reação reversa (WISSELINK et al., 2002). As espécies pertencentes a esse grupo são grandes produtoras do composto, em que a cada 1 mol de glicose fermentada 2 mols de frutose são reduzidos para a produção e excreção de manitol, em contraste do que ocorre nas homofermentativas que produzem pequenas quantidades do composto que ficam no meio intracelular (WISSELINK et al., 2002).

Dentre as espécies pertencentes a esse grupo, tem-se *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. reuteri*, entre outros (STILES e HOLZAPFEL, 1997).

O terceiro grupo, são das heterofermentativas facultativas. As bactérias pertencentes a esse grupo possuem metabolismo homofermentativo, contudo, em ambientes com baixa concentração de glicose, altera seu metabolismo para heterofermentativo (DE ANGELIS e

GOBBETTI, 2016). Com isso, ocorre a produção de CO₂, acetato ou etanol, além do ácido láctico (AXELSSON, 2004; KANDLER, 1983; MOZZI et al., 2010). Para a produção de acetato a partir do piruvato em anaerobiose poderá ser catalisada pela piruvato formato liase (PFL), fosfotransacetilase (PTA) e pela acetato quinase (ACK) (MAYO, 2010).

As espécies deste grupo foram também relatadas como capazes de metabolizar D-manitol em anerobiose. A espécie *L. plantarum* mostrou-se capaz de utilizar o metabólito como fonte de carbono na presença de receptores de elétrons como o ácido málico, ácido pirúvico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido oxalacetato, entre outros (MCFEETERS e CHEN, 1986).

Dentre as espécies pertencentes a esse grupo estão, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. bifementans*, entre outros (STILES e HOLZAPFEL, 1997).

Os *Lactobacillus* também são capazes de assimilar outros metabólitos presentes no substrato, além das hexoses e do isômero D-manitol. Espécies pertencentes ao grupo das heterofermentativas obrigatórias foram relatadas como capazes de metabolizar o glicerol quando na presença de hexose. O glicerol, que também consiste em um poliol, pode ser tanto reduzido quanto oxidado. Na via reductiva, o metabólito é convertido a 3-hidroxi propionaldeído (3-HPA) pela ação da coenzima glicerol B₁₂-dependente e diol desidratase. O 3-HPA poderá ser reduzido a 1,3-propanediol (1,3-PDL) pela NADH 1,3-propanediol desidrogenase, ou então oxidado a 3- ácido hidroxi propionico (3-HP) (GARAI-IBABE et al., 2008).

Garai-Ibabe e colaboradores (2008) ao analisarem amostras de cidra com a presença da espécie heterofermentativa obrigatória *L. collinoides*, observaram que quando ocorreu a metabolização do glicerol pela bactéria, a presença de 3-HPA possivelmente afetou a viabilidade celular, mostrando ser possivelmente tóxico para a linhagem.

Já na via oxidativa, o glicerol pode ser convertido a dihidroxiacetona fosfato (DHAP) e então entrar na via glicolítica. Nesta via, o glicerol é assimilado pela ação das enzimas glicerol desidrogenase e dihidroxiacetona quinase (GARAI-IBABE et al., 2008).

O L-málico também pode ser assimilado pelos *Lactobacillus* que possuem os genes responsáveis pela enzima malolática. Foi encontrada na espécie *Lactobacillus plantarum*, a enzima malolática dependente de NAD e manganês, que catalisa a reação assimilando o L-málico em ácido láctico e CO₂ (CASPRITZ e RADLER, 1983; MCFEETERS e CHEN, 1986). Por apresentar essa capacidade, o *Lactobacillus plantarum* são empregados na produção de vinho para realizarem a fermentação malolática (LÓPEZ et al., 2008), com o intuito de

reduzir a acidez da bebida (SUMBY et al., 2014). O malato pode também ser assimilado pela enzima NAD^+ málico dependente que catalisa a descarboxilação do malato em piruvato e CO_2 . Assim, o piruvato poderá ser convertido a acetato, etanol, CO_2 e ATP (AXELSSON, 2004).

O ácido málico também pode ser convertido a ácido succínico. Isso ocorre a partir da ação da enzima fumarase, que produz o fumarato que por sua vez será reduzido pela fumarato redutase produzindo o ácido succínico (CORSETTI et al., 2016). Isso foi observado por Mcfeeters e Chen (1986) ao analisar a espécie *L. plantarum* utilizando o L-málico como receptor de elétrons.

As bactérias lácticas também metabolizam o ácido pirúvico presente no substrato como fonte de carbono e/ou receptor de elétrons. Durante seu metabolismo para a produção de ATP, ocorre a formação de NADH a partir do NAD^+ , que necessitará ser regenerado para que a bactéria possa continuar com a fermentação. Dessa forma, ela faz uso do piruvato como receptor de elétrons (AXELSSON, 2004) reduzindo a ácido láctico (MCFEETERS e CHEN, 1986; WAGNER et al., 2005).

Contudo, ao crescer em altas concentrações de piruvato, as bactérias podem realizar a fermentação do metabólito produzindo além do ácido láctico, ácido acético e CO_2 . Isso foi relatado em bactérias lácticas heterofermentativas das espécies *Oenococcus oeni* e *Leuconostoc mesenteroides* que apresentaram crescimento a partir da fermentação do composto. Para isso, o piruvato é descarboxilado pela piruvato desidrogenase em acetil CoA, que por sua vez é convertida a acetato produzindo 1 mol de ATP (WAGNER et al., 2005).

2.4. Interação entre *Lactobacillus* e *Saccharomyces cerevisiae*

A interação entre microrganismos é de extrema importância para o estabelecimento e manutenção da população microbiana em que a transferência de moléculas e alterações genéticas são mecanismos que modulam as relações (BRAGA et al., 2016).

O gênero *Lactobacillus* tem sido muito estudado quando em interação com a cepa de levedura industrial no ambiente fermentativo (BASSO et al., 2014; BECKNER et al., 2011; DELLIAS, 2014; NARENDRANATH et al., 1997; NARENDRANATH et al., 2001; VITAL, 2013). Dessa forma foi possível identificar que neste ambiente ocorre intensa competição entre os microrganismos presentes na dorna de fermentação.

A presença das bactérias contaminantes na dorna afeta o desempenho da cepa de levedura durante a fermentação industrial (BECKNER et al., 2011; CHANG et al., 1995;

JOUHTEN et al., 2016; NARENDRANATH et al., 1997; REIS et al., 2018). Dentre os fatores estão, a produção de ácido láctico e acético que diminuem o pH do meio e ainda, quando na forma não dissociada, os ácidos orgânicos difundem pela membrana celular ao meio intracelular, acidificando o citoplasma com a liberação de íons H^+ (BASSO et al., 2014; BECKNER et al., 2011; NARENDRANATH et al., 2001; REIS et al., 2018; THOMAS et al., 2001). Outros metabólitos excretados pelas bactérias foram mencionados como potencialmente inibidores para a levedura, como o diacetil, reuterina e ácidos graxos (BECKNER et al., 2011).

A competição pelos açúcares entre os microrganismos também este entre os fatores que ocasionam a queda do rendimento fermentativo. A levedura realiza a quebra da sacarose disponibilizando no meio glicose e frutose, ambos fermentescíveis pelas bactérias contaminantes, como os *Lactobacillus* (LEROI e PIDOUX, 1993). O consumo interfere diretamente na produção do bioetanol, visto que ocorre o desvio de carbono para a produção de ácidos orgânicos e para sustentar o crescimento da bactéria (BASSO et al., 2014; LEROI e PIDOUX, 1993; VITAL, 2013). Além da competição pelo substrato, ocorre a competição pelos nutrientes presentes no mosto, comprometendo a performance fermentativa da levedura (BAYROCK e INGLEDEW, 2004; BECKNER et al., 2011).

As bactérias ocasionam a floculação celular da levedura e a sua aglutinação em biofilme bacteriano em decorrência da presença da manose na parede celular bacteriana. (CARVALHO-NETTO et al., 2015; DELLIAS, 2014; PRETZER et al., 2005). A floculação diminui a superfície de contato da célula com o substrato, fazendo com que ocorra a lentidão da fermentação e por consequência altas concentrações de açúcar residual (BASSO et al., 2008; LOPES et al., 2016).

Durante a competição na dorna de fermentação, a levedura também é capaz de inibir o crescimento bacteriano. Basso e colaboradores (1997) relataram que a levedura produz álcool etílico e ácido succínico que juntos tornam o ambiente tóxico para as bactérias, acarretando na queda da viabilidade celular e ainda prejudicando seu crescimento.

Quando contaminando a dorna de fermentação, os *Lactobacillus* com metabolismo homofermentativo obrigatório, heterofermentativo obrigatório e heterofermentativo facultativo apresentam comportamentos diferentes por consequência interação de maneiras diferentes com a levedura (BASSO et al., 2014; VITAL, 2013).

Basso e colaboradores (2014) verificaram, ao simular a fermentação industrial, que a espécie *L. fermentum* pertencente ao grupo das heterofermentativas obrigatórias, mostraram

ser mais danosas para a cepa de levedura industrial se comparado com a espécie *L. plantarum*, que é classificada como heterofermentativa facultativa, contudo, quando em ambiente fermentativo apresenta metabolismo homofermentativo. Dentre os efeitos negativos causados na fermentação pela heterofermentativa estão a baixa produção de etanol e aumento da produção de glicerol.

Resultado semelhante foi observado por Vital (2013) que relatou a heterofermentativa como a que mais interferiu nos parâmetros fermentativos e ainda apresentou maior crescimento durante a fermentação, se comparado com a homofermentativa. Possivelmente, isso pode ter ocorrido devido ao fato de que as bactérias heterofermentativas dão preferência a frutose e não a glicose como as homofermentativas e a *S. cerevisiae*, sendo então favorecida no processo (BASSO et al., 2014; VITAL, 2013).

Todavia, isso não foi observado em amostras da fermentação industrial, que apresentaram proporções entre homo e heterofermentativas semelhantes. Dessa forma, a autora concluiu que possivelmente, no ambiente industrial, a heterofermentativa não apresenta favorecimento devido ao complexo ambiente da dorna de fermentação e ainda pela competição por nutrientes e açúcares a que é imposta (VITAL, 2013).

Apesar das observações demonstrando a interferência dos *Lactobacillus* no desempenho da cepa industrial, todos os fatores que levam a esses efeitos não foram totalmente elucidados. Mesmo sabendo que as bactérias podem interferir com a produção de metabólitos e pela competição por nutrientes (BAYROCK e INGLEDEW, 2004; NARENDRANATH et al., 1997), somente esses fatores não são suficientes para explicar os danos causados a levedura e ao desempenho fermentativo (BECKNER et al., 2011).

No ambiente fermentativo, não ocorre somente interações negativas entre os microrganismos, mas também podem ocorrer o beneficiamento dos contaminantes pela cepa de levedura. Como já mencionado no Item 2.2 a levedura pode excretar diversos metabólitos que ficam disponíveis no substrato, tornando o ambiente favorável ao crescimento das bactérias. Um exemplo é o que ocorre na fermentação alcoólica para a produção de vinho, em que na primeira fase do processo ocorre a fermentação alcoólica pela levedura e na segunda é realizada a fermentação malolática pelas LAB. Após a fermentação da levedura, o meio fica rico devido aos nutrientes, aminoácidos, peptídeos e outros metabólitos excretados ao meio durante o metabolismo e pela lise celular. Dessa forma, a bactéria encontra um ambiente propício para seu crescimento e dessa forma é capaz de realizar a fermentação malolática. (LONVAUD-FUNEL, 2015).

Estudo recente relatou que a levedura quando em cocultivo com a espécie *L. plantarum* produziu e excretou os aminoácidos treonina, glutamina, alanina, glutamato, serina e glicina (PONOMAROVA et al., 2017). Todavia, os mesmos autores observaram ao suplementar o meio com esses mesmos aminoácidos, foi observado que não houve estímulo de crescimento da espécie *L. plantarum*, sendo assim, possivelmente, outros metabólitos excretados também pela levedura poderiam estar agindo sinergisticamente estimulando o crescimento das bactérias (PONOMAROVA et al., 2017). Dessa forma, é possível concluir que as leveduras cooperam com as bactérias mantendo-as no processo (Campbell et al., 2015).

Gomes (2009), ao analisar os efeitos de bactérias homo e heterofermentativas na fermentação alcoólica, observou diferenças na concentração de glicerol ao final da fermentação. A autora relata que quando a levedura estava na presença da bactéria homofermentativa, o meio apresentou baixa concentração de glicerol. Dessa forma, possivelmente, a homofermentativa teria metabolizado o glicerol excretado. Resultado contrário foi observado quando a levedura estava em cultura pura, onde a concentração do glicerol foi superior, ou quando estava na presença da heterofermentativa, que estimulou a produção do metabólito. Yabarrena (2012) teve o mesmo resultado e ainda relatou que se faz necessário mais estudos para verificar se a bactéria homofermentativa consome ou inibe a produção de glicerol pela levedura.

A metabolização do glicerol pelos gêneros pertencente ao grupo das LAB é também relatada na produção de vinho. As bactérias são capazes de metabolizar o glicerol presente no meio e que acaba ocasionando o amargor da bebida, devido a excreção dos metabólitos resultantes. (LONVAUD-FUNEL, 2015). Levando em consideração o que ocorre na produção do vinho, possivelmente, as bactérias lácticas estariam também consumindo glicerol e ácido málico durante a fermentação alcoólica para a produção do bioetanol.

Apesar da literatura relatar a assimilação do glicerol pelos *Lactobacillus*, se faz necessário analisar as linhagens isoladas da indústria de bioetanol em condições próximas do que ocorre na dorna, pois segundo Lonvaud-Funel (2015) a linhagem e o ambiente podem interferir no consumo dos compostos.

A cooperação pode estar ocorrendo também entre as bactérias com perfis metabólicos distintos. Pelo fato de que as heterofermentativas produzem o manitol e as homofermentativas podem consumir, possivelmente a interação pode estar ocorrendo entre as bactérias. Esse fato foi observado por Yabarrena (2012), que ao analisar o metabólito presente no meio quando a levedura estava na presença da bactéria homofermentativa, observou que ocorreu decréscimo

do manitol, se comparado quando a levedura estava em cultura pura. Além disso, ao analisar a fermentação com o cocultivo entre homo e heterofermentativa, foi observado que a presença do manitol foi menor do que no tratamento somente com heterofermentativa, evidenciando o consumo pela homofermentativa.

Entretanto, pelo fato de que a fermentação não ocorre na presença de oxigênio, as bactérias necessitam de metabólitos que possam ser utilizados como receptores de elétrons, para metabolizar o manitol (MCFEETERS e CHEN, 1986). Para isso, possivelmente fazem uso de outros metabólitos presentes no meio, como o glicerol, ácido málico e ácido pirúvico evidenciando assim que o substrato durante a fermentação pode estimular e manter o crescimento da bactéria (MCFEETERS e CHEN, 1986).

Leroi e Pidoux (1993) ao analisarem a espécie *Lactobacillus hilgardii* em cocultivo com *Saccharomyces florentinus* observou que a bactéria teve o crescimento estimulado pelo CO₂, piruvato, propionato, acetato e succinato. No entanto os autores relatam que a bactéria teve o crescimento inibido em decorrência de outros metabólitos produzidos pela levedura.

Levando em consideração a essas evidências é de se suspeitar que os metabólitos excretados pela levedura, possam estar sustentando as bactérias, frente ao ambiente competitivo a que são impostas na dorna de fermentação. Com isso, se faz interessante o estudo de linhagens de contaminantes isoladas do processo industrial quando na presença desses metabólitos isoladamente.

3. HIPÓTESE

Durante a fermentação alcoólica as bactérias contaminantes do gênero *Lactobacillus* com metabolismo homo e heterofermentativo tem seu crescimento beneficiado devido a presença de glicerol, ácido málico e ácido pirúvico que são produzidos e excretados pela cepa de levedura industrial da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Além disso, a bactéria heterofermentativa, ao excretar o manitol, contribui com o crescimento da homofermentativa, que pode utilizar o metabólito quando na falta de açúcares fermentescíveis.

4. OBJETIVO

4.1. Objetivo geral

Avaliar o crescimento de contaminantes da fermentação alcoólica do gênero *Lactobacillus* com metabolismo homo e heterofermentativo quando na presença de glicerol, manitol, ácido málico e ácido pirúvico.

4.2. Objetivos específicos

Verificar a eficiência do teste de fermentação em tubo de Durhan para classificação do gênero *Lactobacillus* quanto ao seu metabolismo;

Analisar o crescimento de linhagem da espécie *Lactobacillus fermentum* (heterofermentativa) e *Lactobacillus plantarum* (homofermentativa) na presença de glicose e frutose.

Averiguar o crescimento da espécie *L. fermentum* e *L. plantarum* quando na presença de glicerol, manitol, e piruvato;

Investigar o consumo do glicerol, manitol, ácido málico e ácido pirúvico pela espécie *L. fermentum* e *L. plantarum*;

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Laboratório

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bioquímica e Tecnologia de Leveduras do Departamento de Ciências Biológicas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ, USP, Piracicaba – SP.

5.2. Material biológico

Foram utilizadas a princípio 9 linhagens do gênero *Lactobacillus* denominadas como I1, I2, I3, I4, I5, I6, I7, I8 e I9 pertencentes a coleção permanente do Laboratório de Bioquímica e Tecnologia de Leveduras do Departamento de Ciências Biológicas – ESALQ/USP. As linhagens foram isoladas de destilaria do Estado de São Paulo e preservadas em glicerol com concentração final de 20% em ultrafreezer à -80°C. A classificação do metabolismo dos isolados foi realizada por Vital (2013) a partir da produção de manitol. Entretanto, neste presente trabalho, ao analisar as linhagens quanto à produção do metabólito, não foram obtidos os mesmos resultados.

Com a possibilidade de ter ocorrido alguma contaminação, as linhagens foram plaqueadas por espalhamento com alça de Drigalski em meio seletivo para *Lactobacillus* De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Peptona 1%; Extrato de Carne 1%; Extrato de Levedura 0,5%; Dextrose 2%; Acetato de Sódio 0,5%; Polisorbato 80 0,1%; Fosfato de Potássio 0,2%; Citrato de Amônio 0,2%; Sulfato de Magnésio 0,01%; Sulfato de Manganês 0,005%) (De Man et al., 1960) acrescido de ágar 2%. As placas foram incubadas em câmara incubadora B.O.D. a 32°C durante 48 horas, em que após o crescimento, foram resgatadas aleatoriamente 3 colônias isoladas com o auxílio de palito de madeira esterilizado, obtendo assim 3 isolados de cada linhagem diferenciadas como a, b e c. O material resgatado foi inoculado em meio MRS líquido em microtubo, que após agitação em vortex, para homogeneização, foi submetido a incubação durante 24 horas a 32°C.

Para cada colônia resgatada foi realizada a repicagem para obtenção de cópias a serem utilizadas no trabalho e para fazer parte da coleção do laboratório. As cópias foram feitas com um inóculo de 100 µL em 600µL de MRS líquido e submetidas a incubação durante 24 horas a 32°C. Após esse período foi adicionado 30 µL de glicerol com concentração final de 20% e as cópias preservadas em ultrafreezer a -80°C.

Para identificação à nível de espécie, as cópias foram analisadas pela Technical University of Denmark, Novo Nordisk Foundation Center for Biosustainability, localizada em Lyngby, Dinamarca. Para isso, foi realizada a amplificação da região da phenylalanyl-tRNA synthase alpha subunit via PCR e sequenciamento pelo método de Sanger a partir dos amplicons.

A partir dos resultados foi selecionada a linhagem I3a identificada como *Lactobacillus fermentum* para estudo do metabolismo heterofermentativo e a linhagem I4a da espécie *Lactobacillus plantarum* para estudo do metabolismo homofermentativo.

5.3. Reativação de linhagens

Para reativação de linhagens preservadas foram utilizados 100 µL de cada linhagem preservada em glicerol em 900 µL de meio MRS líquido esterilizado em microtubo. Após agitação em agitador de tubos vortex, cada linhagem foi submetida a incubação de 24 horas durante 32°C.

5.4. Identificação de metabolismo

As linhagens I3a e I4a foram selecionadas a princípio pela identificação da espécie e a partir das informações obtidas na literatura sobre metabolismo. Contudo, para confirmar se as linhagens a serem utilizadas possuem o perfil metabólico conforme a literatura, foi realizada a análise de produção CO₂ e manitol.

5.4.1. CO₂

Foi utilizado o meio MBL líquido (Extrato de Levedura 0,5 %; Peptona Bacteriana 0,25%; Triptona 0,25% Frutose 1%; Glicose 1%; K₂HPO₄ 0,2%; MgSO₄. 7H₂O 0,02%; MnSO₂.H₂O 0,001%) com pH 6,0 ajustado com ácido clorídrico a 1N. O experimento foi conduzido em tubos de vidro com tampa de rosca. Em cada tubo foram adicionados 2,8 ml de MBL esterilizado e um tubo Durhan de vidro depositado de modo invertido. Para o teste, se fez importante que no interior do tubo de Durhan não apresentasse bolhas de ar que pudessem dificultar a análise do resultado. Para cada linhagem, o teste foi realizado em triplicata, em que para cada repetição utilizou-se um inóculo de 100 µL de linhagem reativada (Item 5.3).

Sem agitação, os tubos foram incubados durante 24 horas a 32°C e após esse período foi analisado a presença ou ausência de CO₂. Após análise dos resultados, o tubo de rosca foi submetido a agitação em vortex para homogeneização e então uma alíquota de 1 ml foi retirada e congelada para futura análise de manitol. O experimento foi conduzido em triplicata.

5.4.2. Manitol

As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e submetidas a centrifugação durante 15 minutos em 5.000 rpm em centrífuga de microtubo. O sobrenadante foi separado da biomassa e submetido a análise em cromatografia líquida (HPLC), com coluna de exclusão iônica Aminex HPX-87H BioRad (Hercule, CA, USA). Para a fase móvel foi utilizado H₂SO₄ (5mM) com vazão de 0,6 mL/min e detector de índice de refração CG 410 (Instrumentos Científicos C.G. LTDAM São Paulo, Brasil).

5.5. Ensaio de crescimento em microplaca

Utilizou-se de meio mínimo (M.M.) (Extrato de Levedura 1,0 %; Peptona Bacteriana 0,5%; Triptona 0,5; K₂HPO₄ 0,2%; MgSO₄ · 7H₂O 0,02%; MnSO₂·H₂O 0,001%) que consiste em um meio sem a adição de fonte de carbono para que fosse possível verificar o crescimento mínimo da bactéria sem os metabólitos a serem estudados.

Em microplaca de poliestireno com 96 poços foi utilizado um volume total de 170 µL, sendo 60 µL de meio M.M, 10 µL de glicose, 10 µL de frutose, 20 µL de cada metabólito (glicerol, manitol, malato e piruvato) e 10 µL de inóculo de linhagem reativada (Item 5.3). Dependendo da quantidade de metabólitos estudados, o volume de 170 µL foi completado com água deionizada esterilizada. O pH dos meios foi ajustado para 6,0 com ácido clorídrico a 1N e hidróxido de sódio a 1M, conforme necessário.

Foram utilizadas 3 microplacas no total, contendo as combinações de meios (tratamentos) e concentrações a serem estudadas para ambas as linhagens em triplicata. Além disso, em todas as microplacas o tratamento 1 sempre foi utilizado para crescimento das linhagens somente na presença do meio mínimo (M.M.).

Para a primeira microplaca (Tabela 1), foi utilizada a concentração final de glicose 0,5%, frutose 0,5%, glicose 1,0% e glicose 0,5% + frutose 0,5%, totalizando 4 tratamentos.

Tabela 1. Tratamentos utilizados com as seguintes concentrações: glicose 0,5 %, frutose 0,5 %, glicose 1,0% e glicose 0,5% + frutose 0,5%.

Meio	Tratamentos
1	M.M.
2	M.M. + Glicose
3	M.M. + Frutose
4*	M.M. + Glicose
5	M.M. + Glicose + Frutose

*Glicose 1,0%

Para a segunda microplaca (Tabela 2), utilizou-se glicose 0,25%, frutose 0,25%, glicerol 0,1%, manitol 0,1%, malato 0,1% e piruvato 0,1%, totalizando 15 tratamentos.

Tabela 2. Tratamentos utilizados com as seguintes concentrações: Glicose 0,25 %, frutose 0,25 %, glicerol 0,1%, manitol 0,1%, malato 0,1% e piruvato 0,1%.

Meio	Tratamentos
1	M.M.
2	M.M. + Glicose
3	M.M. + Glicose + Frutose
4	M.M. + Glicose + Frutose + Glicerol
5	M.M. + Glicose + Frutose + Manitol
6	M.M. + Glicose + Frutose + Malato
7	M.M. + Glicose + Frutose + Piruvato
8	M.M. + Glicose + Frutose + Glicerol + Manitol + Malato + Piruvato
9	M.M. + Glicose + Frutose + Manitol + Malato + Piruvato
10	M.M. + Glicose + Frutose + Glicerol + Malato + Piruvato
11	M.M. + Glicose + Frutose + Glicose + Manitol + Piruvato
12	M.M. + Glicose + Frutose + Glicerol + Manitol + Malato
13	M.M. + Glicerol
14	M.M. + Manitol
15	M.M. + Malato
16	M.M. + Piruvato

Para a terceira microplaca (Tabela 3) foi utilizada glicose 1,0%, glicerol 0,5%, manitol 0,5%, malato 0,5% e piruvato 0,5%, totalizando 7 tratamentos.

Tabela 3. Tratamentos utilizados com as seguintes concentrações: Glicose 1,0 %, glicerol 0,5%, manitol 0,5%, malato 0,5% e piruvato 0,5%.

Tratamentos	Microplaca
1	M.M.
2	M.M.+ Glicose
3	M.M. + Glicerol + Manitol
4	M.M. + Glicerol + Malato
5	M.M. + Glicerol + Piruvato
6	M.M. + Manitol + Malato
7	M.M. + Manitol + Piruvato
8	M.M. + Malato + Piruvato

Para a leitura de absorbância, utilizou-se o leitor multifuncional de microplacas (Tecan, modelo Infinite M200) com densidade óptica de 600 nm em temperatura de 30°C. As leituras foram realizadas em intervalos de 2 horas durante 24 horas, em que antes de cada leitura as placas foram submetidas à agitação de 5 minutos. Foi realizada uma leitura logo após a inoculação das linhagens para a obtenção da absorbância no tempo 0. Dos resultados obtidos foram subtraídos os valores de absorbância em 0 hora e no crescimento obtido no M.M. para a obtenção do crescimento promovido somente pelos metabólitos estudados.

5.6. Ensaio de consumo de metabólitos

Utilizou-se o meio M.M. (Item 5.5) com a adição dos metabólitos conforme os tratamentos analisados. No primeiro experimento, realizou-se o crescimento com glicose 0,25% + frutose 0,25% + glicerol 0,01%. Para o segundo experimento, foram utilizados glicose 0,25% + frutose 0,25% + glicerol 0,1% + manitol 0,1% + malato 0,03% + piruvato 0,03%. Por fim, no terceiro experimento utilizou-se glicose 1,0% + frutose 1,0% + 0,3% de glicerol + 0,3% de manitol. Foi analisada cada linhagem reativada em triplicata com crescimento em cultura pura e em cocultivo.

As etapas descritas a seguir foram realizadas para os três ensaios:

Utilizou-se 6 mL do meio líquido esterilizado em tubo de vidro com tampa de rosca e inóculo com concentração final de 10^6 células/mL. A concentração celular do inóculo de

ambas as linhagens reativadas foi determinada conforme descrito no item 5.7.2 para posterior diluição para atingir a concentração final desejada para inóculo. Após inoculação, os tubos foram submetidos a incubação de 24 horas a 32°C em B.O.D.

Para a cultura pura foram inoculados 100 µL da linhagem reativada e para o cocultivo utilizou-se 50 µL com o propósito de obter um inóculo com metade da concentração celular de ambas as linhagens.

Foi retirada uma alíquota de 1 ml de cada amostra nos tempos 12h e 24h que foram armazenadas em microtubo em congelador para análises descritas no item 5.7.3. Além disso, uma alíquota de 100 µL foi retirada nos tempos 0h, 6h, 12h e 24h para análise descrita no item 5.7.2.

5.6.1. Análise microbiológica

As análises microbiológicas foram realizadas em amostras das linhagens reativadas para determinar o inóculo e após 12 e 24 horas de incubação, obtendo assim a concentração de células vivas (cel/ml).

As amostras foram analisadas em lâmina de vidro, em microscópio óptico com fator de 17070,5 e objetiva de 100x. Utilizou-se o corante composto de 0,2% Azul de metileno e 2% de Sulfato Azul de Nilo para diferenciar células viáveis e inviáveis, contando assim somente as células viáveis. Para cada lâmina foram utilizados 0,03 µL da amostra com diluição de 2:1 em corante. A contagem das células não coradas (vivas) foi realizada em 5 campos de observação em cada lâmina. A concentração celular foi obtida segundo fórmula abaixo:

$$\text{Células/ml: FM} \times (1 \div \text{volume da amostra}) \times \text{volume amostra} \times M \times D.$$

Onde: FM: Fator do microscópio = 17070,5

M: Média total de células viáveis ÷ campos contados

D: Diluição final

5.6.2. Análise de crescimento

O crescimento foi acompanhado através da análise de transmitância em espectrofotômetro com densidade óptica de 595nm em cubeta. As análises foram realizadas nos tempos 0h, 6h, 12h e 24h, em que, para os tempos 0 e 6 realizou-se a diluição de 10:1. Já

os tempos de 12 e 24 utilizou-se 20:1 devido a maior concentração celular. O meio sem inóculo foi utilizado como branco. Para análise dos dados de crescimento subtraiu-se o valor do meio (branco) e do tempo 0.

5.7. Análise de metabólitos

As análises de metabólitos foram realizadas pelo Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, seguindo metodologia abaixo:

As amostras em microtubo foram centrifugadas durante 10 minutos a 5.000 rpm em centrífuga de microtubo. Um determinado volume do sobrenadante foi imediatamente filtrado por pressão positiva em filtros de porosidade 0,22 μ m (Millipore) e o filtrado utilizado nas determinações analíticas.

Os metabólitos glicose, frutose, manitol, glicerol, etanol, piruvato, succinato e acetato foram separados em uma coluna de exclusão iônica (Biorad, modelo Aminex HPX-87H) a 60 °C, utilizando-se H_2SO_4 5 mM como fase móvel a uma vazão de 0,6 mL.min⁻¹. Os açúcares e álcoois foram detectados em um refratômetro diferencial, enquanto os ácidos orgânicos foram detectados em ultra-violeta a 214 nm em sistema de cromatografia líquida de alta-eficiência (Shimadzu).

5.8. Análise estatística

As médias obtidas nos experimentos foram analisadas pelo teste de comparação de múltiplas de Tukey, ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Classificação do metabolismo

Devido à diferença da rota metabólica utilizada pelos *Lactobacillus* hetero e homofermentativos se faz possível distinguir os dois perfis metabólicos em decorrência dos produtos formados na metabolização dos açúcares (von WEYMARN et al., 2002). Dentre os metabólitos, o manitol é utilizado como indicativo da presença de bactérias heterofermentativas contaminando a dorna de fermentação e ainda em estudos que necessitam identificar o metabolismo de bactérias lácticas (LOPES et al., 2016; VITAL, 2013). A produção de CO₂ também pode ser eficiente para a classificação do metabolismo, visto que somente as heterofermentativas produzem tal composto (MAYO, et al., 2010).

O uso do meio MBL que contém nutrientes, aminoácidos, sais e ainda a adição de 1,0% de glicose e 1,0% de frutose como fonte de carbono mostrou-se eficiente para a classificação das linhagens quanto à produção de CO₂ e manitol. O uso da frutose em conjunto com a glicose foi para que a bactéria heterofermentativa pudesse produzir o manitol a partir da redução da frutose. Na Tabela 4 estão presentes os resultados de produção de CO₂ avaliado em tubo Durhan (Figura 5) e manitol analisado mediante cromatografia líquida. A linhagem que produziu o metabólito foi indicada como positiva e a que não produziu indicada como negativa.

Tabela 4. Produções de CO₂ e manitol pelas linhagens I3a (Heterofermentativa) e I4a (Homofermentativa) em 3 repetições. A linhagem que produziu o metabólito foi classificada como positiva e a que não apresentou produção foi classificada como negativa.

Linhagem	CO ₂	Manitol
I3a - 1	Positiva	Positiva
I3a- 2	Positiva	Positiva
I3a- 3	Positiva	Positiva
I4a - 1	Negativa	Negativa
I4a- 2	Negativa	Negativa
I4a- 3	Negativa	Negativa

Figura 5. **A:** Tubo Durhan contendo CO₂ em decorrência do metabolismo heterofermentativo; **B:** Tubo Durhan sem a presença de CO₂ em decorrência do metabolismo homofermentativo.

A produção de CO₂ apresentou-se de acordo com a produção de manitol, mostrando a eficiência do meio para a identificação do metabolismo das linhagens.

Em relação ao consumo e produção, a linhagem heterofermentativa consumiu 90% da frutose presente no meio para a produção de manitol, ficando assim, a glicose destinada à produção de biomassa, ATP, lactato, acetato, etanol e CO₂. Além disso, a linhagem consumiu todo o açúcar, ao contrário do que ocorreu com a homofermentativa, que apresentou açúcares residuais, mostrando um metabolismo mais lento (Figura 6).

Figura 6. Valores apresentados em % da média do resíduo de glicose e frutose e a produção de manitol após 24 horas de incubação. A linhagem I3a (heterofermentativa), representada na cor vermelha, teve consumo total dos açúcares e produção elevada de manitol. Já para a linhagem I4a (homofermentativa), representada pela cor azul, apresentou açúcar residual e não produziu manitol.

Apesar da diferença no consumo dos metabólitos, as linhagens apresentaram crescimento sem diferença significativa (Figura 7). Isso pode ser explicado pelo fato de que a homofermentativa utiliza tanto a glicose como a frutose para crescer. Da concentração de 1% de glicose, a linhagem metabolizou 0,40%, enquanto para 1% de frutose foi metabolizado 0,65%. A soma dos açúcares utilizados pela homofermentativa apresentou valor próximo da glicose utilizada pela heterofermentativa, que foi de 0,94%.

Figura 7. Crescimento mensurado por D.O. (595 nm) após 24 horas em meio MBL suplementado com glicose 1,0% e frutose 1,0%.

A partir dos resultados foi possível classificar a linhagem I3a como heterofermentativa e a I4a como homofermentativa. A literatura relata que a espécie *L. fermentum* possui metabolismo heterofermentativo obrigatório, e a espécie *L. plantarum* possui metabolismo heterofermentativa facultativa em que nas condições estudadas mostra-se com metabolismo homofermentativo (DELLAGLIO et al., 2004; KLEEREBEZEM et al., 2003). Com isso, os resultados em relação ao metabolismo corroboram com a identificação à nível de espécie, mostrando a eficiência das metodologias para a classificação dos perfis metabólicos das linhagens.

6.2. Análise de crescimento

6.2.1. Glicose e frutose

Na fermentação alcoólica industrial o mosto é composto em sua maioria de sacarose e uma fração menor de frutose e glicose (BASSO e BASSO, 2011). Os *Lactobacillus* são capazes de fermentar a glicose e frutose, porém incapazes de metabolizar a sacarose. Dessa forma, a levedura ao realizar a quebra do dissacarídeo pela ação da enzima invertase beneficia a bactéria com a liberação dos monossacarídeos (LEROI e PIDOUX, 1993).

Os *Lactobacillus* heterofermentativos possuem preferência para a frutose enquanto os homofermentativos mostram maior preferência pela glicose (BASSO et al., 2014). Já a

levedura apresenta preferência pela glicose metabolizando rapidamente o açúcar e assim, estabelecendo uma competição com a bactéria homofermentativa (BASSO et al., 2014).

A fim de verificar o crescimento das linhagens na presença desses açúcares, fez-se uso de meio mínimo suplementado de 0,5% de glicose, 0,5% de frutose, 1,0% de glicose e a combinação de 0,5% de glicose + 0,5% de frutose.

Para a linhagem heterofermentativa, o crescimento com a combinação de glicose 0,5% + frutose 0,5% apresentou um estímulo inicial maior se comparado com o tratamento em que foi utilizado 1,0% de glicose. Possivelmente a combinação das duas fontes de carbono favoreceu o desempenho de crescimento da linhagem, mostrando facilidade na metabolização da frutose. Entretanto, apesar desse estímulo inicial, a linhagem não apresentou crescimento superior ao tratamento com glicose após as 12 horas (Figura 8).

Figura 8. Crescimento mensurado por D.O. (600 nm) em intervalos de 2 horas durante 24 horas da linhagem I3a (heterofermentativa) nos seguintes tratamentos: glicose 0,5%; frutose 0,5%; glicose 1%; glicose 0,5% + frutose 0,5%.

A linhagem homofermentativa, por sua vez, não apresentou estímulo com a combinação de glicose e frutose, quando comparado com glicose 1,0%, apresentando mesmo comportamento nos dois tratamentos (Figura 9).

Figura 9. Crescimento mensurado por D.O. (600 nm) em intervalos de 2 horas durante 24 horas da linhagem I4a (homofermentativa) nos seguintes tratamentos: Glicose 0,5%; Frutose 0,5%; Glicose 1%; Glicose 0,5% + Frutose 0,5%.

A comparação do crescimento das duas linhagens para cada tratamento foi realizada em 12 e 24 horas. Em 12 horas, observou-se que a linhagem homofermentativa apresentou crescimento superior para os tratamentos que continham somente glicose no meio. No caso do tratamento somente com frutose, a linhagem heterofermentativa teve crescimento com diferença significativa em relação a homofermentativa, mostrando eficiência na metabolização deste açúcar. Para os tratamentos com a combinação de ambos os açúcares, as linhagens não apresentaram diferença significativa de crescimento (Figura 10).

Figura 10. Comparação de crescimento mensurado por D.O. (600 nm) após 12 horas das linhagens I3a (heterofermentativa) e I4a (homofermentativa) nos seguintes tratamentos: Glucose 1,0%; glicose 0,5%; frutose 0,5%; glicose 0,5% + frutose 0,5%.

Para o tratamento apenas com frutose, a linhagem homofermentativa teve crescimento semelhante ao da heterofermentativa apenas após 24 horas. Com isso é possível constatar que a heterofermentativa por apresentar preferência pela frutose é capaz de crescer com maior rapidez na presença do açúcar. Dessa forma, em um ambiente com frutose a heterofermentativa seria mais competitiva do que a homofermentativa. Para o caso do tratamento somente com a glicose, mesmo após 24 horas, a linhagem heterofermentativa não conseguiu ter crescimento superior ao da homofermentativa mostrando assim um melhor desempenho de bactérias com esse metabolismo quando com glicose (Figura 11).

Figura 11. Comparação de crescimento mensurado por D.O. (600 nm) após 24 horas das linhagens I3a (heterofermentativa) e I4a (homofermentativa) nos seguintes tratamentos: Glucose 1,0%; glicose 0,5%; frutose 0,5%; glicose 0,5% + frutose 0,5%.

Esses resultados evidenciam que a bactéria com metabolismo heterofermentativo apresenta maior facilidade para crescer no início da fermentação em que ocorre maior presença de frutose disponível no substrato, sendo capaz assim de crescer e se tornar competitiva. Diferentemente do que ocorre com a homofermentativa, que necessita competir com a levedura pela glicose.

6.2.2. Glicerol, manitol, malato e piruvato

A partir das evidências apresentadas na literatura (BASSO et al., 2014; VITAL, 2013) e dos resultados discutido no item 6.2.1, em teoria, a bactéria heterofermentativa apresentaria vantagens durante a fermentação alcoólica. Todavia, na indústria isso não é observado, em que tanto a hetero como a homofermentativa estão presentes em iguais proporções (VITAL, 2013). Isso traz a hipótese de que a homofermentativa teria outras fontes que não os açúcares para sustentar seu crescimento.

Para isso, analisou-se o crescimento tanto da hetero como da homofermentativa quando na presença de alguns dos metabólitos que estão disponíveis no substrato durante a fermentação, em decorrência do metabolismo da levedura e da bactéria Heterofermentativa.

6.2.2.1. Crescimento utilizando glicerol, manitol, malato e piruvato como única fonte

Com o intuito de avaliar se as linhagens são capazes de crescer na presença de cada metabólito isoladamente, utilizou-se meio mínimo acrescido de glicerol, manitol, malato e piruvato, e ainda foi analisado o crescimento somente na presença de glicose como referência. O crescimento foi analisado durante 24 horas para a heterofermentativa (Figura 12) e para a homofermentativa (Figura 13).

Figura 12. Crescimento mensurado por D.O. (600 nm) em intervalos de 2 horas durante 24 horas da linhagem I3a (heterofermentativa) em meio mínimo com os seguintes tratamentos: Glicose 0,25% (referência); glicerol 0,1%; manitol 0,1%; malato 0,1%; piruvato 0,1%.

Figura 13. Crescimento mensurado por D.O. (600 nm) em intervalos de 2 horas durante 24 horas da linhagem I4a (homofermentativa) em meio mínimo com os seguintes tratamentos: Glicose 0,25% (referência); glicerol 0,1%; manitol 0,1%; malato 0,1%; piruvato 0,1%.

Quando na presença de 0,1% de manitol, tanto a hetero quanto a homofermentativa apresentaram crescimento, mostrando que o composto possivelmente foi utilizado como fonte de carbono. Analisando a curva de crescimento foi possível constatar que a heterofermentativa apresentou uma fase lag que se estendeu próximo as 2 horas de incubação, mostrando ter uma resposta mais lenta na metabolização quando comparado com a homofermentativa que apresentou instantâneo crescimento.

Para metabolizar o manitol em anaerobiose se faz necessário a presença de um receptor de elétrons (LIU, 2003), pois na conversão do metabólito em ácido láctico ocorre a produção de 3 moles de NADH e somente 2 moles são reoxidados em anaerobiose (MCFEETERS e CHEN, 1986). A espécie *L. plantarum* foi relatada como capaz de metabolizar o manitol presente no substrato, quando em anaerobiose, produzindo o ácido láctico e para que isso ocorra a bactéria fez uso de um receptor de elétrons externo (CHEN et al., 1983).

Possivelmente, o crescimento obtido em ambas as linhagens utilizando manitol se deu pelo uso do oxigênio presente no meio em decorrência do ambiente microaeróbico da microplaca onde ocorreu o cultivo. Entretanto, no ambiente fermentativo, onde ocorre a ausência do oxigênio, possivelmente a bactéria faça uso de outros compostos que estão disponíveis no substrato, como o malato, ácido acético, piruvato, glicerol e frutose (GARAI-

IBABE et al., 2008; MCFEETERS e CHEN, 1986; MOZZI et al., 2010; PASSOS et al., 2003).

Analisando as linhagens na presença de glicerol, malato e piruvato, não houve crescimento significativo, como ocorreu com o manitol e dessa forma pode-se deduzir que há necessidade de prévio crescimento com monossacarídeo (GARAI-IBABE et al., 2008) ou a necessidade de um receptor de elétrons para sustentar a metabolização, caso os metabólitos sejam utilizados como fonte de carbono (DOI e IKEGAMI, 2014). Ao analisar o crescimento em 12 horas (Figura14) foi possível constatar que não houve diferença significativa entre as linhagens.

Figura 14. Comparação de crescimento mensurado por D.O. (600nm) após 12 horas das linhagens I3a (heterofermentativa) e I4a (homofermentativa) nos seguintes tratamentos: Glucose 0,25%; glicerol 0,1%; manitol 0,1%; malato 0,1%; piruvato 0,1%.

Apesar das linhagens apresentarem crescimento utilizando manitol, em 24 horas foi observado que o crescimento teve decréscimo em relação às 12 horas (Figura 15). Comparando o crescimento em 12 e 24 horas para a heterofermentativa os valores de absorbância foram de 0,091 para 0,049 respectivamente. Já para a homofermentativa em 12 e 24 horas os valores de absorbância foram de 0,082 para 0,048. Possivelmente, isso ocorreu devido à baixa concentração do metabólito que não foi suficiente para a linhagem crescer durante as 24 horas de incubação. Observou-se também decréscimo nos tratamentos com glicerol, malato e piruvato, salvo o tratamento com glicerol para a linhagem

heterofermentativa em que de 12 para 24 horas apresentou aumento nos valores de absorbância que foi de 0,003 para 0,006.

Figura 15. Comparação de crescimento mensurado por D.O. (600 nm) após 24 horas das linhagens I3a (heterofermentativa) e I4a (homofermentativa) nos seguintes tratamentos: Glucose 0,25%; glicerol 0,1%; manitol 0,1%; malato 0,1%; piruvato 0,1%.

Com isso, as bactérias com metabolismo heterofermentativo e homofermentativo mostraram-se capazes de fazer uso do manitol para seu crescimento mesmo sem a presença de outra fonte de carbono. Levando em conta a competição por glicose a que a homofermentativa é submetida quando na presença da levedura durante a fermentação, ela provavelmente faça uso do manitol disponível no substrato para crescer em conjunto com outro metabólito a ser utilizado como receptor de elétrons. Dessa maneira, é possível que ocorra um beneficiamento por parte das bactérias heterofermentativas para com as homofermentativas no processo, uma vez que somente as heterofermentativas produzem tal metabólito em grandes proporções. Além disso, com os resultados foi possível observar que a heterofermentativa, provavelmente, quando na falta de açúcares, reabsorva e metaboliza o manitol.

6.2.3. Crescimento a partir da combinação entre glicerol, manitol, malato e piruvato

A literatura relata que as bactérias lácticas podem fazer uso de diversos metabólitos que não os açúcares, seja como fonte de carbono e/ou como receptor de elétrons. (GARAI-

IBABE et al., 2008; MCFEETERS e CHEN, 1986; OLSEN et al., 1991; RIVALDI et al., 2013; STOLZ et al., 1995; WAGNER et al., 2005). Com isso, verificou-se o crescimento com a combinação entre os metabólitos de 2 em 2, sem a presença de açúcares, levando em conta de que um seria utilizado como fonte de carbono e o outro como receptor de elétrons.

O glicerol por ser um composto reduzido, sua utilização como um receptor parece ser mais conveniente para a bactéria do que como fonte de carbono (SIGEL e SIGEL, 1994). Algumas espécies do gênero *Lactobacillus* mostram-se capazes de fazer uso do glicerol como receptor de elétrons para manter o balanço redox durante o metabolismo de uma fonte de carbono. A espécie *L. reuteri* que possui metabolismo heterofermentativo obrigatório se destaca por produzir a reuterina, um metabólito com ação antimicrobiana e que é produzido quando a bactéria está na presença de uma fonte de carbono e do glicerol que é utilizado como receptor de elétrons (CHEN et al., 2016; TALARICO et al., 1990).

Dessa forma, o crescimento das linhagens foi analisado a partir da suplementação do meio mínimo com glicerol a ser utilizado como receptor de elétrons em combinação com manitol, malato e piruvato a serem utilizados como fonte de carbono. Ao analisar o crescimento da heterofermentativa nas combinações com glicerol, houve crescimento somente quando o manitol estava presente (Figura 16).

Figura 16. Crescimento mensurado por D.O.(600 nm) em intervalos de 2 horas durante 24 horas da linhagem I3a (heterofermentativa) em meio mínimo com os seguintes tratamentos: Glicose 1,0% (referência); glicerol 0,5% + manitol 0,5%; glicerol 0,5% + malato 0,5%; glicerol 0,5% + piruvato 0,5%.

Apesar de ser esperado crescimento com a suplementação do manitol, visto que ambas as linhagens são capazes de crescer utilizando tal metabólito, a presença do glicerol resultou em um crescimento lento com uma fase lag que se estendeu até as 4 horas de incubação, distinto do que observou-se no crescimento quando o manitol foi utilizado isoladamente (Item 6.2.2.1) e de quando a linhagem cresceu na presença apenas de glicose. Apesar dos dados não permitirem a confirmação da utilização do glicerol como receptor, é possível perceber que o metabólito alterou o crescimento da linhagem.

Para os demais metabólitos a linhagem não apresentou crescimento, podendo supor que na condição estudada os metabólitos tenham a mesma função, ou seja, tanto o glicerol, quanto o malato e piruvato são receptores de elétrons.

Resultado semelhante foi observado na linhagem homofermentativa, contudo, no tratamento com glicerol e manitol a fase lag ocorreu até as 2 horas de incubação, mostrando assim uma resposta mais rápida aos metabólitos se comparado com a heterofermentativa (Figura 17).

Figura 17. Crescimento mensurado por D.O. (600 nm) em intervalos de 2 horas durante 24 horas da linhagem I4a (homofermentativa) em meio mínimo com os seguintes tratamentos: Glicose 1,0% (referência); glicerol 0,5% + manitol 0,5%; glicerol 0,5% + malato 0,5%; glicerol 0,5% + piruvato 0,5%.

Ao comparar o crescimento entre as linhagens observou-se crescimento superior da homofermentativa nas 12 primeiras horas no tratamento contendo glicerol e manitol, em que a linhagem apresentou absorbância de 0,43 mostrando um metabolismo mais acelerado enquanto a heterofermentativa apresentou valor de 0,38. Em relação aos tratamentos com o glicerol combinado com malato e piruvato, a heterofermentativa apresentou crescimento

superior, mostrando assim que pelo menos um dos metabólitos foi utilizado pela linhagem (Figura 18).

Figura 18. Comparação de crescimento mensurado por D.O. (600 nm) após 12 horas das linhagens I3a (heterofermentativa) e I4a (homofermentativa) nos seguintes tratamentos Glicose 1,0% (referência); glicerol 0,5% + manitol 0,5%; glicerol 0,5% + malato 0,5%; glicerol 0,5% + piruvato 0,5%.

Apesar do maior crescimento apresentado pela homofermentativa em 12 horas de incubação com glicerol e manitol, após 24 horas a heterofermentativa teve crescimento superior com absorvância de 0,55 enquanto a homofermentativa apresentou valor de 0,50. Para as combinações utilizando glicerol com malato e piruvato, as linhagens mostraram crescimento sem diferença significativa (Figura 19).

Figura 19. Comparação de crescimento mensurado por D.O. (600 nm) após 24 horas das linhagens I3a (heterofermentativa) e I4a (homofermentativa) nos seguintes tratamentos: Glicose 1,0% (referência); glicerol 0,5% + manitol 0,5%; glicerol 0,5% + malato 0,5%; glicerol 0,5% + piruvato 0,5%.

A combinação entre manitol, malato e piruvato também foram avaliadas. Para a heterofermentativa, na combinação entre manitol e malato, a fase lag estendeu-se até as 4 horas enquanto no tratamento com manitol e piruvato a fase lag durou apenas até as 2 horas. Todavia, apesar de uma fase lag maior, o tratamento com manitol e malato apresentou estímulo de crescimento após as 8 horas. No caso do tratamento com malato e piruvato a linhagem não teve crescimento (Figura 20).

Figura 20. Crescimento mensurado por D.O.(600 nm) em intervalos de 2 horas durante 24 horas da linhagem I3a (heterofermentativa) em meio mínimo com os seguintes tratamentos: Glicose 1,0% (referência); manitol 0,5% + malato 0,5%; manitol 0,5% + piruvato 0,5%; malato 0,5% + piruvato 0,5%.

Resultado semelhante foi obtido pela homofermentativa (Figura 21), em que no tratamento com malato e piruvato não houve crescimento da linhagem.

Figura 21. Crescimento mensurado por D.O. (600 nm) em intervalos de 2 horas durante 24 horas da linhagem Ia (homofermentativa) em meio mínimo com os seguintes tratamentos: Glicose 1,0% (referência); manitol 0,5% + malato 0,5%; manitol 0,5% + piruvato 0,5%; malato 0,5% + piruvato 0,5%.

Em relação ao tratamento do manitol em combinação tanto com o malato quanto com o piruvato, a linhagem teve fase lag semelhante entre os tratamentos, que estendeu-se até 2 horas. Com isso, possivelmente, a linhagem apresenta uma resposta mais rápida na combinação dos metabólitos.

Apesar da escassa informação sobre a utilização do manitol pelos *Lactobacillus* em combinação com receptores malato e piruvato, em 1986, Mcfeeters e Chen analisaram o crescimento e a produção de metabólitos quando a espécie *L. plantarum* estava na presença da combinação entre os metabólitos. Quando em meio contendo manitol e malato, foi observado o crescimento da linhagem e ainda a conversão do ácido málico em ácido succínico. Já para a utilização do piruvato, a linhagem apresentou crescimento utilizando o manitol como fonte de carbono e ainda o ácido pirúvico como receptor de elétrons, que foi convertido a ácido láctico.

Quando comparado entre as linhagens, a heterofermentativa apresentou absorvância de 0,57 na combinação entre manitol e malato, mostrando ser superior do que a homofermentativa que teve valor de 0,44. Já para manitol e piruvato, não ocorreu diferença significativa de crescimento entre as linhagens. Já no tratamento com malato e piruvato, somente a heterofermentativa apresentou crescimento, porém com valor de absorvância de 0,05, mostrando a ineficiência da combinação (Figura 22).

Figura 22. Comparação de crescimento mensurado por D.O. (600 nm) após 12 horas das linhagens I3a (heterofermentativa) e I4a (homofermentativa) nos seguintes tratamentos: Glicose 1,0% (referência); manitol 0,5% + malato 0,5%; manitol 0,5% + piruvato 0,5%; malato 0,5% + piruvato 0,5%.

Após as 24 horas foi observado decréscimo no crescimento em ambas as linhagens na maior parte dos tratamentos, salvo o tratamento com manitol e piruvato para a heterofermentativa que às 12 horas apresentou absorbância 0,52 e em 24 hora teve aumento para 0,58 (Figura 23).

Figura 23. Comparação de crescimento mensurado por D.O. (600 nm) após 24 horas das linhagens I3a (heterofermentativa) e I4a (homofermentativa) nos seguintes tratamentos: Glicose 1,0% (referência); manitol 0,5% + malato 0,5%; manitol 0,5% + piruvato 0,5%; malato 0,5% + piruvato 0,5%.

Com a combinação entre os metabólitos foi possível constatar que para que as linhagens possam crescer fazendo uso de glicerol, malato e piruvato se faz necessária a presença de uma fonte de carbono como ocorreu na presença do manitol, ou então possivelmente na presença de açúcares como a glicose e frutose.

6.2.4. Influência de cada metabólito no crescimento com glicose e frutose

A partir da premissa de que a presença de metabólitos juntamente com a glicose e frutose podem ocasionar maior crescimento para as bactérias, seja fazendo uso como fonte de carbono ou receptor de elétrons, o crescimento de cada linhagem foi analisado com os 4 metabólitos com glicose e frutose durante 24 horas.

O glicerol foi relatado como metabolizado pelas espécies *L. collinoides* com metabolismo heterofermentativo durante a produção de cidra. A produção da bebida é realizada a partir da fermentação por levedura que excreta ao meio metabólitos como o

glicerol. A partir da presença de glicerol e frutose residual a bactéria apresenta crescimento e ainda realiza a metabolização do glicerol estimulada pela presença do açúcar, produzindo a acroleína responsáveis por caracterizar amargor a bebida (GARAI-IBABE et al., 2008).

As bactérias lácticas durante a fermentação malolática, quando na presença de malato e glicose, também tem seu crescimento beneficiado se comparado quando a bactéria cresce apenas com glicose (AXELSSON, 2004). Já as espécie *Oenococcus oeni* e *Leuconostoc mesenteroides*, ambas com metabolismo heterofermentativo, apresentaram maior crescimento quando o meio continha a combinação de glicose com piruvato (WAGNER et al., 2005)

Dessa forma, cada metabólito foi combinado com glicose e frutose em concentrações menores (0,25%) para que houvesse a necessidade de a linhagem utilizar os metabólitos após o esgotamento dos açúcares.

O crescimento da linhagem heterofermentativa mostrou-se superior ao controle nos tratamentos em que foi utilizado o manitol e piruvato. Isso possivelmente está relacionado com uma maior preferência para com esses dois compostos. Além disso, o piruvato proporcionou um estímulo maior na fase log a partir das 2 horas se comparado com os outros metabólitos, apresentando assim maior crescimento no início da incubação. Já no caso do glicerol e malato, não promoveram crescimento superior ao controle (Figura 24).

Figura 24. Crescimento mensurado por D.O.(600 nm) em intervalos de 2 horas durante 24 horas da linhagem I3a (heterofermentativa) em meio mínimo com os seguintes tratamentos: Glicose 0,25% + frutose 0,25% (referência); glicose 0,25% + frutose 0,25% + glicerol 0,1% ; glicose 0,25% + frutose 0,25% + manitol 0,1%; glicose 0,25% + frutose 0,25% + malato 0,1%; glicose 0,25% + frutose 0,25% + piruvato 0,1% .

Diferentemente, a homofermentativa apresentou ter o crescimento favorecido na presença de todos os 4 metabólitos. Isso mostra que o substrato da fermentação alcoólica pode proporcionar um melhor desempenho para essa bactéria permitindo sua presença no processo mesmo frente a competição pela glicose e frutose. Para esta linhagem também foi observou uma maior fase log na presença de piruvato, podendo inferir uma metabolização mais rápida, contudo foi inferior do estímulo observado na heterofermentativa (Figura 25).

Figura 25. Crescimento mensurado por D.O.(600 nm) em intervalos de 2 horas durante 24 horas da linhagem I4a (homofermentativa) em meio mínimo com os seguintes tratamentos: Glicose 0,25% + frutose 0,25% (referência); glicose 0,25% + frutose 0,25% + glicerol 0,1% ; glicose 0,25% + frutose 0,25% + manitol 0,1%; glicose 0,1% + frutose 0,25% + malato 0,1%; glicose 0,25% + frutose 0,25% + piruvato0,1% .

Analisando as médias de crescimento, foi observado que a homofermentativa nas 12 primeiras horas apresentou crescimento superior com diferença significativa em relação à heterofermentativa para os tratamentos na presença do glicerol, manitol e malato. Já no caso do piruvato, as linhagens apresentaram crescimento semelhante (Figura 26). Para este tratamento, a heterofermentativa se mostrou mais beneficiada nas 12 primeiras horas se comparado com a absorbância dos outros metabólitos, sendo assim, possivelmente a linhagem teve favorecimento com o metabólito.

Figura 26. Comparação de crescimento mensurado por D.O. (600 nm) após 12 horas das linhagens I3a (heterofermentativa) e I4a (homofermentativa) nos seguintes tratamentos: Glicose 0,25% + frutose 0,25% (referência); glicose 0,25% + frutose 0,25% + glicerol 0,1% ; glicose 0,25% + frutose 0,25% + manitol 0,1%; glicose 0,25% + frutose 0,25% + malato 0,1%; glicose 0,25% + frutose 0,25% + piruvato 0,1% .

Após 24 horas, apesar de ter ocorrido decréscimo no crescimento, a diferença entre as linhagens foi a mesma observada em 12 horas (Figura 27).

Figura 27. Comparação de crescimento mensurado por D.O. (600 nm) após 24 horas das linhagens I3a (heterofermentativa) e I4a (homofermentativa) nos seguintes tratamentos: Glicose 0,25% + frutose 0,25% (referência); glicose 0,25% + frutose 0,25% + glicerol 0,1%; glicose 0,25% + frutose 0,25% + manitol 0,1%; glicose 0,25% + frutose 0,25% + malato 0,1%; glicose 0,25% + frutose 0,25% + piruvato 0,1% .

Para analisar estatisticamente com qual metabólito cada linhagem apresentou maior crescimento com diferença significativa realizou-se a comparação das médias entre os tratamentos em 12 e 24 horas.

Para a heterofermentativa, observou-se que nas 12 primeiras horas (Figura 28), o manitol e piruvato foram os metabólitos que promoveram maior crescimento para a linhagem, com diferença significativa em relação ao crescimento quando o meio foi suplementado apenas com glicose e frutose.

Figura 28. Comparação de crescimento mensurado por D.O. (600 nm) após 12 horas da linhagem I3a (heterofermentativa) nos seguintes tratamentos: Glicose 0,25% + frutose 0,25% (referência); Glicose 0,25% + frutose 0,25% + glicerol 0,1%; glicose 0,25% + frutose 0,25% + manitol 0,1%; glicose 0,25% + frutose 0,25% + malato 0,1%; glicose 0,25% + frutose 0,25% + piruvato 0,1% .

Em 24 horas (Figura 29), ocorreu como já mencionado, o decréscimo do crescimento. Apesar da indagação de que a concentração de metabólitos estar relacionada a isto, não se pode deixar de levar em consideração que a concentração de ácidos orgânicos produzidos por essas bactérias pode também ocasionar na queda de crescimento e viabilidade celular, principalmente devido ao ácido lático que é produzido em maiores concentrações.

Figura 29. Comparação de crescimento mensurado por D.O. (600 nm) após 24 horas da linhagem I3a (heterofermentativa) nos seguintes tratamentos: Glicose 0,25% + frutose 0,25% (referência); Glicose 0,25% + frutose 0,25% + glicerol 0,1%; glicose 0,25% + frutose 0,25% + manitol 0,1%; glicose 0,25% + frutose 0,25% + malato 0,1%; glicose 0,25% + frutose 0,25% + piruvato 0,1%.

Para a linhagem homofermentativa, apesar da curva de crescimento durante as 24 horas mostrar maior crescimento para com os 4 metabólitos (Figura 24) não houve diferença significativa tanto entre os tratamentos quando comparado com o controle (Figura 30 e 31). Entretanto, se faz interessante analisar esse aumento de crescimento que pode mostrar um possível beneficiamento para a bactéria.

Figura 30. Comparação de crescimento mensurado por D.O. (600 nm) após 12 horas da linhagem I4a (homofermentativa) nos seguintes tratamentos: Glicose 0,25% + frutose 0,25% (referência); Glicose 0,25% + frutose 0,25% + glicerol 0,1%; glicose 0,25% + frutose 0,25% + manitol 0,1%; Glicose 0,25% + frutose 0,25% + malato 0,1%; glicose 0,25% + frutose 0,25% + piruvato 0,1%.

Figura 31. Comparação de crescimento mensurado por D.O. (600 nm) após 24 horas da linhagem I4a (homofermentativa) nos seguintes tratamentos: Glicose 0,25% + frutose 0,25% (referência); Glicose 0,25% + frutose 0,25% + glicerol 0,1%; glicose 0,25% + frutose 0,25% + manitol 0,1%; glicose 0,25% + frutose 0,25% + malato 0,1%; glicose 0,25% + frutose 0,25% + piruvato 0,1%.

Um dado interessante observado nas análises dos dados relatados neste Item, foi de que o crescimento obtido na presença de glicerol mostrou que a homofermentativa pode ter maior facilidade para crescer com este metabólito, quando na presença de glicose e frutose. A ideia de que bactérias homofermentativas durante a fermentação faz uso do glicerol já foi

relatada por autores que objetivaram estudar a interação entre o gênero *Latobacillus* e a levedura *S. cerevisiae* (BASSO et al., 2014; VITAL, 2013; YABARRENA, 2012). Nestes trabalhos, todos os autores tiveram a mesma observação, de que quando a fermentação alcoólica era conduzida com o cocultivo de levedura e a bactéria homofermentativa, a concentração de glicerol no meio foi baixa se comparado com o meio em que a fermentação ocorreu com o cocultivo da levedura com a bactéria heterofermentativa, e além disso, apresentou concentração inferior até mesmo em relação ao controle, que consistiu em fermentação com a presença somente da levedura. Apesar dessa constatação, os autores não puderam concluir se essa diferença de concentração do metabolito foi realmente devido ao seu consumo ou se a presença da bactéria homofermentativa ocasiona em uma menor produção por parte da levedura.

6.2.5. Influência da combinação de todos os metabólitos na presença de glicose e frutose

Durante a fermentação, é possível que a presença de todos os metabólitos em conjunto com açúcares estimule o crescimento das bactérias.

Ao analisar o crescimento durante as 24 horas, ficou evidente que a combinação de toda as fontes beneficiou o crescimento para ambas as linhagens durante as 24 horas (Figura 32 e 33).

Figura 32. Crescimento mensurado por D.O. (600 nm) em intervalos de 2 horas durante 24 horas da linhagem I3a (heterofermentativa) em meio mínimo com os seguintes tratamentos: Glicose 0,25% + frutose 0,25% (referência); glicose 0,25% + frutose 0,25% + glicerol 0,1% + manitol 0,1% + malato 0,1% + piruvato 0,1%.

Figura 33. Crescimento mensurado por D.O. (600 nm) em intervalos de 2 horas durante 24 horas da linhagem I4a (homofermentativa) em meio mínimo com os seguintes tratamentos: Glicose 0,25% + frutose 0,25% (referência); glicose 0,25% + frutose 0,25% + glicerol 0,1% + manitol 0,1% + malato 0,1% + piruvato 0,1%.

Para comparar se essa diferença de crescimento foi significativa, as médias de absorvância obtidas de cada linhagem foram analisada em 12 e 24 horas.

Para a heterofermentativa, o crescimento controle (glicose + frutose) apresentou absorbância de 0,32 nas 12 primeiras horas contra 0,46 quando os metabólitos foram suplementados ao meio. Já após as 24 horas o controle teve decréscimo na absorbância apresentando valor de 0,29 enquanto quando os metabólitos estavam presentes a absorbância teve valor de 0,46. Isso mostra que além de promover melhor crescimento, a presença de todos os metabólitos juntamente com a glicose e frutose não ocasionou queda de crescimento durante as 24 horas, como observado nos outros experimentos discursados nos itens anteriores. Isso mostra que o esgotamento de metabólitos pode estar relacionado com o decréscimo da linhagem (Figura 34 e 35).

Figura 34. Comparação de crescimento mensurado por D.O. (600 nm) após 12 horas da linhagem I3a (heterofermentativa) nos seguintes tratamentos: Glicose 0,25% + frutose 0,25% (referência); glicose 0,25% + frutose 0,25% + glicerol 0,1% + manitol 0,1% + malato 0,1% + piruvato 0,1%.

Figura 35. Comparação de crescimento mensurado por D.O. (600 nm) após 24 horas da linhagem I3a (heterofermentativa) nos seguintes tratamentos: Glicose 0,25% + frutose 0,25% (referência); glicose 0,25% + frutose 0,25% + glicerol 0,1% + manitol 0,1% + malato 0,1% + piruvato 0,1%.

Para a linhagem homofermentativa também ocorreu maior crescimento, porém ocorreu um pequeno decréscimo tanto para o tratamento quanto para o controle. (Figura 36 e 37).

Figura 36. Comparação de crescimento mensurado por D.O. (600 nm) após 12 horas da linhagem I4a (homofermentativa) nos seguintes tratamentos: Glicose 0,25% + frutose 0,25% (referência); Glicose 0,25% + frutose 0,25% + glicerol 0,1% + manitol 0,1% + malato 0,1% + piruvato 0,1%.

Figura 37. Comparação de crescimento mensurado por D.O. (600 nm) após 24 horas da linhagem I4a (homofermentativa) nos seguintes tratamentos: Glicose 0,25% + frutose 0,25% (referência); Glicose 0,25% + frutose 0,25% + glicerol 0,1% + manitol 0,1% + malato 0,1% + piruvato 0,1%.

Para verificar qual das linhagens apresentam-se mais beneficiadas pelo tratamento, foi comparado o crescimento para 12 e 24 horas (Figura 38 e 39).

Figura 38. Comparação de crescimento mensurado por D.O. (600 nm) após 12 horas das linhagens I3a (heterofermentativa) e I4a (homofermentativa) nos seguintes tratamentos: Glicose 0,25% + frutose 0,25% (referência); Glicose 0,25% + frutose 0,25% + glicerol 0,1% + manitol 0,1% + malato 0,1% + piruvato 0,1%.

Apesar dos resultados deixarem claro que os metabólitos beneficiam ambas as linhagens, a homofermentativa apresenta desempenho melhor tanto no crescimento somente com os açúcares como na suplementação dos metabólitos

Figura 39. Comparação de crescimento mensurado por D.O. (600 nm) após 24 horas das linhagens I3a (heterofermentativa) e I4a (homofermentativa) nos seguintes tratamentos: Glicose 0,25% + frutose 0,25% (referência); Glicose 0,25% + frutose 0,25% + glicerol 0,1% + manitol 0,1% + malato 0,1% + piruvato 0,1%.

Levando em consideração de que a linhagem homofermentativa apresentou melhor desempenho quando o meio foi suplementado com os 4 metabólitos estudados, é possível deduzir que no ambiente fermentativo a bactéria homofermentativa é beneficiada durante a fermentação alcoólica, encontrando ambiente propício ao seu crescimento, tornando-se assim competitiva e persistente ao processo.

6.2.6. Influência da ausência seletiva dos metabólitos no crescimento

Para verificar qual dos metabólitos apresenta maior influência no crescimento quando todos são suplementados ao meio, analisou-se o crescimento retirando cada metabólito separadamente.

Quando o meio não foi suplementado com manitol, observou-se queda brusca de crescimento para a linhagem heterofermentativa, chegando a curva de crescimento a se igualar quando a linhagem estava na presença apenas da glicose e frutose. Isso mostra a importância do metabólito no crescimento da linhagem durante a fermentação. A retirada dos outros metabólitos pouco interferiu no crescimento. Apesar do piruvato ter mostrado influência no crescimento da heterofermentativa quando na presença de glicose e frutose, a sua retirada não interferiu no crescimento que possivelmente foi sustentado pela presença dos outros metabólitos. Entretanto, o que se pode observar é de que sem a presença do piruvato o

estímulo de crescimento da heterofermentativa é menor, mostrando um crescimento mais lento. (Figura 40).

Figura 40. Crescimento mensurado por D.O. (600 nm) em intervalos de 2 horas durante 24 horas da linhagem I3a (heterofermentativa) em meio mínimo com os seguintes tratamentos: Glicose 0,25% + frutose 0,25% (referência); ausência de glicerol; ausência de manitol; ausência de malato; ausência de piruvato. Cada metabólito foi usado em concentração de 0,1%.

Já a homofermentativa mostrou-se mais afetada pela ausência do manitol e do malato evidenciando a importância dos metabólitos para o crescimento da linhagem. A ausência do piruvato causou um crescimento mais lento para a linhagem, contudo, não tão expressivo como ocorreu na heterofermentativa (Figura 41).

Figura 41. Crescimento mensurado por D.O. (600 nm) em intervalos de 2 horas durante 24 horas da linhagem I4a (homofermentativa) em meio mínimo com os seguintes tratamentos: Glicose 0,25% + frutose 0,25% (referência); ausência de glicerol; ausência de manitol; ausência de malato; ausência de Piruvato. Cada metabólito foi usado em concentração de 0,1%.

Ao comparar qual dos metabólitos apresentou maior interferência para a heterofermentativa, foi possível observar que a retirada do manitol ocasionou em maior queda tanto em 12 quanto em 24 horas (Figura 42 e 43). Mesmo não apresentando diferença significativa, ocorreu queda no tratamento em que o malato estava ausente, mostrando que possivelmente esse metabólito também está envolvido no aumento do crescimento da heterofermentativa quando o meio está suplementado com todos os metabólitos.

Figura 42. Comparação de crescimento mensurado por D.O. (600 nm) após 12 horas da linhagem I3a (heterofermentativa) nos seguintes tratamentos: Glicose 0,25% + frutose 0,25% (referência); Ausência de glicerol; ausência de manitol; ausência de malato; ausência de piruvato. Cada metabólito foi usado em concentração de 0,1%.

A ausência do piruvato e glicerol não mostrou diferença no crescimento, em que, possivelmente foi sustentado pela presença de manitol e malato.

Figura 43. Comparação de crescimento mensurado por D.O. (600 nm) após 24 horas da linhagem I3a (heterofermentativa) nos seguintes tratamentos: Glicose 0,25% + frutose 0,25% (referência); ausência de glicerol; ausência de manitol; ausência de malato; ausência de piruvato. Cada metabólito foi usado em concentração de 0,1%.

A linhagem homofermentativa mostrou resultado semelhante à heterofermentativa, em que a ausência do piruvato e glicerol não interferiram no crescimento. Para o manitol e malato ocorreu queda, chegando a valores semelhantes ao do tratamento em que o meio continha apenas glicose e frutose (Figuras 44 e 45).

Figura 44. Comparação de crescimento mensurado por D.O. (600 nm) após 12 horas da linhagem I4a (homofermentativa) nos seguintes tratamentos: Glicose 0,25% + frutose 0,25% (referência); ausência de glicerol; ausência de manitol; ausência de malato; ausência de piruvato. Cada metabólito foi usado em concentração de 0,1%.

Figura 45. Comparação de crescimento mensurado por D.O. (600 nm) após 24 horas da linhagem I4a (homofermentativa) nos seguintes tratamentos: Glicose 0,25% + frutose 0,25% (referência); ausência de glicerol; ausência de manitol; ausência de malato; ausência de piruvato. Cada metabólito foi usado em concentração de 0,1%.

Ao comparar as linhagens em 12 e 24 horas (Figura 46 e 47), verificou-se que os metabólitos manitol e malato foram os que mostraram maior interferência no crescimento de ambas as linhagens. Além disso, a linhagem homofermentativa, como já observado, apresentou crescimento superior a heterofermentativa em todos os tratamentos, mostrando ser mais beneficiada.

Figura 46. Comparação entre as médias de crescimento em 12 horas entre as linhagens I3a (heterofermentativo) e para a linhagem I4a (homofermentativo) nos seguintes tratamentos: Glicose 0,25% + frutose 0,25% (referência); toda as fontes; ausência de glicerol; ausência de manitol; ausência de malato; ausência de piruvato. Cada metabólito foi usado em concentração de 0,1%.

Figura 47. Comparação entre as médias de crescimento em 24 horas entre as linhagens I3a (heterofermentativo) e para a linhagem I4a (homofermentativo) nos seguintes tratamentos: Glicose 0,25% + frutose 0,25% (referência); todas as fontes; ausência de glicerol; ausência de manitol; ausência de malato; ausência de piruvato. Cada metabólito foi usado em concentração de 0,1%.

6.3. Análise de consumo e produção de metabolitos

6.3.1. Manitol e glicerol

Com o intuito de verificar se a bactéria heterofermentativa é capaz de reabsorver o manitol produzido e excretado por ela mesma e ainda se a homofermentativa é beneficiada por essa produção, analisou-se o consumo e produção de ambas as linhagens em cultura pura e em cocultivo.

Para que as linhagens apresentassem a necessidade de utilizar o manitol para seu crescimento durante as 24 horas, utilizou-se de 0,25% de glicose e 0,25% de frutose. Além disso, foi utilizado 0,01% de glicerol para verificar se a linhagem pode utilizar o metabólito como um possível receptor de elétrons.

Após 12 horas de incubação foi possível identificar a diferença de metabolismo entre as duas linhagens com a produção de acetato, etanol e manitol pela linhagem heterofermentativa e a grande produção de ácido lático pela homofermentativa (Figura 48).

Figura 48. Análise de produção e consumo de metabólitos após 12 horas de cultivo da linhagem I3a (heterofermentativa), da linhagem I4a (homofermentativa) e do cocultivo entre as duas linhagens. O meio mínimo foi suplementado com glicose 0,25% + frutose 0,25% + 0,01% de glicerol. Na figura consta a composição do M.M. representada na cor amarela para servir como referência.

Levando em consideração a concentração de frutose presente no meio e a produção de manitol produzido, é possível concluir que grande parte da frutose foi reduzida ao metabólito pela bactéria heterofermentativa. Isso mostra a necessidade de um receptor de elétrons para que a linhagem pudesse sustentar o metabolismo durante o consumo da glicose. Quando a bactéria heterofermentativa está na presença de glicose e frutose, a cada 1 mol de glicose metabolizado se faz necessário aproximadamente 2 moles de frutose reduzida a manitol (GROBBEN et al., 2001).

A linhagem homofermentativa, como era de se esperar, não produziu manitol, sendo assim é a heterofermentativa a responsável pela produção do metabólito quando as duas linhagens estão em cocultivo. A espécie *Lactococcus lactis* que possui metabolismo homofermentativo quando em substrato contendo hexose apresenta baixa atividade enzimática da manitol-1-fosfato desidrogenase que é responsável por catalisar a reação de redução da frutose-6-fosfato, dessa forma pequena quantidade ou a não produção ocorre para bactérias com esse metabolismo (WISSELINK et al., 2002).

Em relação ao glicerol, não ocorreu o consumo em nenhum dos casos estudados nas 12 primeiras horas mostrando que as linhagens não são capazes de metaboliza-lo. A produção de etanol teve diferença significativa se comparada a cultura pura da heterofermentativa e o cocultivo, que possivelmente ocorreu devido à menor concentração celular da linhagem

utilizada neste tratamento, visto que metade do inóculo era da heterofermentativa e a outra metade da homofermentativa.

Ambas as linhagens foram capazes de produzir o ácido succínico em iguais proporções. A produção do ácido succínico pode ocorrer na via redutiva do ciclo tricarboxílico (TCA) que não ocorre completamente na ausência do oxigênio e com isso a bactéria produz e excreta pequenas quantidades do metabólito (TSUJI et al., 2013).

Em relação ao ácido láctico, verificou-se a concentração de 0,64% para o tratamento da cultura pura da homofermentativa enquanto para a heterofermentativa e cocultivo a produção foi a metade 0,37% e 0,38% respectivamente. A bactéria heterofermentativa produz apenas 1 mol de ácido láctico a partir de 1 mol de açúcar e ainda não é capaz de utilizar a frutose para este fim, visto que necessita do açúcar como receptor de elétrons (GROBBEN et al., 2001). A homofermentativa, por sua vez, converte 1 mol de glicose em 2 moles de lactato, em que grande parte da glicose e frutose são destinadas a esse fim (MOZZI et al., 2010).

Em relação ao acetato, apenas a heterofermentativa foi capaz de produzi-lo, corroborando com a literatura (MOZZI et al., 2010). O ácido acético detectado no meio foi possivelmente devido à contaminação proveniente de algum composto utilizado para a preparação do meio mínimo.

Analisando os metabólitos após 24 horas de cultivo, todo o manitol foi consumido pela linhagem heterofermentativa. Isso se deve ao esgotamento de açúcar nas 12 primeiras sendo assim o manitol utilizado para manter o crescimento desta bactéria nas últimas 12 horas (Figura 49).

Figura 49. Análise de produção e consumo de metabólitos após 24 horas de cultivo da linhagem I3a (heterofermentativa), da linhagem I4a (homofermentativa) e do cocultivo entre as duas linhagens. O meio mínimo foi suplementado com glicose 0,25% + frutose 0,25% + 0,01% de glicerol. Na figura consta a composição do M.M. representada na cor amarela para servir como referência.

Dessa forma, o manitol foi reabsorvido pela bactéria, oxidado a frutose-6-fosfato, que por sua vez, entrou na via glicolítica para produzir ácido lático, etanol e ácido acético (VON WEYMARN; HUIJANEN; LEISOLA, 2002). Isso pode ser constatado a partir do aumento na produção do ácido lático que ao final da incubação apresentou concentração de 0,46% no tratamento da cultura pura da heterofermentativa, mesmo após o esgotamento de glicose e frutose. No caso da homofermentativa em cultura pura, visto que o meio não foi suplementado com o manitol e ainda a linhagem não é capaz de produzi-lo, não ocorreu aumento da concentração do ácido acético na amostra analisada em 24 horas.

No caso do cocultivo, possivelmente a homofermentativa também fez uso do manitol produzindo o ácido lático. Para a constatação disso, observou-se que a concentração do metabólito subiu para 0,52%.

Em relação ao glicerol, ocorreu diminuição da concentração nas linhagens hetero e homofermentativa em cultura pura, entretanto, isso não foi observado quando as linhagens estavam em cocultivo, não sendo assim possível concluir que o metabólito foi utilizado pelas linhagens.

O crescimento também foi analisado em 12 e 24 horas (Figura 50), em que ambas as linhagens apresentaram crescimento sem diferença significativa, possivelmente pelas mesmas razões explanadas do Item 6.1.

Figura 50. Crescimento obtido por D.O. 595 nm em 12 e 24 horas da linhagem I3a (heterofermentativa), I4a (homofermentativa) e o cocultivo entre as linhagens. Foi utilizado M.M. suplementado de glicose 0,25% + frutose 0,25% + glicerol 0,01%.

6.3.2. Glicerol, manitol, malato e piruvato

Para apurar se ambas as linhagens são hábeis a consumir os 4 metabólitos e ainda identificar se foram utilizados como fonte de carbono ou receptor de elétrons, realizou-se a inoculação em M.M. contendo 0,25% de glicose + 0,25% frutose + 0,1% de glicerol + 0,1% de manitol + 0,03% de malato + 0,03% de piruvato. Devido a metodologia utilizada para identificação dos metabólitos, não foi possível analisar de forma isolada o malato e piruvato, identificados nas próximas figuras como apenas piruvato.

Nas 12 primeiras horas não ocorreu o consumo do glicerol por nenhuma das linhagens tanto em cultura pura quanto em cocultivo, afirmando o que foi relatado no experimento anterior (Item 6.3.1) (Figura 51).

Figura 51. Análise de produção e consumo de metabólitos após 12 horas de cultivo da linhagem I3a (heterofermentativa), da linhagem I4a (homofermentativa) e do cocultivo entre as duas linhagens. O meio mínimo foi suplementado com glicose 0,25% + frutose 0,25% + 0,1% de glicerol + 0,1 de manitol + 0,03% malato + 0,03% piruvato. Na figura consta a composição do M.M. representada na cor amarela para servir como referência.

No caso do ácido pirúvico e ácido málico, ocorreu o consumo total nas 12 primeiras horas. Um indício de que o malato foi utilizado como receptor é pela produção de ácido succínico (MCFEETERS e CHEN, 1986), entretanto, como as linhagens são capazes de produzir e excretar o metabólito em pequenas concentrações, fica difícil afirmar de que as linhagens produziram o metabólito a partir do malato neste experimento. Porém, não se pode deixar de levar em consideração a produção do ácido succínico que apresentou concentração de 0,059% quando a heterofermentativa em cultura pura consumiu o malato, mostrando produção superior de quando o meio não foi suplementado com o metabólito (Figura 48) e a concentração do ácido succínico atingiu valores de 0,047%.

Em relação ao piruvato, a redução pelas bactérias lácticas pode resultar em acetato, etanol, acetaldeído, diacetil, acetoína e 2,3-butanodiol, entretanto, o ácido láctico é o principal produto formado (LIU, 2003). Foi verificado que o ácido láctico teve produção de 0,77% para a cultura pura da heterofermentativa, 0,78% da cultura pura da homofermentativa e 0,76% para o cocultivo. Entretanto fica difícil afirmar que a produção se deu pela presença do piruvato, visto que o manitol e os açúcares estão envolvidos também na produção. Outra observação é de que as linhagens tiveram produção de ácido láctico semelhante visto que a heterofermentativa produziu o ácido a partir da glicose e do manitol que já estava sendo consumido com mais eficiência do que a homofermentativa.

O consumo do manitol foi iniciado nas 12 primeiras horas provavelmente pelo fato de que as linhagens em todos os tratamentos já haviam consumido totalmente tanto a glicose quanto a frutose, mostrando que na necessidade de manter seu crescimento as linhagens fazem uso de uma fonte de carbono alternativa.

Após as 24 horas (Figura 52) o glicerol apresentou aumento da concentração tanto quando as linhagens estavam em cultura pura quanto em cocultivo em relação da concentração que foi suplementada no meio. Possivelmente é devido a produção de algum metabólito que não foi possível diferenciar e identificar com a metodologia utilizada.

Figura 52. Análise de produção e consumo de metabólitos após 24 horas de cultivo da linhagem I3a (heterofermentativa), da linhagem I4a (homofermentativa) e do cocultivo entre as duas linhagens. O meio mínimo foi suplementado com glicose 0,25% + frutose 0,25% + 0,1% de glicerol + 0,1 de manitol + 0,03% malato + 0,03% piruvato. Na figura consta a composição do M.M. representada na cor amarela para servir como referência.

Para o manitol, as linhagens em cultura pura e em cocultivo o consumiram totalmente, afirmando a necessidade do metabólito na ausência de açúcares.

Em relação ao crescimento, não houve diferença significativa devido ao consumo total da fonte de carbono pelas linhagens (Figura 53).

Figura 53. Crescimento obtido por D.O. 595 nm em 12 e 24 horas da linhagem I3a (heterofermentativa), I4a (homofermentativa) e o cocultivo entre as linhagens. Foi utilizado M.M. suplementado com glicose 0,25% + frutose 0,25% + 0,1% glicerol + 0,1 manitol + 0,03% malato + 0,03% piruvato.

6.3.3. Consumo de manitol e glicerol com aumento da concentração de açúcar

Para verificar se a utilização do manitol se dá em concentrações maiores de açúcar e se esse aumento induz a utilização de glicerol, o meio mínimo foi suplementado com 0,5% de glicose + 0,5% de frutose + 0,3% de manitol e 0,3% de glicerol. Nas 12 primeiras horas não houve consumo do manitol pela heterofermentativa, todavia, a linhagem apresentou produção a partir da frutose. A homofermentativa não fez uso do manitol nas 12 primeiras horas, pois ainda havia glicose e frutose no meio, mostrando um metabolismo mais lento em relação a heterofermentativa que com 12 horas já apresentava esgotamento dos açúcares (Figura 54).

Figura 54. Análise de produção e consumo de metabólitos após 12 horas de cultivo da linhagem I3a (heterofermentativa), da linhagem I4a (homofermentativa) e do cocultivo entre as duas linhagens. O meio mínimo foi suplementado com glicose 0,5% + frutose 0,5% + glicerol 0,3% + manitol 0,3%. Na figura consta a composição do M.M. representada na cor amarela para servir como referência.

Para o cocultivo, embora houvesse ainda glicose presente no meio, o tratamento apresentava concentração do metabólito semelhante da heterofermentativa em cultura pura. Em relação ao glicerol, a alta concentração de açúcares não estimulou seu consumo, deixando claro a não utilização do metabólito pelas linhagens como receptor.

Após 24 horas, observou-se que o manitol foi metabolizado pela heterofermentativa, que o utilizou para a produção de ácido láctico. Constatou-se que a concentração de ácido acético teve decréscimo após as 12 horas, tanto para a cultura pura da heterofermentativa como para o cocultivo, podendo dessa forma indagar que ocorreu consumo do metabólito pela heterofermentativa devido a necessidade de um receptor de elétrons, visto que havia a presença de fonte de carbono ainda a ser metabolizada (Figura 55).

Figura 55. Análise de produção e consumo de metabólitos após 24 horas de cultivo da linhagem I3a (heterofermentativa), da linhagem I4a (homofermentativa) e do cocultivo entre as duas linhagens. O meio mínimo foi suplementado com glicose 0,5% + frutose 0,5% + glicerol 0,3% + manitol 0,3%. Na figura consta a composição do M.M. representada na cor amarela para servir como referência.

Em relação a homofermentativa, após as 24 horas havia glicose no meio e o manitol não havia sido metabolizado, mostrando que a linhagem não consome o metabólito se no meio houver ainda açúcares e, além disso mostrou metabolismo mais lento do que a heterofermentativa que havia consumido totalmente os açúcares e já consumia o manitol. Possivelmente isso ocorreu para a homofentativa devido a necessidade de um receptor de elétrons. O glicerol que poderia sustentar o metabolismo da linhagem não foi utilizado, podendo concluir que a linhagem quando em fermentação alcoólica, faz uso de outro metabólito presente no meio, como o malato, por exemplo.

Ao analisar o crescimento em 12 e 24 horas (Figura 56), foi observado que nas 12 primeiras horas a heterofermentativa apresentou absorvância de 3,3 superior a cultura pura da homofermentativa e do cocultivo que apresentaram absorvância de 2,2 e 2,7 respectivamente. Com 24 horas o crescimento foi semelhante devido ao fato de que ambas as linhagens já haviam utilizado grande parte das fontes de açúcares.

Figura 56. Crescimento obtido por D.O. 595 nm em 12 e 24 horas da linhagem I3a (heterofermentativa), I4a (homofermentativa) e o cocultivo entre as linhagens. Foi utilizado M.M. suplementado com glicose 0,5% + frutose 0,5% + glicerol 0,3% + manitol 0,3%.

7. CONCLUSÕES

- O ensaio em tubo Durhan é eficiente para classificação dos *Lactobacillus* em hetero e homofermentativo;
- A linhagem I4a da espécie *L. plantarum* com metabolismo homofermentativo tem o crescimento beneficiado pela glicose enquanto a linhagem I3a da espécie *L. fermentum* com metabolismo heterofermentativo é beneficiada pela frutose;
- Ambas as linhagens são capazes de crescer em meio contendo manitol como única fonte de carbono, contudo, a heterofermentativa apresenta fase lag extensa mostrando uma resposta mais lenta ao metabólito, enquanto a homofermentativa teve crescimento imediato.
- Os açúcares glicose e frutose em combinação com manitol e malato são capazes de promover o crescimento tanto da heterofermentativa quanto da homofermentativa. E ainda, a presença do piruvato apresenta estímulo de crescimento da linhagem heterofermentativa.
- As linhagens estudadas são capazes de metabolizar o manitol, malato e piruvato, contudo, incapazes de metabolizar o glicerol.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, D. A. et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of carboxylic acids: current status and challenges. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 8, p. 1123–1136, 1 dez. 2009.
- ALBERGARIA, H.; ARNEBORG, N. Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 5, p. 2035–2046, 2016.
- ALVES, D. M. . **Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos, bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica**. [s.l.] Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP, 1994.
- ALVES, D. M. . **Respostas fisiológicas de duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* frente ao potássio durante a fermentação alcoólica**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 1997.
- AMORIM, H. V. et al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1267–1275, 2011.
- AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. C. (Eds.). . **Lactic Acid Bacteria Microbiology and Functional Aspects**. [s.l.: s.n.]. p. 1–66.
- BASSO, L.; BASSO, T.; ROCHA, S. Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation. In: **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**. [s.l.] InTech, 2011.
- BASSO, L. C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1155–1163, 1 nov. 2008.
- BASSO, L. C.; DE AMORIM, H. V.; ALVES, D. M. . The antibacterial of succinic acid produced by yeast during fermentation. **Revista de Microbiologia**, p. 77–82, 1997.
- BASSO, T. O. et al. Homo- and heterofermentative lactobacilli differently affect sugarcane-based fuel ethanol fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 105, n. 1, p. 169–177, 2014.
- BAYROCK, D. P.; INGLEDEW, W. M. Inhibition of yeast by lactic acid bacteria in continuous culture: Nutrient depletion and/or acid toxicity? **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 362–368, 2004.
- BECKNER, M.; IVEY, M. L.; PHISTER, T. G. Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 387–394, 2011.

BOINOT F. **Mellet-Boinot**, 1941. Disponível em: <<https://docs.google.com/viewer?url=patentimages.storage.googleapis.com/pdfs/US2230318.pdf>>. Acesso em: 14 mar. 2018

BONATELLI, M. L. Caracterização da comunidade bacteriana contaminante do processo fermentativo para produção de etanol e o impacto no metaboloma da fermentação. p. 1–129, 2016.

BRAGA, R. M.; DOURADO, M. N.; ARAÚJO, W. L. Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. **Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 47 Suppl 1, n. Suppl 1, p. 86–98, dez. 2016.

CAMPBELL, K. et al. Self-establishing communities enable cooperative metabolite exchange in a eukaryote. **eLife**, v. 4, 26 out. 2015.

CARVALHO-NETTO, O. V et al. *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional reprogramming due to bacterial contamination during industrial scale bioethanol production. **Microbial cell factories**, v. 14, p. 13, 30 jan. 2015.

CASPRITZ, G.; RADLER, F. Malolactic enzyme of *Lactobacillus plantarum*. Purification, properties, and distribution among bacteria. **The Journal of biological chemistry**, v. 258, n. 8, p. 4907–10, 25 abr. 1983.

CHANG, IN-SEOP; KIM, B.H.; SHIN, P.K.; LEE, W. K. **Bacterial contamination and its effect on ethanol fermentation** *Journal of microbiology and biotechnology*, 1995.

CHEN, K.-H.; MCFEETERS, R. F.; FLEMING, H. P. Stability of Mannitol to *Lactobacillus plantarum* Degradation in Green Beans Fermented with *Lactobacillus cellobiosus*. **Journal of Food Science**, v. 48, n. 3, p. 972–974, 1 maio 1983.

CHEN, L. et al. Redox Balance in *Lactobacillus reuteri* DSM20016: Roles of Iron-Dependent Alcohol Dehydrogenases in Glucose/ Glycerol Metabolism. **PloS one**, v. 11, n. 12, p. e0168107, 2016.

CHI, Z. et al. Microbial biosynthesis and secretion of L-malic acid and its applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 1, p. 99–107, 2 jan. 2016.

CORSETTI, A.; CIARROCCHI, A.; PRETE, R. Lactic Acid Bacteria: *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus plantarum*. In: **Reference Module in Food Science**. [s.l.] Elsevier, 2016.

COSTA, O. Y. A. et al. Microbial diversity in sugarcane ethanol production in a Brazilian distillery using a culture-independent method. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 1, p. 73–84, 2015.

- COSTA, V. M. et al. Produções de ácido acético, etanol e dos isômeros óticos do ácido lático por linhagens de *Lactobacillus* isoladas de fermentações alcoólicas industriais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 2, p. 503–509, abr. 2008.
- DE AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; LOPES, M. L. Sugar cane juice and molasses, beet molasses and sweet sorghum: composition and usage. In: INGLEDEW, W. M. et al. (Eds.). . **The alcohol textbook: a reference for the beverage, fuel, and industrial alcohol industries**. Nottingham: Nottingham University Press, 2009. p. 39–46.
- DE ANGELIS, M.; GOBBETTI, M. *Lactobacillus* SPP.: General Characteristics. **Reference Module in Food Science**, n. September, 2016.
- DE SOUZA, R. S. C. et al. Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 28774, 30 set. 2016.
- DELLA-BIANCA, B. E. et al. What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 3, p. 979–991, 28 fev. 2013.
- DELLAGLIO, F.; TORRIANI, S.; FELIS, G. E. Reclassification of *Lactobacillus cellobiosus* Rogosa et al. 1953 as a later synonym of *Lactobacillus fermentum* Beijerinck 1901. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY**, v. 54, n. 3, p. 809–812, 1 maio 2004.
- DELLIAS, M. DE T. F. **Comunidade bacteriana dos biofilmes da fermentação alcoólica: estrutura, composição, suscetibilidade aos antimicrobianos e formação de biofilme em culturas puras**. [s.l.] Centro de Energia Nuclear na Agricultura, USP, 2014.
- DOI, Y.; IKEGAMI, Y. Pyruvate formate-lyase is essential for fumarate-independent anaerobic glycerol utilization in the *Enterococcus faecalis* strain W11. **Journal of bacteriology**, v. 196, n. 13, p. 2472–80, jul. 2014.
- FATICENTI, F. et al. Malic acid production and consumption by selected of *Saccharomyces cerevisiae* under anaerobic and aerobic conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 6, p. 427–429, jun. 1984.
- GALLO, C. R. **Determinação de microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 1990.
- GARAI-IBABE, G. et al. Glycerol metabolism and bitterness producing lactic acid bacteria in cidermaking. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, n. 3, p. 253–261, 2008.
- GODOY, A. et al. Continuous and batch fermentation processes: Advantages and disadvantages of these processes in the Brazilian ethanol production. v. 110, n. 1311, p. 175–181, mar. 2008.

GOMES, F. S. **Antagonismo entre leveduras e bactérias lácticas na fermentação alcoólica**. Piracicaba: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 18 dez. 2009.

GROBBEN, G. J. et al. Spontaneous formation of a mannitol-producing variant of *Leuconostoc pseudomesenteroides* grown in the presence of fructose. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2867–70, jun. 2001.

GUTIERREZ, L. E. Produção de glicerol por linhagens de *Saccharomyces* durante a fermentação alcoólica. **Anais da Escola Superior de Agricultura “uiz de Queiroz”**, p. 55–69, 1991.

GUTIERREZ, L. E. **Bioquímica de leveduras**. Piracicaba: [s.n.].

GUTIERREZ, L. E.; ANNICCHINO, A. V. K. O.; LUCATTI, L. capacidade fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* enriquecida com ácidos graxos. **Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, 1990.

JITRAPAKDEE, S. et al. Structure, mechanism and regulation of pyruvate carboxylase. **The Biochemical journal**, v. 413, n. 3, p. 369–87, 1 ago. 2008.

JOUGHTEN, P. et al. *Saccharomyces cerevisiae* metabolism in ecological context. **FEMS yeast research**, v. 16, n. 7, 2016.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial production of lactic acid: the latest development. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 6, p. 967–977, 2016.

KANDLER, O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 49, n. 3, p. 209–224, 1983.

KANG, T. S.; KORBER, D. R.; TANAKA, T. Regulation of dual glycolytic pathways for fructose metabolism in heterofermentative *Lactobacillus panis* PM1. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 24, p. 7818–26, dez. 2013.

KLEEREBEZEM, M. et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 4, p. 1990–5, 18 fev. 2003.

KRUCKEBERG, A. L.; DICKINSON, J. R. **Carbon metabolism**. [s.l.] CRC PRESS, 2004.

LEROI, F.; PIDOUX, M. Characterization of interactions between *Lactobacillus hilgardii* and *Saccharomyces florentinus* isolated from sugary kefir grains. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 74, n. 1, p. 54–60, jan. 1993.

- LIU, S. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, n. 2, p. 115–131, 15 jun. 2003.
- LONVAUD-FUNEL, A. Lactic Acid Bacteria and Malolactic Fermentation in Wine. In: **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2015. p. 231–247.
- LOPES, M. L. et al. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 47 Suppl 1, n. Suppl 1, p. 64–76, dez. 2016.
- LÓPEZ, I. et al. Performance of malolactic fermentation by inoculation of selected *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains isolated from Rioja red wines. **Vitis**, v. 47, n. 2, p. 123–129, 2008.
- LUCENA, B. T. L. et al. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. **BMC Microbiology**, v. 10, 2010.
- MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brook**. Porto Alegre: Artmed, 2016.
- MARQUES, W. L. et al. Sucrose and *Saccharomyces cerevisiae*: a relationship most sweet. **FEMS Yeast Research**, v. 16, n. 1, p. fov107, 1 fev. 2016.
- MCFEETERS, R. F.; CHEN, K. H. Utilization of electron acceptors for anaerobic mannitol metabolism by *Lactobacillus plantarum*. Compounds which serve as electron acceptors. **Food Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 73–81, 1986.
- MERICO, A. et al. Generation of an evolved *Saccharomyces cerevisiae* strain with a high freeze tolerance and an improved ability to grow on glycerol. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 1037–1044, 29 ago. 2011.
- MODIG, T. et al. Anaerobic glycerol production by *Saccharomyces cerevisiae* strains under hyperosmotic stress. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 2, p. 289–296, 2 maio 2007.
- MOZZI, F. et al. Updates on Metabolism in Lactic Acid Bacteria in Light of “Omic” Technologies. **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications**, 2010.
- MOZZI, F.; RAYA, R. R.; VIGNOLO, G. M. **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria - Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria**. [s.l: s.n.].
- MUTHAIYAN, A.; LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, n. 3, p. 351–370, 2011.

- NARENDRANATH, N. V. et al. Effects of lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 11, p. 4158–4163, 1997.
- NARENDRANATH, N. V.; POWER, R. Relationship between pH and medium dissolved solids in terms of growth and metabolism of lactobacilli and *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 5, p. 2239–43, 1 maio 2005.
- NARENDRANATH, N. V.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 171–7, mar. 2001.
- NEVOIGT, E.; STAHL, U. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS microbiology reviews**, v. 21, n. 3, p. 231–41, nov. 1997.
- OLSEN, E. B.; RUSSELL, J. B.; HENICK-KLING, T. Electrogenic L-malate transport by *Lactobacillus plantarum*: A basis for energy derivation from malolactic fermentation. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 19, p. 6199–6206, 1991.
- ORTIZ, M. E. et al. Global analysis of mannitol 2-dehydrogenase in *Lactobacillus reuteri* crl 1101 during mannitol production through enzymatic, genetic and proteomic approaches. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–21, 2017.
- PACZIA, N. et al. Extensive exometabolome analysis reveals extended overflow metabolism in various microorganisms. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 1, p. 122, 11 set. 2012.
- PASSOS, F. V. et al. Effect of malic acid on the growth kinetics of *Lactobacillus plantarum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, n. 2, p. 207–211, 1 dez. 2003.
- PELCZAR, J. M. J. et al. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. Pearson ed. [s.l.: s.n.].
- PINES, O. et al. The cytosolic pathway of L-malic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of fumarase. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 46, n. 4, p. 393–9, nov. 1996.
- PONOMAROVA, O. et al. Yeast Creates a Niche for Symbiotic Lactic Acid Bacteria through Nitrogen Overflow. **Cell systems**, v. 5, n. 4, p. 345–357.e6, 25 out. 2017.
- PRETZER, G. et al. Biodiversity-based identification and functional characterization of the mannose-specific adhesin of *Lactobacillus plantarum*. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 17, p. 6128–36, 1 set. 2005.
- PRONK, J. T.; YDE STEENSMA, H.; VAN DIJKEN, J. P. Pyruvate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 12, n. 16, p. 1607–1633, 1 dez. 1996.

- REIS, V. R. et al. Effects of feedstock and co-culture of *Lactobacillus fermentum* and wild *Saccharomyces cerevisiae* strain during fuel ethanol fermentation by the industrial yeast strain PE-2. **AMB Express**, v. 8, n. 1, p. 23, 16 fev. 2018.
- RICH, J. O. et al. Resolving bacterial contamination of fuel ethanol fermentations with beneficial bacteria – An alternative to antibiotic treatment. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 357–362, 1 jan. 2018.
- RIVALDI, J. D. et al. Metabolism of biodiesel-derived glycerol in probiotic *Lactobacillus* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 4, p. 1735–1743, 11 fev. 2013.
- SAAYMAN, M.; VILJOEN-BLOOM, M. The Biochemistry of Malic Acid Metabolism by Wine Yeasts -A Review. **The Biochemistry of Malic Acid Metabolism by Wine Yeasts -A Review**, p. 113–122, 2006.
- SCHWARTZ, H.; RADLER, F. Formation of l(-)-malate by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 5–6, p. 553–560, fev. 1988.
- SIGEL, H.; SIGEL, A. **Metalloenzymes involving amino acid-residue and related radicals**. [s.l.] M. Dekker, 1994.
- SILVA-FILHO, E. A. DA et al. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 88, n. 1, p. 13–23, jul. 2005.
- SOLOMON, S. Post-harvest deterioration of sugarcane. **Sugar Tech**, v. 11, n. 2, p. 109–123, 2009.
- STEWART, G. G. SACCHAROMYCES | *Saccharomyces cerevisiae*. In: **Encyclopedia of Food Microbiology**. [s.l.] Elsevier, 2014. p. 309–315.
- STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W. H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International journal of food microbiology**, v. 36, n. 1, p. 1–29, 29 abr. 1997.
- STOLZ, P. et al. Utilization of electron acceptors by lactobacilli isolated from sourdough. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**, v. 201, n. 1, p. 91–96, jan. 1995.
- STRUCKO, T. et al. Laboratory evolution reveals regulatory and metabolic trade-offs of glycerol utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 47, p. 73–82, 1 maio 2018.
- SUMBY, K. M.; GRBIN, P. R.; JIRANEK, V. Implications of new research and technologies for malolactic fermentation in wine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 19, p. 8111–8132, 21 out. 2014.

- TALARICO, T. L. et al. Utilization of Glycerol as a Hydrogen Acceptor by *Lactobacillus reuteri*: Purification of 1,3-Propanediol:NAD Oxidoreductase. **Applied and environmental microbiology**, v. 56, n. 4, p. 943–8, abr. 1990.
- THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Effect of lactobacilli on yeast growth, viability and batch and semi-continuous alcoholic fermentation of corn mash. **Journal of applied microbiology**, v. 90, n. 5, p. 819–28, maio 2001.
- TORTORA, G. D.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology: an introduction**. 10. ed. New York: Person Benjamin Cummings, 2010.
- TREVELYAN, W. E.; HARRISON, J. S. Studies on yeast metabolism. III. The intracellular level of pyruvate during yeast fermentation. **The Biochemical journal**, v. 57, n. 4, p. 556–61, ago. 1954.
- TSUJI, A. et al. Metabolic engineering of *Lactobacillus plantarum* for succinic acid production through activation of the reductive branch of the tricarboxylic acid cycle. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 53, n. 2, p. 97–103, 2013.
- UNICA. **No Title**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/>>. Acesso em: 5 maio. 2018.
- VAN DIJKEN, J. P.; SCHEFFERS, W. A. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. **FEMS Microbiology Letters**, v. 32, n. 3–4, p. 199–224, 1 abr. 1986.
- VITAL, S. **Relações tróficas entre *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus* sp. nas condições da fermentação alcoólica industrial**. Piracicaba: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 16 out. 2013.
- VON WEYMARN, N.; HUJANEN, M.; LEISOLA, M. Production of D-mannitol by heterofermentative lactic acid bacteria. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 11, p. 1207–1213, 2002.
- WAGNER, N. et al. Pyruvate fermentation by *Oenococcus oeni* and *Leuconostoc mesenteroides* and role of pyruvate dehydrogenase in anaerobic fermentation. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 9, p. 4966–71, set. 2005.
- WANG, Q. et al. Screening of pyruvate-producing yeast and effect of nutritional conditions on pyruvate production. **Letters in applied microbiology**, v. 35, n. 4, p. 338–42, 2002.
- WANG, Z. et al. Glycerol production by microbial fermentation: A review. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 3, p. 201–223, 1 jun. 2001.
- WHEALS, A. E. et al. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Biotechnology**, v. 17, n. 12, p. 482–487, 1 dez. 1999.

- WHITING, G. C. ORGANIC ACID METABOLISM OF YEASTS DURING FERMENTATION OF ALCOHOLIC BEVERAGES—A REVIEW. v. 82, p. 84–92, 1976.
- WIEBE, M. G. et al. Central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic, oxygen-limited and fully aerobic steady-state conditions and following a shift to anaerobic conditions. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 1, p. 140–154, 1 fev. 2008.
- WISSELINK, H. W. et al. Mannitol production by lactic acid bacteria : A review. v. 6946, n. October 2016, p. 151–161, 2002.
- WYATT, B. N.; ARNOLD, L. A.; ST. MAURICE, M. A high-throughput screening assay for pyruvate carboxylase. **Analytical Biochemistry**, 12 abr. 2018.
- YABARRENA, J. M. S. C. **Modelagem do processo de fermentação etanólica com interferência de bactérias heterofermentativa e homofermentativa**. São Carlos: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 4 maio 2012.
- YE, N. et al. L-(–)-Malic Acid Production by *Saccharomyces* spp. during the Alcoholic Fermentation of Wine (1). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 912–919, 2007.
- YÉRAMIAN, N.; CHAYA, C.; SUÁREZ LEPE, J. A. 1 -(–)-Malic Acid Production by *Saccharomyces* spp. during the Alcoholic Fermentation of Wine (1). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 3, p. 912–919, 7 fev. 2007.
- YU, K. O.; KIM, S. W.; HAN, S. O. Reduction of glycerol production to improve ethanol yield in an engineered *Saccharomyces cerevisiae* using glycerol as a substrate. **Journal of Biotechnology**, v. 150, n. 2, p. 209–214, 15 out. 2010.
- ZABED, H. et al. Bioethanol production from fermentable sugar juice. **TheScientificWorldJournal**, v. 2014, p. 957102, 2014.
- ZHANG, L. et al. Engineering of the glycerol decomposition pathway and cofactor regulation in an industrial yeast improves ethanol production. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 40, n. 10, p. 1153–60, out. 2013.