**VIABILIDADE CELULAR DE *Saccharomyces cerevisiae*
CULTIVADA EM ASSOCIAÇÃO COM BACTÉRIAS
CONTAMINANTES DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA**

THAIS DE PAULA NOBRE

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de Concentração: Ciências e Tecnologia de
Alimentos.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo – Brasil
Agosto – 2005

**VIABILIDADE CELULAR DE *Saccharomyces cerevisiae*
CULTIVADA EM ASSOCIAÇÃO COM BACTÉRIAS
CONTAMINANTES DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA**

THAIS DE PAULA NOBRE

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **ANDRÉ RICARDO ALCARDE**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de Concentração: Ciências e Tecnologia de
Alimentos.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo – Brasil

Agosto - 2005

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Nobre, Thais de Paula

Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. / Thais de Paula Nobre. - - Piracicaba, 2005.
90p.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005.

1. Bacilos 2. Fermentação alcoólica 3. Lactobacillus 4. Leveduras 5. Saccharomyces
I. Título

CDD 660.28449

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais, **AMAURY** e **MARIA LINA**,
pela confiança depositada, pela
oportunidade de estudo e apoio nas horas
mais difíceis.

OFEREÇO.

Aos meus irmãos, **HOMERO** e **NATÁLIA**,
e ao **GUILHERME**, pelo companheirismo,
carinho e apoio desde o início.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela existência e força para completar mais esta etapa da vida.

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), em especial ao Campus de Ciências Agrárias (CCA), pela formação profissional e apoio de seus funcionários e professores.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), em especial ao Departamento de Agroindústria Alimentos e Nutrição (LAN) pelo apoio de seus funcionários e professores.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudos concedida durante o curso de mestrado.

Ao Prof. Dr. André Ricardo Alcarde, pela orientação e apoio durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Jorge Horii, pela amizade, orientação e incentivo durante a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Sônia Maria de Stefano Piedade pela colaboração nas análises estatísticas.

À Profa. Dra. Sandra Helena da Cruz e ao Prof. Dr. Jorge José Corrêa Lopes pelas valiosas sugestões.

Às bibliotecárias Beatriz Helena Giongo e Midiam Gustinelli, pela amizade e auxílio na organização das referências bibliográficas.

Ao funcionário do Departamento de Agroindústria Alimentos e Nutrição (LAN), Luiz Carlos Rodrigues pelo auxílio na elaboração das figuras.

À todos os funcionários e técnicos do Setor de Açúcar e Álcool do Departamento de Agroindústria Alimentos e Nutrição (LAN), em especial à Daniele, Dito, Fábio, Flora, Gil, Joana, Pedrinho, Regina, Rose, Sylvino e Vana, pelo auxílio, amizade e incentivo.

À todos amigos(as), Ana Claudia, André, Antonio, Caio, Cindy, Giuliano, José Rubens, Mariana, Mateus, Murilo, Nilo, Pamela e Vivian, pelo apoio em todos os momentos.

À todos meus familiares que me ajudaram nos momentos de alegria e tristeza.

À todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xvii
SUMMARY	xix
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Contaminantes do processo de produção de etanol	4
2.2 Influência dos contaminantes	6
2.3 Interação entre bactérias e leveduras	8
2.4 Controle dos contaminantes do processo de produção de etanol	10
2.5 Metodologias alternativas de cultivo de microrganismos	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Microrganismos	14
3.2 Meios de cultivo para manutenção, reativação, crescimento e plaqueamento dos microrganismos	14
3.3 Cultivo dos microrganismos	15
3.3.1 Cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
3.3.2 Cultivo das bactérias	17
3.4 Procedimento para obtenção de culturas mistas de bactérias e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
3.4.1 Culturas mistas com bactérias ativas	19
3.4.2 Culturas mistas com bactérias tratadas	19
3.5 Determinações físico-químicas	23

3.5.1 Determinação da acidez total.....	23
3.5.2 Determinação da acidez volátil	24
3.5.3 Determinação do pH	25
3.6 Determinações microbiológicas	25
3.6.1 Viabilidade celular, brotamento e população de células da levedura <i>S. cerevisiae</i>	25
3.6.2 Plaqueamentos dos microrganismos	26
3.7 Análise estatística	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1 Cultivos mistos de <i>S. cerevisiae</i> e bactérias ativas.....	28
4.2 Cultivos mistos de <i>S. cerevisiae</i> e bactérias tratadas	42
5 CONCLUSÕES.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
APENDICE.....	78

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Esquema do cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
2 Esquema do cultivo das bactérias.	18
3 Procedimento para obtenção de culturas mistas de bactérias ativas e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
4 Procedimento para obtenção de culturas mistas de bactérias tratadas e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
5 Variações das determinações físico-químicas durante o cultivo misto de <i>S. cerevisia</i> com as bactérias ativas.....	30
6 Variações das determinações microbiológicas durante o cultivo misto de <i>S. cerevisia</i> com as bactérias ativas.....	36
7 Variações das determinações físico-químicas durante o cultivo misto de <i>S. cerevisia</i> com as bactérias tratadas pelo calor úmido.	47
8 Variações das determinações físico-químicas durante o cultivo misto de <i>S. cerevisia</i> com as bactérias tratadas pelo antimicrobiano Kamoran HJ.....	48
9 Variações das determinações físico-químicas durante o cultivo misto de <i>S. cerevisia</i> com as bactérias tratadas por irradiação.	49
10 Variações das determinações microbiológicas durante o cultivo misto de <i>S. cerevisia</i> com as bactérias tratadas pelo calor úmido	56
11 Variações das determinações microbiológicas durante o cultivo misto de <i>S. cerevisia</i> com as bactérias tratadas pelo antimicrobiano Kamoran HJ.....	57

12 Variações das determinações microbiológicas durante o cultivo misto de <i>S. cerevisia</i> com as bactérias tratadas com irradiação	58
---	----

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Contagem bacteriana inicial e final dos cultivos mistos de bactérias ativas e leveduras	29
2 Teste de Tukey para as médias de acidez total comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de <i>S. cerevisiae</i> e bactérias ativas	32
3 Teste de Tukey para as médias de acidez volátil comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de <i>S. cerevisiae</i> e bactérias ativas	32
4 Teste de Tukey para as médias de pH, comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de <i>S. cerevisiae</i> e bactérias ativas	32
5 Teste de Tukey para as médias de viabilidade celular de <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> , comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de <i>S. cerevisiae</i> e bactérias ativas	37
6 Teste de Tukey para as médias de taxa de brotamento de <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> , comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de <i>S. cerevisiae</i> e bactérias ativas	38
7 Teste de Tukey para as médias de população de células de <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> , comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de <i>S. cerevisiae</i> e bactérias ativas	39
8 Eficiência do tratamento calor úmido	43
9 Eficiência do tratamento antimicrobiano com Kamoran HJ	43
10 Eficiência do tratamento irradiação	43

11 Contagem bacteriana inicial e final dos cultivos mistos de bactérias tratadas com antimicrobiano Kamoran HJ e <i>S. cerevisiae</i>	45
12 Contagem bacteriana inicial e final dos cultivos mistos de bactérias tratadas com radiação gama e <i>S. cerevisiae</i>	45
13 Teste de Tukey para as médias de acidez total, comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de <i>S. cerevisiae</i> e bactérias tratadas com calor	51
14 Teste de Tukey para as médias de acidez total, comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de <i>S. cerevisiae</i> e bactérias tratadas com Kamoran HJ	51
15 Teste de Tukey para as médias de acidez total, comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de <i>S. cerevisiae</i> e bactérias tratadas com irradiação	51
16 Teste de Tukey para as médias de acidez volátil, comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de <i>S. cerevisiae</i> e bactérias tratadas com calor	52
17 Teste de Tukey para as médias de acidez volátil, comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de <i>S. cerevisiae</i> e bactérias tratadas com Kamoran HJ	53
18 Teste de Tukey para as médias de acidez volátil, comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de <i>S. cerevisiae</i> e bactérias tratadas com irradiação	53
19 Teste de Tukey para as médias de pH, comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de <i>S. cerevisiae</i> e bactérias tratadas com calor	54
20 Teste de Tukey para as médias de pH, comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de <i>S. cerevisiae</i> e bactérias tratadas com Kamoran HJ	54

21	Teste de Tukey para as médias de pH, comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de <i>S. cerevisiae</i> e bactérias tratadas com irradiação	55
22	Teste de Tukey para as médias de viabilidade celular de <i>S. cerevisiae</i> , comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de <i>S. cerevisiae</i> e bactérias tratadas com calor	59
23	Teste de Tukey para as médias de viabilidade celular de <i>S. cerevisiae</i> , comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de <i>S. cerevisiae</i> e bactérias tratadas com Kamoran HJ	60
24	Teste de Tukey para as médias de viabilidade celular de <i>S. cerevisiae</i> , comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de <i>S. cerevisiae</i> e bactérias tratadas com irradiação	60
25	Teste de Tukey para as médias de taxa de brotamento de <i>S. cerevisiae</i> , comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de <i>S. cerevisiae</i> e bactérias tratadas com calor	61
26	Teste de Tukey para as médias de taxa de brotamento de <i>S. cerevisiae</i> , comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de <i>S. cerevisiae</i> e bactérias tratadas com Kamoran HJ	61
27	Teste de Tukey para as médias de taxa de brotamento de <i>S. cerevisiae</i> , comparando os microrganismos e os períodos, quando em cultura mista de <i>S. cerevisiae</i> e bactérias tratadas com irradiação	62
28	Teste de Tukey para as médias de população de células de <i>S. cerevisiae</i> , comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de <i>S. cerevisiae</i> e bactérias tratadas com calor	62

29	Teste de Tukey para as médias de população de células de <i>S. cerevisiae</i> , comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de <i>S. cerevisiae</i> e bactérias tratadas com Kamoran HJ	63
30	Teste de Tukey para as médias de população de células de <i>S. cerevisiae</i> , comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de <i>S. cerevisiae</i> e bactérias tratadas com irradiação	63
31	Comparação dos meios de cultivo convencionais e alternativo (MCC-agar) nas contagens microbiológicas no início (0 h) e ao final (72 h) do período de incubação das culturas mistas de bactérias e <i>S. cerevisiae</i>	66
32	Resultados das determinações físico-químicas e microbiológicas do 1º ensaio dos cultivos mistos de <i>S. cerevisiae</i> com bactérias ativas	79
33	Resultados das determinações físico-químicas e microbiológicas do 2º ensaio dos cultivos mistos de <i>S. cerevisiae</i> e com bactérias ativas	80
34	Resultados das determinações físico-químicas e microbiológicas do 3º ensaio dos cultivos mistos de <i>S. cerevisiae</i> com bactérias ativas	81
35	Resultados das determinações físico-químicas e microbiológicas do 1º ensaio realizado com os cultivos mistos de <i>S. cerevisiae</i> com bactérias tratadas com calor úmido	82
36	Resultados das determinações físico-químicas e microbiológicas do 2º ensaio realizado com os cultivos mistos de <i>S. cerevisiae</i> com bactérias tratadas com calor úmido	83
37	Resultados das determinações físico-químicas e microbiológicas do 1º ensaio realizado com os cultivos mistos de <i>S. cerevisiae</i> com bactérias tratadas com antimicrobiano Kamoran HJ.....	84

38 Resultados das determinações físico-químicas e microbiológicas do 2º ensaio realizado com os cultivos mistos de <i>S. cerevisiae</i> com bactérias tratadas com antimicrobiano Kamoran HJ.....	85
39 Resultados das determinações físico-químicas e microbiológicas do 1º ensaio realizado com os cultivos mistos de <i>S. cerevisiae</i> com bactérias tratadas com radiação gama	86
40 Resultados das determinações físico-químicas e microbiológicas do 2º ensaio realizado com os cultivos mistos de <i>S. cerevisiae</i> com bactérias tratadas com radiação gama	87
41 Média geral, R^2 , coeficiente de variação e desvio padrão para as variáveis quando em cultivo misto de bactérias ativas e <i>S.</i> <i>cerevisiae</i>	88
42 Média geral, R^2 , coeficiente de variação e desvio padrão para as variáveis em cultivo misto de bactérias tratadas com calor e <i>S.</i> <i>cerevisiae</i>	88
43 Média geral, R^2 , coeficiente de variação e desvio padrão para as variáveis quando em cultivo misto de bactérias tratadas com Kamoran HJ e <i>S. cerevisiae</i>	88
44 Média geral, R^2 , coeficiente de variação e desvio padrão para as variáveis quando em cultivo misto de bactérias tratadas com irradiação e <i>S. cerevisiae</i>	88
45 Quadrado Médio (Q.M.) da análise de variância, seguido da significância do teste F dos fatores Microrganismo (Micro), Período (Per) e Interação (Micro * Per) para todas as variáveis em cultivo misto de bactérias ativas e <i>S. cerevisiae</i>	89
46 Quadrado Médio (Q.M.) da análise de variância, seguido da significância do teste F dos fatores Microrganismo (Micro), Período (Per) e Interação (Micro * Per) para todas as variáveis em cultivo misto de bactérias tratadas com calor e <i>S. cerevisiae</i>	89

47	Quadrado Médio (Q.M.) da análise de variância, seguido da significância do teste F dos fatores Microrganismo (Micro), Período (Per) e Interação (Micro * Per) para todas as variáveis em cultivo misto de bactérias tratadas com Kamoran HJ e <i>S. cerevisiae</i>	89
48	Quadrado Médio (Q.M.) da análise de variância, seguido da significância do teste F dos fatores Microrganismo (Micro), Período (Per) e Interação (Micro * Per) para todas as variáveis em cultivo misto de bactérias tratadas com irradiação e <i>S. cerevisiae</i>	89
49	Média geral, R^2 , coeficiente de variação e desvio padrão para as contagens microbiológicas quando em comparação dos meios de cultivo convencionais e alternativo (MCC-agar) no início (0 h) do período de incubação das culturas mistas de bactérias e <i>S. cerevisiae</i>	90
50	Média geral, R^2 , coeficiente de variação e desvio padrão para as contagens microbiológicas quando em comparação dos meios de cultivo convencionais e alternativo (MCC-agar) no final (72 h) do período de incubação das culturas mistas de bactérias e <i>S. cerevisiae</i>	90
51	Quadrado Médio (Q.M.) da análise de variância, seguido da significância do teste F para as contagens microbiológicas quando em comparação dos meios de cultivo convencionais e alternativo (mcc-agar) no início (0 h) do período de incubação das culturas mistas de bactérias e <i>S. cerevisiae</i>	90

52	Quadrado Médio (Q.M.) da análise de variância, seguido da significância do teste F para as contagens microbiológicas quando em comparação dos meios de cultivo convencionais e alternativo (mcc-agar) no final (72 h) do período de incubação das culturas mistas de bactérias e <i>S. cerevisiae</i>	90
----	---	----

VIABILIDADE CELULAR DE *Saccharomyces cerevisiae* CULTIVADA EM ASSOCIAÇÃO COM BACTÉRIAS CONTAMINANTES DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Autora: THAIS DE PAULA NOBRE

Orientador: Prof. Dr. ANDRÉ RICARDO ALCARDE

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar a influência de bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus*, bem como de seus produtos metabólicos, na redução da viabilidade celular *Saccharomyces cerevisiae*, quando em cultura mista de levedura e bactérias ativas e tratadas. Também foi avaliado um meio alternativo de cultivo de bactérias e leveduras, constituído de caldo de cana diluído a 5° brix e suplementado com extrato de levedura e peptona. As bactérias *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus stearothermophilus*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus plantarum* foram cultivadas em associação com *Saccharomyces cerevisiae* (cepa Y-904) por 72 h a 32°C, sob agitação. A viabilidade celular, a taxa de brotamento e a população de células da levedura, a acidez total, a acidez volátil e o pH do meio foram determinados às 0, 24, 48 e 72 h do cultivo misto. Também foi determinada a população inicial e final dos microrganismos através de plaqueamento em profundidade, em meio de cultivo tradicional (PCA para os *Bacillus*, MRS-agar para os *Lactobacillus* e YEPD-agar para *S. cerevisiae*) e no meio constituído de caldo de cana. As

culturas de bactéria foram tratadas através do calor (esterilização em autoclave a 120°C por 20 minutos), de agente antimicrobiano (Kamoran HJ na concentração de 3,0 ppm) ou da irradiação (radiação gama, com doses de 5,0 kGy para os *Lactobacillus* e 15,0 kGy para os *Bacillus*). Os resultados mostraram que apenas os meios de cultivo mais acidificados (com maiores concentrações de acidez total e volátil, e menores valores de pH), contaminados com as bactérias ativas *L. fermentum* e *B. subtilis*, provocaram diminuição da viabilidade celular da levedura. Excetuando a bactéria *B. subtilis* inativada por radiação, as demais bactérias tratadas pelos diferentes processos (calor, radiação e antimicrobiano) não causaram diminuição da viabilidade celular e da população das leveduras, indicando que a presença isolada dos metabólitos celulares dessas bactérias não foi suficiente para reduzir a porcentagem de células vivas e a densidade populacional da levedura. Para todos os microrganismos, as contagens obtidas com o cultivo em meio à base de caldo de cana foram semelhantes às obtidas nos meios tradicionais, provavelmente porque o meio alternativo simula a composição do mosto de caldo de cana-de-açúcar, do qual as bactérias foram isoladas do processo industrial de produção de etanol. Sendo assim, o meio de cultivo à base de caldo de cana-de-açúcar pôde substituir os meios tradicionais de cultivo da levedura e das bactérias testadas neste trabalho.

CELLULAR VIABILITY OF *Saccharomyces cerevisiae* CULTIVATED IN ASSOCIATION WITH CONTAMINATES BACTERIAS OF ALCOHOLIC FERMENTATION

Author: THAIS DE PAULA NOBRE

Adviser: Prof. Dr. ANDRÉ RICARDO ALCARDE

SUMMARY

The aim of this work was to study the influence of the bacteria *Bacillus* and *Lactobacillus*, as well as their metabolic products, in reduction of cellular viability of *Saccharomyces cerevisiae*, when in mixed culture of yeast and active and treated bacteria. Also was to evaluated an alternative medium (MCC) for the cultivation of bacteria and yeast, constituted of sugarcane juice diluted to 5° Brix and supplemented with yeast extract and peptone. The bacteria *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus stearothermophilus*, *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus plantarum* were cultivated in association with yeast *Saccharomyces cerevisiae* (strain Y-904) for 72 h on 32°C, under agitation. The cellular viability, budding rate and population of *S. cerevisiae*, the total acidity, volatile acidity and pH of culture were determined from 0, 24, 48 e 72 h of mixed culture. Also were determined the initial and final of microorganism population across the pour plate method, in traditional culture medium (PCA for *Bacillus*, MRS-agar for *Lactobacillus* and YEPD-agar for yeast *S. cerevisiae*) and in medium constituted of sugarcane juice. The bacteria cultures were treated by heat sterilization (120°C for 20 minutes), antibacterial agent (Kamoran HJ in

concentration 3,0 ppm) or irradiation (radiation gama, with doses of 5,0 kGy for *Lactobacillus* and 15,0 kGy for *Bacillus*). The results of the present research showed that just the culture mediums more acids (with higher concentrations of total and volatile acidity, and smaller values of pH), contaminated with active bacteria *L. fermentum* and *B. subtilis*, caused reduction on yeast cellular viability. Except the bacteria *B. subtilis* treated with radiation, the others bacteria treated by different procedures (heat, radiation e antibacterial) did not cause reduction on yeast cellular viability and population, indicating that the isolated presence of the cellular metabolic of theses bacteria was not enough to reduce the percentage of the yeast live cells and a density population. For all microorganisms, the counts obtained with the cultivation medium constituted of sugarcane juice were similar obtained in traditional mediums, probably because the alternative medium simulate the composition of sugarcane must, that the bacteria were isolated in industrial process of ethanol yield. However, the culture medium constituted of sugarcane juice could be replacing traditional culture mediums of yeast and bacteria tested in this work.

1 INTRODUÇÃO

A agroindústria do álcool, juntamente com a da aguardente, representa um considerável gerador econômico, sendo o setor de suma importância para o país. O Brasil tornou-se o primeiro país do mundo a desenvolver um programa de combustível alternativo em substituição à gasolina, e é o maior produtor de aguardente. Como toda a produção de álcool e de aguardente ocorre por via fermentativa, é fundamental, o conhecimento do processo que tem sido constantemente aprimorado.

A fermentação etanólica é um processo conduzido por leveduras. Entre essas, o gênero *Saccharomyces*, representado por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, tem se adaptado, muito bem, às condições industriais. Entretanto, os microrganismos do ambiente que aderem à cana-de-açúcar, constituem a carga microbiana contaminante do processo e podem atingir níveis que são prejudiciais à produção de álcool.

A infecção na fermentação pode causar danos como: consumo de açúcar; formação de goma, que aumenta a viscosidade do caldo e pode causar entupimento nas tubulações, centrífugas, peneiras e trocadores de calor; floculação do fermento, que diminui a velocidade de fermentação, acarreta perda de células de leveduras pelo fundo da dorna e dificulta a operação das centrífugas; inibição e queda da viabilidade das leveduras devido às toxinas e ácidos orgânicos excretados no meio e, conseqüentemente a redução no rendimento e na produtividade da fermentação (Alterthum et al., 1984; Amorim et al., 1981; Amorim & Oliveira, 1982; Euchi et al., 1989; Yokoya, 1991).

Frente à importância destes contaminantes, têm sido realizados trabalhos no sentido de isolar e caracterizar os microrganismos para que se possa combatê-los do processo. Estes trabalhos mostram que as bactérias do grupo Gram-positivo são os microrganismos contaminantes que predominam na fermentação alcoólica, sendo os gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus* os de maior ocorrência (Gallo, 1989; Gallo e Canhos, 1991; Rodini, 1985; Rosales, 1989; Skinner e Leathers, 2004).

Os métodos tradicionais empregados pela indústria sucro-alcooleira para o tratamento do mosto com o objetivo de reduzir a sua carga microbiana contaminante preconizam o uso de antibióticos e de ácido sulfúrico concentrado. A sensibilidade das bactérias contaminantes frente a novos agentes antimicrobianos tem sido largamente estudada (Alcarde, 1995; Alcarde, 2000; Oliveira et al., 1996; Stupiello, 1993). Porém, o mecanismo da interação bactéria-levedura e o meio de cultura são ainda pouco conhecidos, principalmente com relação à influência da bactéria e das transformações do meio sobre a viabilidade celular da levedura.

O desenvolvimento de técnicas mais simples, acessíveis e econômicas de cultivo de microrganismos têm sido objetivo de pesquisas atuais (Taniwaki, 1996). Meios de cultura caros e de composição complexa, principalmente os indicados para o crescimento de *Lactobacillus*, podem ser substituídos por meios à base de caldo de cana-de-açúcar suplementado, tornando a metodologia de plaqueamento mais econômica e acessível (Freguglia, 1997; Horii, 1983).

O presente trabalho teve como objetivos:

- Avaliar a influência de bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus*, bem como de seus produtos metabólicos, na redução da viabilidade celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, quando em cultura mista de levedura e bactérias.
- Estudar o cultivo de bactérias e levedura em um meio alternativo constituído de caldo de cana diluído a 5° brix e suplementado com extrato

de levedura e peptona. E testar se os tradicionais meios de cultivo dos microrganismos testados podem ser substituídos por meio de cultura à base de caldo de cana-de-açúcar suplementado, o qual é mais econômico e acessível.

A influência dos produtos metabólicos sobre a viabilidade celular da levedura foi estudada através de cultivo misto de levedura ativa e bactérias tratadas por calor, antimicrobiano e irradiação. Com isso, testou-se a hipótese de tanto as bactérias contaminantes da fermentação alcoólica quanto os seus produtos metabólicos exercerem influência negativa sobre a viabilidade celular da levedura fermentativa, variando conforme as condições de acidez do meio.

Os parâmetros analisados foram: pH, acidez total e volátil do meio, e viabilidade celular, taxa de brotamento e população de células da levedura.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Contaminantes do processo de produção de etanol

Leveduras e bactérias lácticas são freqüentemente encontradas juntas em ecossistemas naturais e podem competir pelos mesmos nutrientes (Alexander, 1971).

Não é recente a preocupação de muitos autores com a contaminação bacteriana no processo de extração de caldo e na indústria da fermentação alcoólica, particularmente na produção de bebidas, sendo importante ressaltar os trabalhos de Pasteur no fim do século retrasado com cervejas e vinhos contaminados, que permitiram grande desenvolvimento da microbiologia (de acordo com o artigo Controle..., 1983).

Amorim & Oliveira (1982) citam como principais contaminantes da fermentação alcoólica, bactérias dos gêneros *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus*.

Estudos de Rodini (1985) em mosto fermentado constataram uma contaminação de até 10^7 bactérias por mL. As bactérias Gram-positivas abrangeram 65% do total, sendo 62% delas pertencentes ao gênero *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. megaterium* e *B. coagulans*). Silva (1988), estudando a microbiota bacteriana do caldo clarificado, pasteurizado e pré-resfriado, encontrou bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Bacillus*, com cerca de 38 %, 12 % e 3 %, respectivamente.

Numa amostragem das etapas da fermentação, os gêneros que predominaram no processo foram *Lactobacillus* (45,04%), *Leuconostoc* (14,41%),

Bacillus (9,46%), *Acetobacter* (7,21%), *Enterobacter* (6,75%) e *Sporolactobacillus* (3,60%), entre outros (Rosales, 1989).

Gallo (1989) constatou a predominância de bactérias Gram-positivas (98,52%), de bastonetes (87,76%) e de não esporulados (73,95%) num estudo de caracterização da microbiota bacteriana em amostras de leite de levedura diluído antes e após o tratamento ácido, de mosto de alimentação e de vinho final. O mesmo autor, concluiu que o gênero *Lactobacillus* foi o mais freqüente (59,75%), com a identificação de: *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. plantarum*, *L. buchneri* e *L. acidophilus*, entre outros. E o gênero *Bacillus* correspondeu a 26,58% das bactérias identificadas, com as seguintes espécies: *B. coagulans*, *B. stearothermophilus*, *B. megaterium*, *B. brevis*, *B. lentus* e *B. pasteurii*.

Análises em leite de levedura sem tratamento ácido apresentaram *L. fermentum* (62%), *L. murinus* (9%), *L. vaccinoferus* (9%), *L. plantarum* (2%) e *Leuconostoc* (2%) (Oliva-Neto, 1990).

Resultados do estudo de caracterização da microbiota contaminante da produção de álcool combustível utilizando o milho como matéria-prima, demonstraram que prevalecem bactérias lácticas, particularmente *Lactobacillus* sp. com cerca de 40 % dos contaminantes totais isolados. Outros isolados presentes com menos freqüência incluem os gêneros *Clostridium*, *Eubacterium*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, e *Weisella*, segundo Skinner e Leathers (2004).

A maioria dos trabalhos identificou e tornou evidente a predominância de bactérias Gram-positiva e em forma de bastonetes no processo industrial de fermentação alcoólica, com destaque para os gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus*.

Contudo, além da possível contaminação da matéria-prima proveniente do campo, as condições peculiares das etapas do processo de cada indústria selecionam determinadas espécies ou linhagens de microrganismos que são favorecidos por tais condições e que não são problemas em outras destilarias (Cherubin, 2003).

2.2 Influência dos contaminantes

De acordo com a equação estequiométrica de Gay-Lussac, citado por Kunkee e Amerine (1970), o rendimento da fermentação alcoólica é expresso em quantidade de produto formado (etanol) por unidade de açúcar consumido. Em função disto, todo açúcar que não é convertido em álcool, e sim em outros produtos, faz com que ocorra uma diminuição neste rendimento.

O consumo da sacarose resultando na formação dos ácidos láctico e acético, como os principais ácidos orgânicos formados, é um dos principais prejuízos causados pelas bactérias contaminantes no processo de produção de etanol (Bevan e Bond, 1971). Outros compostos como a formação de goma, que aumenta a viscosidade do caldo e pode causar entupimento nas tubulações, centrífugas, peneiras e trocadores de calor; a floculação do fermento, que diminui a velocidade de fermentação, acarreta perda de células de leveduras pelo fundo da dorna e dificulta a operação das centrífugas também são associados por diversos autores à perdas no rendimento alcoólico (Alterthum et al., 1984; Amorim & Oliveira, 1982; Amorim et al., 1981; Euchí et al., 1989; Oliva-Neto e Yokoya, 1997; Yokoya, 1991).

Amorim et al. (1981) citaram que, quando a contaminação bacteriana atinge níveis superiores a $1,0 \times 10^7$ células/mL de mosto, pode ocorrer uma significativa queda no rendimento alcoólico. Os autores associaram às bactérias contaminantes perdas a níveis de até 55% do valor teórico. Alterthum et al. (1984) verificaram quedas no rendimento alcoólico variável de 14 a 90% do teórico quando a concentração bacteriana atingiu 10^8 a 10^9 células/mL.

Amorim & Oliveira (1982) citaram que as bactérias contaminantes causam prejuízos à fermentação e inibem o crescimento da levedura através da produção de ácido láctico e outros ácidos orgânicos. Os autores constataram queda de 60% no rendimento de fermentações com valores de acidez entre 5 e 6 g/L; o não controle da contaminação bacteriana pode ocasionar indiretamente um abaixamento no rendimento da fermentação por dois motivos: aumento da

viscosidade do vinho, ocasionando uma maior perda do fermento no vinho centrifugado e maior consumo de açúcar, desviando-o da produção de álcool.

Segundo Khan & Hoq (1990) fermentações conduzidas em presença de $5,0 \times 10^6$ bactérias/mL, sendo que $5,0 \times 10^3$ bactérias/mL eram produtoras de ácido, apresentaram rendimento 11,4% menor que quando estas não estavam presentes. Essia-Ngang et al. (1989) observaram uma redução de 30% na produtividade em etanol da fermentação de mosto de açúcar de beterraba quando a concentração de ácido láctico produzido pelas bactérias contaminantes atingiu 5,0 g/L.

Qualquer correlação entre o tamanho da contaminação bacteriana e perdas em rendimento em etanol precisa ser mais bem compreendida, embora seja óbvio que cada molécula de açúcar direcionada para a produção de ácido láctico pela bactéria resulta em perdas de duas moléculas de etanol que poderiam ser produzidas pelas células de leveduras (Ingledew, 1995).

Existem controvérsias na literatura descrevendo o efeito de bactérias lácticas sobre o rendimento em etanol. E apesar de uma significativa soma de pesquisas na área, o efeito de bactérias lácticas em fermentações conduzidas por leveduras permanece confuso (Huang et al., 1996).

Chin e Ingledew (1994) relataram que a contaminação com aproximadamente 10^8 UFC/mL de bactérias produtoras de ácido láctico não afetou seriamente a produtividade em etanol na fermentação de malte de trigo, mesmo com aumento gradual da concentração de ácido láctico ao longo de 5 fermentações, mas ocasionou uma redução de 60% na viabilidade da levedura nas últimas fermentações.

Bayrock e Ingledew (2001), introduzindo *L. paracasei* como contaminante num sistema contínuo de fermentação nas proporções de 1:100, 1:1 e 70:1 com *S. cerevisiae*, observaram que, mesmo na maior proporção, nem a bactéria e nem seus produtos metabólicos (ácido láctico) afetaram a concentração de etanol e a viabilidade da levedura. Os mesmos autores, em 2005, desenvolveram outro trabalho a fim de complementar a publicação anterior e, novamente, observaram

que a presença de *L. paracasei* com $3,7 \times 10^5$ UFC/mL não afetou o número de células viáveis de *S. cerevisiae*, e ainda produziu mais 18% de etanol quando comparado com a fermentação sem a presença do contaminante.

Cherubin (2003) num experimento comparativo entre linhagens de *S. cerevisiae* em cultura pura e em cultura mista com a bactéria *L. fermentum* durante 6 ciclos fermentativos constatou que não houve relação entre contaminação bacteriana e viabilidade de levedura, nem entre contaminação bacteriana e rendimento fermentativo.

Porém não há dúvidas, de acordo com Alcarde e Yokoya (2003), que a contaminação bacteriana é um dos fatores preponderantes dentre aqueles que afetam a fermentação alcoólica industrial, posto que é o mais freqüente agente presente.

2.3 Interação entre bactérias e leveduras

Gilliland e Lacey (1964) e Kaneko e Yamamoto (1968) verificaram influência do ácido acético na inibição do crescimento e na queda da viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* quando em cultura mista com *Acetobacter*. Os primeiros autores também observaram este mesmo efeito em leveduras dos gêneros *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Torula*, *Candida* e em outras espécies de *Saccharomyces*.

Estudando o efeito de alguns produtos secundários no sistema de fermentação, Maiorella et al. (1983) concluíram que o ácido acético e o ácido láctico causam interferências químicas na manutenção das funções celulares. Os mesmos autores observaram que a concentração de ácido acético e ácido láctico, inibiram o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* quando presente em concentrações de 0,5-9 e 10-40 g/litro, respectivamente, e uma redução de 80% da massa de células de levedura ocorreu em concentrações de 7,5 e 38 g/litro, respectivamente.

Alterthum et al. (1984), estudando fermentações com reciclagem de células, citaram que a elevada porcentagem de células mortas e o aumento da acidez do mosto são devidos à liberação no meio de cultura de substâncias tóxicas produzidas pelas células bacterianas, promovendo a morte da levedura ou dificultando seu desenvolvimento.

Os efeitos de alguns contaminantes e seus produtos metabólicos sobre a levedura são ainda pouco conhecidos, porém sabe-se que um nível elevado de contaminação pode causar redução na produtividade e no rendimento fermentativo devido à competição pelo substrato, à redução da viabilidade das células de levedura pela “intoxicação” por metabólitos do microrganismo contaminante e à floculação das leveduras pela ação das células bacterianas (Yokoya, 1989).

Oliva-Neto (1990), avaliando a influência da contaminação por bactérias lácticas na fermentação, concluiu que a acidez total do vinho está inversamente correlacionada com a relação levedura/bactéria e diretamente correlacionada com o número de células de bactérias lácticas. O autor ainda determinou que quando a acidez total atinge valores superiores a 4,8 g/L, expressos em ácido láctico, ocorre uma correlação inversa entre a acidez e a viabilidade das leveduras e, ainda, entre a acidez e a porcentagem de brotos vivos do fermento.

Segundo Yokoya (1991) a presença de bactérias lácticas na fermentação causam aumento da acidez do vinho pela produção de ácidos láctico e acético, e acarretam queda na porcentagem de células vivas das leveduras.

Durante a fermentação, há queda no rendimento em etanol, as células de levedura têm seu metabolismo e crescimento inibidos; há uma menor utilização de carboidratos e um aumento da acidez pelo efeito das altas concentrações de ácido láctico, de acordo com Makanjuola et al. (1992). Estes mesmos autores concluíram que uma contagem de bactérias de $4,5 \times 10^8$ UFC/ mL em 30 h resulta em uma redução de 17% no rendimento em etanol.

Freguglia (1997), estudando a viabilidade celular de *S. cerevisiae* em cultura mista com *L. fermentum*, observou que a presença da bactéria e/ou de

seus produtos metabólicos reduziram a viabilidade celular da levedura em 97% e 55%, respectivamente, após 12 horas de cultivo associado.

Thomas et al. (2001) pesquisaram o efeito dos lactobacilos (*L. collinoides*, *L. fermentum*, *L. plantarum* e *L. paracasei*) em cultura mista com *S. cerevisiae* durante 6 ciclos de fermentação em batelada de mosto à base de milho e relataram que a presença das bactérias, pré-inoculadas no mosto 24 horas antes da inoculação das leveduras, ocasionou decréscimo acima de 22% na produção de etanol, aumento do desvio de carboidratos para a produção de glicerol e ácido láctico, queda de 55% na viabilidade da levedura e redução na formação de massa celular de levedura. Contudo, quando as bactérias foram inoculadas ao mesmo tempo e com o mesmo nível, de 10^7 células/mL, que as leveduras os parâmetros citados não foram significativamente afetados.

2.4 Controle dos contaminantes do processo de produção de etanol

Há 30 anos atrás, Silva (1975), realizou um estudo preliminar de controle da infecção de moendas através da aplicação de bactericidas. O controle microbiológico é de importância fundamental se o objetivo é produzir álcool com altos rendimentos (Amorim e Oliveira, 1982) e devido a constante presença de contaminantes durante o processo fermentativo é importante o conhecimento de fatores que possibilitem a redução dos problemas causados pela contaminação bacteriana, além das práticas usuais de tratamento ácido do creme de levedura e de aplicação de antibióticos (Cherubin, 2003).

Gallo (1989) observou uma redução média de 44,5 % da flora bacteriana quando o fermento recebeu tratamento com ácido sulfúrico por duas horas a um pH igual a 2,0. E Alves (1994), trabalhando com mosto contaminado com uma mistura de microrganismos, observou que a eficácia da fermentação pode ser restabelecida com a aplicação dos antimicrobianos virginiamicina, penicilina e cloranfenicol.

Alcarde (1995) e Oliveira et al. (1996), estudando o efeito do antimicrobiano Kamoran HJ, constatarem altas porcentagens de reduções populacionais em diversos microrganismos contaminantes da fermentação alcoólica. Oliveira et al. (1996), utilizando o antimicrobiano na concentração de 1 ppm, obtiveram redução populacional de 13,9% para *Bacillus subtilis*; 15,6% para *Bacillus coagulans*; 99,5% para *Lactobacillus fermentum* e 66,3% para *Lactobacillus plantarum*. Alcarde (1995), utilizando o antimicrobiano na concentração de 3 ppm, verificou redução populacional de 91,3% para *Bacillus subtilis*; 37,8% para *Bacillus coagulans* e 87,9% para *Bacillus stearothermophilus*.

Porém, antibióticos são caros e o uso de tais produtos fica restritos ao fator custo-benefício, além de requererem aplicação constante (Bevan e Bond, 1971). Atualmente, as indústrias de etanol tem considerado aceitável uma população bacteriana no mosto de cerca de 10^5 UFC/mL, não sendo economicamente viável reduzir este nível (Alcarde et al., 2003).

Considerando o crescente conceito de que as bactérias desenvolvem uma resistência aos antibióticos, segundo Narendranath e Power (2004), a estratégia de inocular uma alta taxa de leveduras é um meio de minimizar os efeitos causados pela contaminação bacteriana.

O uso da radiação ionizada pode ser uma alternativa de descontaminação do mosto de cana-de-açúcar. A irradiação pode mudar o DNA celular, afetando as funções celulares e induzir a morte das células (Urbain, 1986).

Shin e Pyun (1997), num estudo comparativo de inativação de *L. plantarum*, os resultados indicaram que a irradiação por microondas mostrou-se mais efetiva no controle da bactéria do que o método convencional de tratamento a calor (50°C por 30 minutos).

Diversos autores observaram redução da população bacteriana por radiação ionizada como Zeller et al. (1984), que estudaram a esterilização e conservação do melaço de cana-de-açúcar com doses de radiação gama de 10 kGy; Postmes et al. (1995), que esterilizaram mel contaminado com *Clostridium*

botulinum e *Bacillus subtilis* com irradiação gama; Alcarde (2000) e Alcarde et al. (2003), que demonstraram a eficiência da redução microbiológica contaminante do mosto de cana-de-açúcar

Segundo Iemma et al (2000), tanto o antimicrobiano Kamoran HJ quanto a radiação gama se mostraram eficientes na inativação de bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus* contaminantes do mosto de cana-de-açúcar, sem ser observada qualquer alteração na capacidade fermentativa das leveduras, as quais foram acrescentadas após os tratamentos de inativação.

2.5 Metodologias alternativas de cultivo de microrganismos

O levantamento microbiológico em indústrias normalmente é feito com meios sintéticos que se apresentam práticos na manipulação, porém são onerosos. Por esta razão faz-se necessário desenvolver meios mais acessíveis e que permitam o crescimento de todas as bactérias presentes nos caldos e na fermentação (Rosales et al., 1987).

Horii (1983) desenvolveu um meio de cultivo para isolamento e contagem de bactérias lácticas contaminantes da fermentação alcoólica constituído de caldo de cana-de-açúcar clarificado, diluído a 8° brix e suplementado com extrato de levedura e actidiona.

Estudos detalhados, com vários tipos de alimentos e meios de culturas servem para orientar as indústrias e os laboratórios de microbiologia sobre o meio mais adequado e para validar os meios recomendados pela ICFM (International Commission on Food Mycology) para produtos de países tropicais (Taniwaki, 1996).

Freguglia (1997) obteve resultados semelhantes de crescimento de colônias de *L. fermentum* em meio de cultura de caldo de cana suplementado com extrato de levedura e peptona e em meio MRS-agar. A autora concluiu que tais metodologias alternativas de contagem e cultivo são vantajosas, desde que

os meios de cultivo e as condições sejam adaptados aos microrganismos que se deseja pesquisar.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no Setor de Açúcar e Álcool do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ / USP, Piracicaba - São Paulo.

3.1 Microrganismos

Foram utilizadas culturas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Y-904), da Mauri Brasil, do grupo Burns Philp, e isolados das bactérias *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus stearothermophilus*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus plantarum*, que fazem parte da coleção de culturas do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

3.2 Meios de cultivo para manutenção, reativação, crescimento e plaqueamento dos microrganismos

- Bactérias do gênero *Bacillus*: caldo GLT (glicose – 0,1%, extrato de levedura – 0,25%, triptona – 0,5%, água destilada) e PCA ("Plate Count Agar", caldo GLT acrescido de 1,5% de agar).
- Bactérias do gênero *Lactobacillus*: caldo MRS (Lactobacilli "Man, Rogosa, Sharpe" - MRS Difco 0881-01-3) e MRS-agar (caldo MRS acrescido de 1,5% de agar).

- Todas as bactérias: Litmus milk – meio de cultura para manutenção das culturas de bactérias.
- Levedura *S. cerevisiae*: caldo YEPD (extrato de levedura – 1%, peptona – 1%, dextrose – 2%, água destilada) e YEPD-agar (caldo YEPD acrescido de 1,5% de agar).
- Todos os microrganismos: MCC e MCC-agar (MCC acrescido de 1,5% de agar): meio à base de caldo de cana suplementado, preparado a partir de caldo de cana-de-açúcar clarificado (fervura por 20 min, resfriamento e filtração em algodão), diluído com água destilada para $5,0 \pm 0,1^\circ$ brix, suplementado com extrato de levedura (1,0%) e peptona (1,0%).

Todos os meios de cultura foram autoclavados por 20 minutos a 121°C, antes de serem utilizados.

3.3 Cultivo dos microrganismos

3.3.1 Cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*

A cultura de *S. cerevisiae* (Y-904) foi mantida em meio de cultura YEPD-agar com óleo mineral, sob temperatura de refrigeração a 4°C. Na reativação, foi retirada uma alça da cultura de manutenção e transferida para tubo de ensaio com 9,0 mL de caldo YEPD, sendo o tubo incubado a 32°C por 48 h. Em seguida, nova transferência foi efetuada nas mesmas condições anteriores. Após a incubação, o conteúdo de dois tubos de ensaio (20 mL), foi transferido para erlenmeyer contendo 1000 mL do meio MCC e incubado a 32°C por 48 h (Figura 1).

Figura 1 - Esquema do cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*

3.3.2 Cultivo das bactérias

As culturas das bactérias dos gêneros *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. coagulans*, e *B. stearothermophilus*) e *Lactobacillus* (*L. fermentum* e *L. plantarum*) foram mantidas em meio Litmus Milk, sob temperatura de congelamento a -18°C . Na reativação, a cultura de manutenção, contendo a suspensão bacteriana congelada, foi transferida para incubadora a 32°C por 48 h. Após o desenvolvimento da cultura foi retirada uma alíquota de 1,0 mL e transferida para tubo de ensaio com 9,0 mL de caldo GLT (para os *Bacillus*) ou MRS (para os *Lactobacillus*), sendo o tubo incubado a 32°C por 48 h. Em seguida, nova transferência foi efetuada nas mesmas condições anteriores. Após a incubação, o conteúdo do tubo de ensaio (10 mL), foi transferido para erlenmeyer contendo 500 mL do meio MCC seguido de incubação a 32°C por 48 h (Figura 2).

3.4 Procedimento para obtenção de culturas mistas de bactérias e *Saccharomyces cerevisiae*

Os ensaios utilizando culturas mistas de bactéria e *S. cerevisiae* empregaram as culturas de bactérias ativas (ou sem tratamento) e também as culturas de bactérias tratadas pelo calor ou pelo antimicrobiano Kamoran HJ ou por radiação gama.

Estes ensaios com a cultura bacteriana tratada visaram estudar o efeito dos produtos metabólicos das bactérias sobre a viabilidade da levedura. Os diferentes tratamentos visaram verificar possíveis mudanças no meio e em seus compostos, as quais poderiam afetar a redução da viabilidade da levedura.

Figura 2 - Esquema do cultivo das bactérias (*B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. stearothermophilus*, *L. plantarum* e *L. fermentum*)

3.4.1 Culturas mistas com bactérias ativas

A partir dos 500 mL do meio MCC inoculado com a cultura de bactéria (item 3.3.2.), foram transferidas alíquotas de 50 mL em 8 frascos erlenmeyer, adicionados de alíquotas de 50 mL do meio MCC inoculado com a cultura de *S. cerevisiae* (item 3.3.1.). Como controle foram utilizadas alíquotas de 50 mL do meio MCC inoculado com a cultura da levedura, adicionados de 50 mL do meio MCC estéril. Todos os frascos (amostras e controles) foram mantidos a 32°C por 72 h, em incubador com ambiente controlado New Brunswick com agitação circular de 50 rpm (Figura 3).

3.4.2 Culturas mistas com bactérias tratadas

As culturas mistas de leveduras com bactérias tratadas receberam o mesmo procedimento de obtenção das culturas mistas de leveduras com bactérias ativas, porém 24 h antes da mistura dos meios, os meios MCC inoculados com as culturas de bactérias (item 3.3.2.) receberam um dos tratamentos especificados a seguir: calor, agente antimicrobiano e irradiação.

O tratamento por calor foi através de esterilização em autoclave a 121°C por 20 minutos. O tratamento por antimicrobiano foi através da aplicação de Kamoran HJ na concentração de 3,0 ppm (Oliveira, et al., 1996; Alcarde, 2000) e incubação por 24 horas a 32°C. O tratamento por irradiação foi através da radiação gama, com doses de 5,0 kGy para os *Lactobacillus* e 15,0 kGy para os *Bacillus*. Estas doses foram escolhidas segundo resultados obtidos por Alcarde (2000), que estudou a inativação de bactérias *Bacillus* e *Lactobacillus* em mosto de caldo de cana. A irradiação foi efetuada em irradiador Gammacell 220 Escel MDS Nordion, emissor de radiação gama provenientes do Cobalto-60, instalado

no Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, em Piracicaba-SP.

Portanto a partir dos 500 mL do meio MCC inoculado com a cultura de bactérias seguido do tratamento especificado, foram transferidas alíquotas de 50 mL em 8 frascos erlenmeyer, adicionados de alíquotas de 50 mL do meio MCC inoculado com a cultura de *S. cerevisiae*. E como controle também foram utilizadas alíquotas de 50 mL do meio MCC inoculado com a cultura da levedura, adicionados de 50 mL do meio MCC estéril. Todos os frascos (amostras e controles) novamente foram mantidos a 32°C por 72 h, em incubador com ambiente controlado New Brunswick com agitação circular de 50 rpm (Figura 4).

Figura 3 - Procedimento para obtenção de culturas mistas de bactérias ativas e *Saccharomyces cerevisiae*

Figura 4 - Procedimento para obtenção de culturas mistas de bactérias tratadas e *Saccharomyces cerevisiae*

3.5 Determinações físico-químicas

As análises físico-químicas; acidez total, acidez volátil e o pH do meio, foram determinados às 0, 24, 48 e 72 h do cultivo misto de bactéria (ativa ou tratada) e *S. cerevisiae*.

3.5.1 Determinação da acidez total

A determinação da acidez total do meio foi realizada através da metodologia proposta por Amerine & Ough (1974), e descrita em Zago et al. (1996), onde 20 mL da amostra homogeneizada foi transferida para erlenmeyer, adicionado de 50 mL de água destilada e 2-3 gotas da solução indicadora de fenolftaleína 1%, e em seguida titulado com hidróxido de sódio 0,05N até a mudança de coloração. Através do volume gasto de NaOH 0,05N obtêve-se a acidez total, e o resultado foi expresso em mg de ácido acético/L.

$$At = \frac{Vg \times N \times 60 \times f \times 1000}{v}$$

Onde: At = acidez total (mg de ácido acético/L)

Vg = volume de solução de NaOH 0,05 N gasto (mL)

N = normalidade da solução de NaOH

60 = equivalente do ácido acético

f = fator de correção do NaOH 0,05 N

v = volume da amostra (mL), neste caso 20 mL.

3.5.2 Determinação da acidez volátil

A determinação da acidez volátil do meio seguiu o procedimento proposto por Amerine & Ough (1974), onde 10 mL da amostra foi introduzida na câmara de destilação do Redutec, provido de condensador apropriado para essa técnica; procedeu-se a destilação com o máximo de arraste de vapor até que se obteve um volume de 125 mL no frasco erlenmeyer contendo, inicialmente, 25 mL de água destilada; foi adicionado de 2 a 3 gotas da solução indicadora de fenolftaleína 1%; e titulado, com hidróxido de sódio 0,05N, até a mudança de coloração, anotando o volume gasto.

O fator F de padronização foi obtido da mesma forma descrita anteriormente, porém a amostra (10 mL) destilada foi uma solução padrão de ácido acético (1,2g/L).

Como na acidez total, também através do volume gasto de NaOH 0,05N calcula-se a acidez volátil, e o resultado foi expresso em mg de ácido acético/L.

$$Av = \frac{Vg \times N \times 60 \times f \times F \times 1000}{v}$$

Onde: Av = acidez volátil (mg de ácido acético/L)

Vg = volume de solução de NaOH 0,05 N gasto (mL)

N = normalidade da solução de NaOH

60 = equivalente do ácido acético

f = fator de correção do NaOH 0,05 N

v = volume da amostra (mL)

F = fator de padronização da metodologia ($F = 4,00 / Vg$)

3.5.3 Determinação do pH

A determinação do pH foi efetuada através da utilização de potenciômetro modelo DMPH-1, marca Digimed, seguindo a metodologia proposta por Pregmolato e Pregmolato (1985).

3.6 Determinações microbiológicas

As análises microbiológicas: viabilidade celular, o brotamento e a população de células da levedura *S. cerevisiae*, foram determinados às 0, 24, 48 e 72 h do cultivo misto de bactéria (ativa ou tratada) e *S. cerevisiae*. Os plaqueamentos das bactérias e da levedura, foram realizados às 0, e 72 h dos cultivos mistos de bactérias (ativas ou tratadas) e *S. cerevisiae*.

3.6.1 Viabilidade celular, brotamento e população de células da levedura *S. cerevisiae*

A viabilidade celular, o brotamento e a população de células da levedura *S. cerevisiae* foram determinados através da coloração diferencial das células pela solução de eritrosina e posterior contagem das células viáveis, não viáveis e dos brotos viáveis presentes em 160 retículos da câmara de Neubauer espelhada, através de microscopia ótica, em microscópio OLYMPUS, modelo BH, em aumento de 400x, de acordo com a metodologia descrita por Oliveira et al. (1996).

Na coloração diferencial da solução de eritrosina, em tampão fosfato, as células viáveis permanecem incolores, enquanto as não viáveis são coradas de rósea intensa.

Os resultados são expressos em porcentagem, sendo que a viabilidade representa a relação entre células vivas e total de células, o brotamento corresponde à relação entre brotos vivos e total de células, e o número de células

viáveis ou a população de células da levedura *S. cerevisiae* foi calculada estabelecendo-se uma relação entre células vivas, volume da câmara e total de retículos contados.

$$\text{Viabilidade celular (\% células vivas)} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ células vivas (CV)} \times 100}{\text{n}^{\circ} \text{ de células contadas}}$$

$$\text{Taxa de brotamento (\%)} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ brotos} \times 100}{\text{n}^{\circ} \text{ células contadas}}$$

$$\text{População (UFC/mL)} = \frac{\text{CV} \times (1/0,00025) \times \text{diluição} \times 10^3}{\text{total retículos contados}}$$

3.6.2 Plaqueamentos dos microrganismos

A semeadura em placas para contagem das unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) dos microrganismos foi realizada através da técnica de plaqueamento em profundidade (“pour plate”), utilizando os meios de cultivo convencionais (PCA para os *Bacillus*, MRS-agar para os *Lactobacillus* e YEPD-agar para a levedura *S. cerevisiae*) e o meio de cultivo MCC-agar (para todos os microrganismos), quando em culturas mistas de leveduras e bactérias ativas.

Nas culturas mistas de leveduras e bactérias tratadas, as ações dos tratamentos foram avaliadas para cada espécie de bactéria através de plaqueamentos, em meios de cultivos convencionais, prévio e após 24 horas de aplicação. Ainda assim, foram realizados plaqueamentos, em meios de cultivos

convencionais, às 0 e 72 horas dos períodos de cultivos mistos para confirmação ou não da sobrevivência das bactérias durante o ensaio. Os plaqueamentos foram realizados com meios de cultivos convencionais (PCA para as bactérias do gênero *Bacillus* e MRS-agar para as bactérias do gênero *Lactobacillus*).

Os plaqueamentos seguiram os procedimentos descritos por Oliveira et al. (1996), sendo que para as diluições seriadas foram utilizados tubos de ensaio com 9,0 mL de água peptonada (0,1%) esterilizada. As placas foram incubadas a 32°C por 24-48 h para crescimento e posterior contagem das colônias. E nos meios de cultivos foi adicionado actidiona na concentração de 10 ppm, como inibidor da levedura, quando o objetivo foi contagem das colônias de bactérias.

3.7 Análise estatística

Os ensaios dos cultivos mistos foram realizados em um delineamento experimental inteiramente casualizado no esquema fatorial 4 x 6 (4 períodos x 6 microrganismos). As análises estatísticas dos dados foram realizadas no programa SAS – Statistical Analysis System (SAS Institute, 1990) utilizando o procedimento GLM. Foram realizadas as análises de variância e como a interação período x microrganismo foi significativa, foram realizados os desdobramentos das análises com aplicação do Teste de Tukey.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das determinações físico-químicas e microbiológicas de todos os cultivos mistos de bactérias e leveduras, média de duas repetições por ensaio, encontram-se nas Tabelas de 32 a 40 do Apêndice.

As Tabelas de 41 a 52 apresentam as médias gerais de cada variável, seguido do R^2 , coeficiente de variação e desvio padrão das mesmas e os quadrados médio das análises de variância seguido da significância do Teste F dos fatores Microrganismo (Micro), Período (Per) e Interação (Micro * Per) para cada tratamento.

4.1 Cultivos mistos de *S. cerevisiae* e bactérias ativas

As contagens bacteriológicas (UFC/mL), apresentadas na Tabela 1, confirmam a sobrevivência das bactérias durante o ensaio, envolvendo *S. cerevisiae*. Os plaqueamentos foram realizados com meios de cultivos convencionais (PCA para os *Bacillus* e MRS-agar os *Lactobacillus*).

Em alguns casos a população bacteriana pouco aumenta em 72 h de cultivo e, em um caso, chega até a diminuir ou quase que manter a contagem da população inicial. Mas o importante a ser notado com a contagem bacteriana é que, durante o cultivo misto, a bactéria, seja qual for, apresenta-se com uma população considerada por Amorim et al. (1981), Alterthum et al. (1984), Khan &

Hoq (1990) prejudicial ao rendimento da fermentação e à viabilidade celular da levedura.

Tabela 1. Contagem bacteriana inicial e final dos cultivos mistos de bactérias ativas e leveduras

Bactéria	CONTAGEM BACTERIANA (UFC/mL)*	
	Inicial (0 h)*	Final (72 h)*
<i>B. stearothermophilus</i>	$6,7 \times 10^8$	$3,4 \times 10^8$
<i>B. coagulans</i>	$1,2 \times 10^7$	$8,4 \times 10^7$
<i>B. subtilis</i>	$4,8 \times 10^7$	$7,7 \times 10^8$
<i>L. fermentum</i>	$8,6 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$
<i>L. plantarum</i>	$2,8 \times 10^6$	$6,3 \times 10^6$

* Média de 18 plaqueamentos

* Inicial (0 h) = início do período de incubação das culturas mistas de bactérias ativas e leveduras

* Final (72 h) = final do período de cultivo misto

De modo geral, a acidez total (Figura 5A) e a acidez volátil (Figura 5B) dos meios de cultivos inoculados ou não, com as diferentes bactérias ativas, aumentaram nas 24 horas iniciais do cultivo, vindo posteriormente a diminuir até as 72 horas, término do cultivo. Consequentemente o pH (Figura 5C) desses meios apresentou tendência inversa, isto é, diminuiu até 24 h e, em seguida, aumentou até 72 h dos cultivos mistos de bactérias e leveduras e do cultivo isolado das leveduras.

Figura 5 - Variações das determinações físico-químicas: acidez total (A), acidez volátil (B) e pH (C); durante o cultivo misto de *S. cerevisia* com as bactérias ativas: *B. stearotheophilus* (◆), *B. coagulans* (■), *B. subtilis* (▲), *L. fermentum* (×), *L. plantarum* (✱); e o controle (●) refere-se de *S. cerevisiae* cultivada sem a presença de bactérias

A acidificação, observada através da acidez total (Tabela 2), após 24 horas de incubação, apresenta diferença significativa em relação aos demais períodos (0, 48 e 72 h), em todos os meios de cultivos, inoculados ou não, com as diferentes bactérias ativas.

Os valores de acidez total e volátil dos cultivos mistos de *S. cerevisiae* com *B. stearothermophilus* ou *B. coagulans* ou *L. plantarum*, apesar de apresentarem-se ligeiramente menores em todos os períodos, não diferiram estatisticamente do controle (Tabela 2 e 3). Nestes casos, como os valores de acidez total e volátil desde o início são semelhantes ao controle, deduz-se que os ácidos possam, provavelmente, ter sido produzidos quase que exclusivamente por *S. cerevisiae*.

Ao contrário dos outros cultivos mistos, *L. fermentum* e *B. subtilis*, apresentaram valores de acidez total e volátil superiores ao controle durante todo o ensaio e diferiram estatisticamente do controle (Tabela 2 e 3). Destacam-se os valores de acidez total e volátil do cultivo misto de *S. cerevisiae* e *L. fermentum* em todos os períodos, sugerindo que, nestas condições de cultivo, esta bactéria foi a mais eficiente produtora de ácidos orgânicos.

Diferente do comportamento da acidez total, os valores de acidez volátil nos cultivos mistos de *S. cerevisiae* com *B. stearothermophilus* ou *B. coagulans* ou *L. plantarum*, incluindo o controle, não variaram estatisticamente entre os períodos, mantendo-se constantes do início até o fim do cultivo (Tabela 3).

Tabela 2. Teste de Tukey para as médias de **acidez total** comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de *S. cerevisiae* e bactérias ativas

Períodos (horas)	Cultivo misto de <i>S. cerevisiae</i> com					<i>S. cerevisiae</i> (controle)
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Lactobac. plantarum</i>	<i>Lactobac. fermentum</i>	
	Acidez Total (mg ácido acético / L)					
0	790 Aa	2595 Ab	720 Aa	880 Aa	5715 Ac	1345 Aa
24	3555 Ba	3520 Ba	3116 Ba	2975 Ba	7765 Bb	3844 Ba
48	770 Aa	2590 Ab	656 Aa	780 Aa	6013 Ac	1305 Aa
72	545 Aa	2810 Ab	635 Aa	595 Aa	6120 Ac	1334 Aa

Obs.: Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 1 % de significância

Tabela 3. Teste de Tukey para as médias de **acidez volátil** comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de *S. cerevisiae* e bactérias ativas

Períodos (horas)	Cultivo misto de <i>S. cerevisiae</i> com					<i>S. cerevisiae</i> (controle)
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Lactobac. plantarum</i>	<i>Lactobac. fermentum</i>	
	Acidez Volátil (mg ácido acético / L)					
0	320 Aa	280 Aa	120 Aa	48 Aa	1239 Ab	244 Aa
24	475 Aa	1350 Bb	275 Aa	306 Aa	1694 Ab	504 Aa
48	64 Aa	1335 Bb	115 Aa	85 Aa	2682 Bc	406 Aa
72	28 Aa	1485 Bb	41 Aa	15 Aa	3231Cc	424 Aa

Obs.: Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 1 % de significância

Tabela 4. Teste de Tukey para as médias de **pH**, comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de *S. cerevisiae* e bactérias ativas

Períodos (horas)	Cultivo misto de <i>S. cerevisiae</i> com					<i>S. cerevisiae</i> (controle)
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Lactobac. plantarum</i>	<i>Lactobac. fermentum</i>	
	pH					
0	6,31 Aac	4,73 Ab	6,00 Aa	6,65 Ac	3,77 Ad	5,39 Abe
24	4,85 Ba	4,89 Aa	4,89 Ba	5,37 Ba	3,77 Ab	5,06 Aa
48	6,22 Aac	5,00 Ab	6,38 Aa	6,56 Aa	3,86 Ad	5,69 Bc
72	7.10 Cb	4.94 Ac	6.08 Aa	7.25 Cb	3.93 Ad	5.70 Ba

Obs.: Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 1 % de significância

Diferente da acidez total e volátil, o pH do meio no cultivo de *S. cerevisiae* com *B. subtilis* ou *L. fermentum*, Tabela 4, manteve-se constante em todos os períodos e apresentaram os menores valores entre todos os microrganismos estudados.

As bactérias *L. fermentum* e *B. subtilis* se destacaram na produção de ácidos, pois os meios inoculados com estas bactérias ativas apresentaram as maiores concentrações de acidez total e volátil (Figuras 5A e 5B). Conseqüentemente os meios inoculados com estas duas bactérias ativas apresentaram os menores valores de pH ao longo do período de incubação com *S. cerevisiae* (Figura 5C).

O comportamento do pH foi semelhante, nos cultivos mistos de *S. cerevisiae* com *B. stearothermophilus* ou *B. coagulans* ou *L. plantarum* (Tabela 4). O período de 24 h se destaca entre os demais, pois há uma acidificação do meio e uma diminuição do pH, e é o único período em que todos estes cultivos se igualam estatisticamente ao controle; nos outros períodos, em sua maior parte, os valores de pH diferem estatisticamente do controle por apresentarem altos valores que atingiram acima de 7 no fim dos períodos contra apenas 5,7 do controle (Figura 5C).

Antes de serem misturadas para os cultivos mistos, *S. cerevisiae* e as bactérias foram inicialmente crescidas em meios separados. Como as bactérias testadas não possuem a capacidade de metabolizar sacarose, quando os meios com *S. cerevisiae* e as bactérias foram misturados, *S. cerevisiae* voltou a estar em um meio rico em açúcar. Assim, enquanto havia açúcar disponível, *S. cerevisiae* realizou fermentação alcoólica, com conseqüente aumento da acidez do meio devido à produção de ácidos orgânicos, um dos produtos secundários do processo de catabolismo do substrato. Esta foi a razão do aumento da acidez total e volátil dos meios de cultivos nas primeiras 24 horas do período de incubação das culturas de *S. cerevisiae* e bactérias.

Segundo Alves (2000), linhagens de leveduras produzem ácido succínico e ácido málico durante a fermentação, e mesmo que estes ácidos venham a ser reabsorvidos, contribuem para a acidificação do meio.

A acidez dos meios de cultivos diminuiu após 24 h do período de incubação porque quando se esgotam os açúcares do meio *S. cerevisiae* cessa a fermentação alcoólica e passa a absorver H^+ do meio externo e liberar K^+ celular ao meio (Conway & Downey, 1950; Gomes, 1988; Rothstein & Bruce, 1958; Seaston et al., 1976). Assim, o pH interno das células de *S. cerevisiae* se reduz e o pH do meio externo aumenta, provocando redução de acidez do meio.

A redução do pH interno da célula de *S. cerevisiae*, decorrente da maior absorção de H^+ , está relacionada com menores teores endógenos de P e N e dos carboidratos de reserva, trealose e glicogênio (Gomes, 1988). Quanto à redução do conteúdo endógeno de glicogênio, a redução do pH interno das células reflete na síntese de ATP e, em adição, a liberação de K^+ em troca de H^+ provoca um consumo substancial de energia para a manutenção do gradiente transmembrânico de K^+ nas células (Páca, 1981). Assim, para evitar uma deficiência energética, as células consomem glicogênio para a ativação do metabolismo endógeno visando fornecer a energia requerida para a manutenção celular.

Chester (1959) foi o primeiro autor a demonstrar que, sob aerobiose ou anaerobiose, linhagens de *S. cerevisiae* degradam, por fermentação endógena, suas reservas de carboidratos durante a ausência de nutrientes. Como resultado dessa fermentação, observou-se uma redução de 50% no conteúdo total dos carboidratos de reserva glicogênio e trealose, após um período de 5 horas de ausência de açúcar no meio.

Além das células de leveduras consumirem os carboidratos de reserva, glicogênio e trealose, Sols et al. (1971), descreveram ainda outras formas de produção de energia pelo metabolismo das leveduras na ausência de açúcar no

meio, como a assimilação de etanol e ácidos láctico, pirúvico, succínico e málico, visando fornecer a energia requerida para a manutenção celular.

Casal et al. (1996), observaram que *S. cerevisiae* sob certas condições produzia traços de ácido acético e podia utilizá-lo como fonte de carbono se o pH do meio estivesse por volta de 5 ou mais.

Estudando o efeito de lactobacilos em cultura mista com leveduras, Thomas et al (2001), observaram que após alcançar um valor máximo, o conteúdo de ácido láctico começa a declinar, indicando provavelmente que foi utilizado pelas leveduras. Os autores também observaram que o início da redução do ácido láctico coincide com a exaustão dos açúcares do meio.

As análises do perfil de acúmulo de biomassa, produção de etanol e consumo de açúcar, realizadas por Cruz (2002), mostraram que em baixas concentrações de glicose observa-se claramente a diauxia, onde inicialmente a levedura utiliza glicose para produzir etanol e biomassa e após a exaustão da glicose, o etanol é utilizado como fonte de carbono.

De modo geral, a viabilidade celular de *S. cerevisiae* (Figura 6A) foi afetada apenas no cultivo misto com *L. fermentum* e *B. subtilis*. A taxa de brotamento de *S. cerevisiae* (Figura 6B) diminuiu ao longo do cultivo misto de todas as bactérias; e a população de células de *S. cerevisiae* (Figura 6C) apresentou-se sempre ligeiramente abaixo do controle.

Figura 6 - Variações das determinações microbiológicas: viabilidade celular (A), taxa de brotamento (B) e população de células (C) de *S. cerevisiae*; durante o cultivo misto de *S. cerevisiae* com as bactérias ativas: *B. stearothermophilus* (◆), *B. coagulans* (■), *B. subtilis* (▲), *L. fermentum* (×), *L. plantarum* (*); e o controle (●) refere-se de *S. cerevisiae* cultivada sem a presença de bactérias

A viabilidade celular de *S. cerevisiae* foi afetada apenas no cultivo misto com *L. fermentum* e *B. subtilis*, as quais diminuíram significativamente a porcentagem de células vivas de *S. cerevisiae* ao longo do período de cultivo (Figura 6A, Tabela 5). O cultivo misto de *S. cerevisiae* e *B. subtilis* reduziu em 59,2 % a viabilidade da levedura, enquanto o cultivo misto com *L. fermentum* reduziu em 73,5 % a viabilidade celular da levedura.

As demais bactérias, *B. stearothersophilus* ou *B. coagulans* ou *L. plantarum*, não influenciaram a viabilidade celular de *S. cerevisiae*, pois nos cultivos associados de *S. cerevisiae* com estas bactérias, a porcentagem de células vivas de *S. cerevisiae* ao longo do período de incubação foi semelhante e não apresentou diferença estatística (Figura 6A, Tabela 5) em relação à viabilidade celular de *S. cerevisiae* no cultivo controle.

Tabela 5. Teste de Tukey para as médias de **viabilidade celular de *S. cerevisiae***, comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de *S. cerevisiae* e bactérias ativas

Períodos (horas)	Cultivo misto de <i>S. cerevisiae</i> com					<i>S. cerevisiae</i> (controle)
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Lactobac. Plantarum</i>	<i>Lactobac. fermentum</i>	
	Viabilidade celular de <i>S. cerevisiae</i> (%)					
0	99,05 Ab	96,05 Ac	97,00 Aac	99,00 Ab	98,14 Aab	97,08 Aac
24	97,87 Aa	68,40 Bc	99,30 Ba	99,24 Aa	77,30 Bb	98,34 ABa
48	98,37 Aa	49,32 Cb	98,20 Aa	98,60 Aa	48,90 Cb	98,80 ABa
72	97,60 Aa	39,20 Dc	98,80 Aa	98,97 Aa	26,00 Db	99,10 Ba

Obs.: Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 1 % de significância

A maioria das bactérias ativas afetou o brotamento de *S. cerevisiae*, pois, ao longo do período de cultivo misto a porcentagem de brotos de *S. cerevisiae* foi menor que no controle (Figura 6B, Tabela 6). No entanto, as bactérias ativas que, em cultivo misto com *S. cerevisiae*, mais reduziram a taxa de brotamento foram, novamente, *L. fermentum* e *B. subtilis*.

Observando-se a Tabela 6, verifica-se que *B. stearrowthermophilus*, *B. subtilis*, *L. plantarum* e *L. fermentum* diferem do controle (*S. cerevisiae*) e *B. coagulans*, pois a taxa de brotamento em ambos revela queda possivelmente por falta de substrato enquanto as demais bactérias demonstram a probabilidade de haver outros fatores reduzindo a taxa de brotamento além da exaustão de nutrientes.

A população de células de *S. cerevisiae* foi significativamente afetada pelas bactérias ativas *L. fermentum* e *B. subtilis*, as quais diminuíram a densidade populacional de *S. cerevisiae* ao longo do período de cultivo misto (Figura 6C, Tabela 7). As demais bactérias também influenciaram significativamente a população de *S. cerevisiae*, apesar de nos cultivos associados com as bactérias, a densidade populacional de *S. cerevisiae* ao longo do período de incubação apresentar-se apenas ligeiramente inferior à densidade populacional de *S. cerevisiae* no cultivo controle.

Tabela 6. Teste de Tukey para as médias de **taxa de brotamento de *S. cerevisiae***, comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de *S. cerevisiae* e bactérias ativas

cervisiae e bacterias ativas						
Períodos (horas)	Cultivo misto de <i>S. cervisiae</i> com					<i>S. cervisiae</i> (controle)
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Lactobac. Plantarum</i>	<i>Lactobac. fermentum</i>	
	Taxa de brotamento de <i>S. cervisiae</i> (%)					
0	16,64 Aab	22,60 Ac	15,94 Aa	17,14 Ab	15,97 Aa	15,90 Aa
24	12,34 Ba	9,30 Bc	12,00 Ba	12,90 Ba	12,50 Ba	15,10 Ab
48	10,14 Cb	6,40 Cc	11,97 BCa	9,40 Cb	7,20 Cb	13,30 Bd
72	8,14 Db	3,30 Dd	10,60 Ca	7,37 Db	5,44 Db	11,34 Ca

Obs.: Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 1 % de significância

Tabela 7. Teste de Tukey para as médias de **População de células de *S. cerevisiae***, comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de *S. cerevisiae* e bactérias ativas

Períodos (horas)	Cultivo misto de <i>S. cerevisiae</i> com					<i>S. cerevisiae</i> (controle)
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Lactobac. Plantarum</i>	<i>Lactobac. fermentum</i>	
	População de células de <i>S. cerevisiae</i> (log UFC/mL)					
0	7,915 Ab	7,893 Ae	7,877 Aa	8,102 Ad	8,022 Ac	8,021 Ac
24	8,158 Bb	7,879 Bf	8,202 Ba	8,259 Bd	7,845 Bc	8,296Be
48	8,170 Cb	7,799 Cf	8,314 Ca	8,254 BCd	7,789 Cc	8,356Ce
72	8,152 BDb	7,732 Df	8,281 Da	8,239 Dd	7,637 Dc	8,420De

Obs.: Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 1 % de significância

Portanto, os resultados da presente pesquisa mostraram que apenas os meios de cultivo mais acidificados (Tabela 2 e 3; Figura 5A e 5B), aqueles inoculados com as bactérias *L. fermentum* ou *B. subtilis*, provocaram diminuição da viabilidade celular de *S. cerevisiae* (Tabela 5, Figura 6A). Os maiores valores de acidez total corresponderam com as menores porcentagens de viabilidade de *S. cerevisiae*, pois nos cultivos misto de *S. cerevisiae* com *L. fermentum* ou *B. subtilis* os valores de acidez total (Tabela 2) durante as 72 horas do ensaio atingiram médias de 6,4 e 2,9 g/L, expressos em ácido acético, enquanto que a viabilidade da levedura (Tabela 5) reduziu em 73,5 e 59,2%, respectivamente.

Estes resultados concordam com os obtidos por diversos autores, os quais também observaram correlação entre o aumento da acidez do meio e a diminuição da viabilidade celular da levedura em cultivo associado com bactérias.

Amorim & Oliveira (1982) citaram que as bactérias contaminantes causam prejuízos à fermentação e inibem o crescimento da levedura através da produção de ácido lático e outros ácidos orgânicos.

Alterthum et al. (1984), observaram que a elevada porcentagem de células mortas e o aumento da acidez do mosto são devidos à liberação no meio de cultura de substâncias tóxicas produzidas pelas células bacterianas, promovendo a morte da levedura ou dificultando seu desenvolvimento.

Oliva-Neto (1990), determinou que quando a acidez total atinge valores superiores a 4,8 g/L, expressos em ácido láctico, ocorre uma correlação inversa entre a acidez e a viabilidade das leveduras e, ainda, entre a acidez e a porcentagem de brotos vivos do fermento.

Yokoya (1991) observou que a presença de bactérias lácticas na fermentação causam aumento da acidez do vinho pela produção de ácidos láctico e acético, e acarretam queda na porcentagem de células vivas das leveduras.

Chin e Ingledew (1994) relataram que a contaminação com aproximadamente 10^8 UFC/mL de bactérias produtoras de ácido láctico não afetou seriamente a produtividade em etanol na fermentação de malte de trigo, porém ocasionou a uma redução de 60% na viabilidade da levedura.

Freguglia (1997), estudando a viabilidade celular de *S. cerevisiae* em cultura mista com *L. fermentum*, observou que a presença da bactéria e/ou de seus produtos metabólicos reduziram a viabilidade celular da levedura em 97% e 55%, respectivamente, após 12 horas de cultivo associado.

Thomas et al. (2001) pesquisaram o efeito dos lactobacilos (*L. collinoides*, *L. fermentum*, *L. plantarum* e *L. paracasei*) em cultura mista com *S. cerevisiae* e relataram que a presença das bactérias estabelecidas na fermentação antes que as leveduras tivessem a chance de crescer e multiplicar, ocasionou aumento do desvio de carboidratos para a produção de ácido láctico, queda na viabilidade e redução na formação de massa celular de levedura. Entretanto, os mesmos autores observaram que quando as bactérias foram inoculadas ao mesmo tempo e com o mesmo nível que as leveduras, de 10^7 células/mL, o crescimento das bactérias foi inibido e a viabilidade da levedura não foi significativamente afetada.

Como em Thomas et al. (2001), neste trabalho algumas bactérias como, *B. stearotheophilus* ou *B. coagulans* ou *L. plantarum*, em cultivo misto com *S. cerevisiae* não influenciaram a viabilidade celular da levedura (Tabela 5, Figura 6A), este resultado também foi obtido por outros autores, os quais também

observaram que a viabilidade celular da levedura não foi afetada pela presença das bactérias em diferentes mostos de fermentação.

Bayrock e Ingledew (2001), introduzindo *L. paracasei* como contaminante num sistema contínuo de fermentação nas proporções de 1:100, 1:1 e 70:1 com *S. cerevisiae*, observaram que mesmo na maior proporção, nem a bactéria ou seus produtos metabólicos (ácido láctico) afetaram a concentração de etanol e a viabilidade da levedura. Em outro trabalho dos mesmos autores (2005) novamente, observaram que a presença de *L. paracasei* com $3,7 \times 10^5$ UFC/mL não afetou o número de células viáveis de *S. cerevisiae*, e ainda produziu mais 18% de etanol quando comparado com a fermentação sem a presença do contaminante.

Cherubin (2003) num experimento comparativo entre linhagens de *S. cerevisiae* em cultura pura e em cultura mista com a bactéria *L. fermentum* durante 6 ciclos fermentativos constatou que não houve relação entre contaminação bacteriana e viabilidade de levedura.

Nossos resultados demonstram que a viabilidade celular de *S. cerevisiae* não foi afetada pela presença das bactérias (*B. stearothermophilus* ou *B. coagulans* ou *L. plantarum*) e isto pode ter ocorrido porque o nível de inoculação das bactérias não foi suficiente para competir em número de células com *S. cerevisiae*, ou fatores ambientais (como etanol, levedura, temperatura, pH) não permitiram um rápido e suficiente desenvolvimento das bactérias ou o meio era nutricionalmente deficiente.

Os níveis de inoculações das bactérias, em média de 10^6 - 10^8 UFC/mL (Tabela 1), é considerado por diversos autores prejudiciais a levedura; o meio de cultivo foi adicionado de peptona e extrato de levedura, e este, segundo Oliva-Neto e Yokoya (1997), pode ser responsável pela estimulação do crescimento bacteriano; portanto assume-se que algum fator ambiental pode ter interferido no desenvolvimento das bactérias fazendo com que elas pouco produzissem ácidos.

De acordo com Bayrock e Ingledew (2001) contaminantes podem existir mesmo que os parâmetros de produção demonstrem valores considerados “normais”. Porém, o menor e estável nível de contaminação deve ser considerado como uma “bomba-relógio”; se as condições como pH, temperatura e outros mudarem, a contaminação pode surpreendentemente aumentar e causar problemas.

4.2 Cultivos mistos de *S. cerevisiae* e bactérias tratadas

As culturas de bactérias foram tratadas através do calor, de agente antimicrobiano e de irradiação, 24 horas antes das misturas com *S. cerevisiae*.

O processo de inativação através do calor proporcionou esterilização das culturas bacterianas. O antimicrobiano Kamoran HJ, na dose de 3,0 mg/L, não foi suficiente para a completa inativação das bactérias estudadas em 24 horas. A radiação gama, nas doses utilizadas para os diferentes gêneros de bactérias (5,0 kGy para os *Lactobacillus* e 15,0 kGy para os *Bacillus*) inativou completamente os *Lactobacillus*, mas não foi suficiente para inativar totalmente os *Bacillus*.

As ações dos tratamentos foram avaliadas para cada espécie de bactéria através de plaqueamentos, em meios de cultivos convencionais (PCA para as bactérias do gênero *Bacillus* e MRS-agar para as bactérias do gênero *Lactobacillus*), prévio e após 24 horas de aplicação, obtendo-se os seguintes efeitos (Tabela 8, 9 e 10).

Tabela 8. Eficiência do tratamento calor úmido

CONTAGEM BACTERIOLÓGICA (UFC/mL)*			EFICIÊNCIA TRATAMENTO (%)
Bactéria	Prévia*	Remanescente *	
<i>B. stearothermophilus</i>	$8,3 \times 10^7$	0	100,0
<i>B. coagulans</i>	$4,5 \times 10^7$	0	100,0
<i>B. subtilis</i>	$6,2 \times 10^7$	0	100,0
<i>L. fermentum</i>	$1,8 \times 10^7$	0	100,0
<i>L. plantarum</i>	$4,6 \times 10^7$	0	100,0

* Média de 12 plaqueamentos

* Prévia = população bacteriana anterior ao tratamento

* Remanescente = população bacteriana após 24 horas de aplicação do tratamento

Tabela 9. Eficiência do tratamento antimicrobiano com Kamoran HJ

CONTAGEM BACTERIOLÓGICA (UFC/mL)*			EFICIÊNCIA TRATAMENTO (%)
Bactéria	Prévia*	Remanescente *	
<i>B. stearothermophilus</i>	$7,1 \times 10^7$	$4,4 \times 10^4$	99,94
<i>B. coagulans</i>	$5,8 \times 10^7$	$9,0 \times 10^3$	99,98
<i>B. subtilis</i>	$7,9 \times 10^7$	$1,2 \times 10^4$	99,98
<i>L. fermentum</i>	$6,8 \times 10^7$	$1,6 \times 10^4$	99,98
<i>L. plantarum</i>	$7,0 \times 10^7$	$1,3 \times 10^3$	99,99

* Média de 12 plaqueamentos

* Prévia = população bacteriana anterior ao tratamento

* Remanescente = população bacteriana após 24 horas de aplicação do tratamento

Tabela 10. Eficiência do tratamento irradiação

CONTAGEM BACTERIOLÓGICA (UFC/mL)*			EFICIÊNCIA TRATAMENTO (%)
Bactéria	Prévia*	Remanescente *	
<i>B. stearothermophilus</i>	$8,3 \times 10^7$	$8,6 \times 10^2$	99,99
<i>B. coagulans</i>	$4,5 \times 10^7$	$3,4 \times 10^2$	99,99
<i>B. subtilis</i>	$6,2 \times 10^7$	$6,2 \times 10^3$	99,99
<i>L. fermentum</i>	$1,8 \times 10^7$	0	100,0
<i>L. plantarum</i>	$4,6 \times 10^7$	0	100,0

* Média de 12 plaqueamentos

* Prévia = população bacteriana anterior ao tratamento

* Remanescente = população bacteriana após 24 horas de aplicação do tratamento

As Tabelas 8, 9 e 10 mostram as grandes eficiências dos diferentes tratamentos; o calor úmido foi capaz de inativar 100 % das bactérias estudadas; o produto Kamoran HJ dentro da dosagem econômica industrial de 3 ppm, foi capaz de causar uma redução superior a 99,9% e a radiação gama nas dosagens utilizadas foi capaz de causar uma redução superior a 99,9% para bactérias do gênero *Bacillus* e de 100% para bactérias do gênero *Lactobacillus*.

Os resultados do tratamento com antimicrobiano Kamoran HJ conferem com os obtidos por Alcarde (1995) que utilizando o mesmo produto dentro da dosagem econômica industrial de 3 ppm observou elevadas porcentagens de reduções populacionais em bactérias contaminantes da fermentação alcoólica, confirmando o acerto da dosagem a nível industrial.

Como no estudo realizado por Alcarde (2000), as bactérias do gênero *Bacillus* apresentaram maior resistência à inativação pela radiação gama que as bactérias do gênero *Lactobacillus*, por serem bactérias esporuladas. O autor encontrou doses de radiação D^{10} , em média, 4 vezes maior para os *Bacillus* do que para os *Lactobacillus*.

Apesar das grandes eficiências dos tratamentos com antimicrobiano ou irradiação, houveram populações remanescentes que, através das contagens bacterianas (UFC/mL) apresentadas nas Tabelas 11 e 12, confirmaram a sobrevivência e mostraram o comportamento das bactérias durante os ensaios, envolvendo bactérias tratadas e *S. cerevisiae*. Os plaqueamentos foram realizados com meios de cultivos convencionais (PCA para as bactérias do gênero *Bacillus* e MRS-agar para as bactérias do gênero *Lactobacillus*).

Tabela 11. Contagem bacteriana inicial e final dos cultivos mistos de bactérias tratadas com antimicrobiano Kamoran HJ e *S. cerevisiae*

CONTAGEM BACTERIANA (UFC/mL)*		
Bactéria	Inicial (0 h)*	Final (72 h)*
<i>B. stearothermophilus</i>	$2,2 \times 10^4$	$3,1 \times 10^4$
<i>B. coagulans</i>	$4,5 \times 10^3$	$1,8 \times 10^4$
<i>B. subtilis</i>	$5,9 \times 10^3$	$4,9 \times 10^4$
<i>L. fermentum</i>	$8,0 \times 10^3$	$8,8 \times 10^3$
<i>L. plantarum</i>	$6,3 \times 10^2$	0

* Média de 12 plaqueamentos

* Inicial (0 h) = início do período de incubação das culturas mistas de bactérias tratadas com antimicrobiano Kamoran HJ e *S. cerevisiae*

* Final (72 h) = final do período de cultivo misto

Tabela 12. Contagem bacteriana inicial e final dos cultivos mistos de bactérias tratadas com radiação gama e *S. cerevisiae*

CONTAGEM BACTERIANA (UFC/mL)*		
Bactéria	Inicial (0 h)*	Final (72 h)*
<i>B. stearothermophilus</i>	$4,3 \times 10^2$	$1,6 \times 10^3$
<i>B. coagulans</i>	$1,7 \times 10^2$	$5,2 \times 10^3$
<i>B. subtilis</i>	$3,1 \times 10^3$	$3,1 \times 10^3$
<i>L. fermentum</i>	0	0
<i>L. plantarum</i>	0	0

* Média de 12 plaqueamentos

* Inicial (0 h) = início do período de incubação das culturas mistas de bactérias tratadas com radiação gama e *S. cerevisiae*

* Final (72 h) = final do período de cultivo misto

Observa-se pela Tabela 11 que o crescimento de *B. stearothermophilus*, *B. coagulans* e *B. subtilis* tratadas com Kamoran HJ em cultura mista com *S. cerevisiae* apresentaram um desenvolvimento pequeno em 72 horas de cultivo, mas progressivo e competitivo por substrato, enquanto as espécies de *L. fermentum* e *L. plantarum* tratadas com Kamoran HJ foram mantidas praticamente latentes ou desprezíveis diante da população de *S. cerevisiae*, da ordem de $4,4 \times 10^8$ UFC/mL no cultivo controle, após 72 horas.

A mesma tendência de comportamento foi observada para as bactérias do gênero *Bacillus* tratadas com radiação gama na Tabela 12, onde as contagens bacterianas inicial e final também demonstraram um desenvolvimento pequeno durante o ensaio, mas competitivo por substrato. Como neste tratamento as bactérias do gênero *Lactobacillus* foram totalmente inativadas (Tabela 10), os resultados das contagens bacterianas subsequentes foram nulas (Tabela 12).

De modo geral, a acidez total (Figura 7A, 8A e 9A) e a acidez volátil (Figura 7B, 8B e 9B) dos meios de cultivos inoculados ou não, com as bactérias tratadas pelos diferentes tratamentos (calor, antimicrobiano e irradiação), aumentaram até as 24 horas iniciais dos cultivos, vindo posteriormente a diminuir até as 72 horas, término dos cultivos. E consequentemente o pH (Figura 7C, 8C e 9C) desses meios apresentou tendência inversa, isto é, diminuiu até 24 h e, em seguida, aumentou até 72 h dos cultivos mistos de bactérias tratadas e *S. cerevisiae* e do cultivo isolado de *S. cerevisiae*.

Figura 7 - Variações das determinações físico-químicas: acidez total (A), acidez volátil (B) e pH (C); durante o cultivo misto de *S. cerevisia* com as bactérias tratadas pelo calor úmido: *B. stearothermophilus* (◆), *B. coagulans* (■), *B. subtilis* (▲), *L. fermentum* (×), *L. plantarum* (*); e o controle (●) refere-se de *S. cerevisiae* cultivada sem a presença de bactérias

Figura 8 - Variações das determinações físico-químicas: acidez total (A), acidez volátil (B) e pH (C); durante o cultivo misto de *S. cerevisia* com as bactérias tratadas pelo antimicrobiano Kamoran HJ: *B. stearotherophilus* (◆), *B. coagulans* (■), *B. subtilis* (▲), *L. fermentum* (x), *L. plantarum* (*); e o controle (●) refere-se de *S. cerevisiae* cultivada sem a presença de bactérias

Figura 9 - Variações das determinações físico-químicas: acidez total (A), acidez volátil (B) e pH (C); durante o cultivo misto de *S. cerevisia* com as bactérias tratadas por irradiação: *B. stearotheophilus* (◆), *B. coagulans* (■), *B. subtilis* (▲), *L. fermentum* (×), *L. plantarum* (*); e o controle (●) refere-se de *S. cerevisiae* cultivada sem a presença de bactérias

Através da acidez total (Tabela 13, 14 e 15) observa-se acidificação inicial, após 24 horas de incubação, diferindo significativamente em relação aos demais períodos (0, 48 e 72 h), em todos os meios de cultivos, inoculados ou não, com as bactérias tratadas pelos diferentes tratamentos.

Os valores de acidez total dos cultivos mistos de *S. cerevisiae* com *B. stearothermophilus* ou *B. coagulans* ou *L. plantarum* ou *B. subtilis* tratadas pelo calor, não diferiram estatisticamente do controle (Tabela 13). Nestes casos, como os valores de acidez total desde o início foram semelhantes ao controle, observa-se que os ácidos, novamente, foram produzidos quase que exclusivamente por *S. cerevisiae*, já que a população remanescente aos tratamentos foi insignificante e pouco competitiva por nutrientes.

É interessante observar ainda que a acidez total de todos os cultivos mistos tratados com antimicrobiano ou radiação gama seguem a mesma tendência do cultivo controle de *S. cerevisiae* apesar de diferirem estatisticamente (Tabela 14 e 15), à exceção de *L. fermentum*, uma eficiente produtora de ácido láctico, demonstrado pelo teor encontrado no cultivo a 0 h e cuja forma produzida seja menos assimilada até 72 h de cultivo. Pelos teores apresentados nos cultivos mistos das espécies de *Bacillus* em estudo e de *L. plantarum*, essas bactérias são baixas produtoras de ácidos e provavelmente suas presenças em fermentações tragam prejuízos na competição por substrato mais que efeitos de prováveis toxinas.

Ao contrário dos outros cultivos mistos, *L. fermentum* tratado por qualquer um dos tratamentos, apresentou valores de acidez total superiores ao controle durante todos os ensaios, e diferiram estatisticamente do controle (Tabela 13, 14 e 15), sugerindo, novamente, que, nestas condições de cultivo, esta bactéria, entre os microrganismos estudados, foi a mais eficiente produtora de ácidos orgânicos.

Tabela 13. Teste de Tukey para as médias de **acidez total**, comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de *S. cerevisiae* e bactérias tratadas com calor

Períodos (horas)	Cultivo misto de <i>S. cerevisiae</i> com					<i>S. cerevisiae</i> (controle)
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Lactobac. plantarum</i>	<i>Lactobac. fermentum</i>	
	Acidez Total (mg ácido acético / L)					
0	1239 Aa	1388 Aa	1125 Aa	1337 Aa	4451 Ab	1177 Aa
24	3592 Bb	3351 Bbd	4485 Ba	3364 Bd	6250 Bc	4315 Ba
48	949 ACa	995 Ca	884 Aa	986 Ca	4427 Ab	962 Aa
72	904 Ca	1003 Ca	891 Aa	921 Ca	3488 Cb	952 Aa

Obs.: Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 1 % de significância

Tabela 14. Teste de Tukey para as médias de **acidez total**, comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de *S. cerevisiae* e bactérias tratadas com Kamoran HJ

	Cultivo misto de <i>S. cerevisiae</i> com					
Períodos (horas)	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Lactobac. plantarum</i>	<i>Lactobac. fermentum</i>	<i>S. cerevisiae</i> (controle)
	Acidez Total (mg ácido acético / L)					
0	1486 Aa	1594 Ad	1405 Aacd	1344 Aac	4142 Ab	1265 Ac
24	1369 ABb	2635 Ba	2688 Ba	3656 Bd	5903 Bc	3919 Be
48	1275 BCa	1254 Ca	1196 Cac	1083 Ccd	3829 Cb	1038 Cd
72	1211 Ca	1188 Ca	1145 Cac	1031 Cc	3204 Db	1078 Cac

Obs.: Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 1 % de significância

Tabela 15. Teste de Tukey para as médias de **acidez total**, comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de *S. cerevisiae* e bactérias tratadas com irradiação

Períodos (horas)	Cultivo misto de <i>S. cerevisiae</i> com					<i>S. cerevisiae</i> (controle)
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Lactobac. plantarum</i>	<i>Lactobac. fermentum</i>	
	Acidez Total (mg ácido acético / L)					
0	1594 Aa	2161 Ad	1566 Aa	1601 Aa	4544 Ab	970 Ac
24	4472 Ba	2851 Be	4200 Ba	4913 Bc	7140 Bb	3593 Bd
48	1051 Cac	1109 Cac	1257 Aa	1155 Cac	4040 Cb	825 Ac
72	979 Cac	1314 Ca	1091 Cac	1256 ACa	4193 ACb	750 Ac

Obs.: Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 1 % de significância

Os valores de acidez volátil, dos cultivos mistos das bactérias tratadas com calor úmido ou antimicrobiano e *S. cerevisiae*, exceto quando em cultivo misto com *L. fermentum*, não apresentaram diferença significativa entre os microrganismos estudados e o controle. O aumento da acidez volátil verificado às 24 h de cultivo pode ser notado nas Tabelas 16 e 17, e a queda destes valores após 48 h de cultivo fica evidente nos cultivos mistos de *S. cerevisiae* e *B. stearothermophilus*, ou *B. subtilis*, ou *B. coagulans* ou *L. plantarum*.

Apesar dos valores de acidez volátil (Tabela 18), dos cultivos misto de *S. cerevisiae* e *B. stearothermophilus*, ou *B. subtilis*, ou *B. coagulans* ou *L. plantarum* tratadas com radiação gama, apresentarem diferença significativa em relação ao o controle, a variável demonstrou uma mesma tendência de aumentar nas 24 h do período de incubação, vindo posteriormente a diminuir até o final do período.

Como na acidez total, os valores de acidez volátil do cultivo misto de *S. cerevisiae* com *L. fermentum* tratada com qualquer um dos tratamentos, desde o início do período de incubação (0 h) até o final (72 h), foram estatisticamente diferentes do controle (Tabelas 16, 17 e 18).

Tabela 16. Teste de Tukey para as médias de **acidez volátil**, comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de *S. cerevisiae* e bactérias tratadas com calor

Períodos (horas)	Cultivo misto de <i>S. cerevisiae</i> com					<i>S. cerevisiae</i> (controle)
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Lactobac. plantarum</i>	<i>Lactobac. fermentum</i>	
	Acidez Volátil (mg ácido acético / L)					
0	175 Aa	174 Aa	176 Aa	219 Aa	882 Ab	149 Aa
24	276 Ba	306 Ba	276 Ba	317 Ba	1344 Bb	251 Ba
48	152 Aa	132 Aa	161 Aa	204 Aa	1503 Cb	171 ABa
72	152 Aa	108 Aa	152 Aa	173 Aa	1084 Db	172 ABa

Obs.: Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 1 % de significância

Tabela 17. Teste de Tukey para as médias de **acidez volátil**, comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de *S. cerevisiae* e bactérias tratadas com Kamoran HJ

Períodos (horas)	Cultivo misto de <i>S. cerevisiae</i> com					<i>S. cerevisiae</i> (controle)
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Lactobac. plantarum</i>	<i>Lactobac. fermentum</i>	
	Acidez Volátil (mg ácido acético / l)					
0	166 Aa	145 Aa	110 Aa	201Aa	729 Ab	148 Aa
24	222 Aac	248 Bd	282 Ba	289 Aad	1228 Bb	183 Ac
48	16 Ba	20 Ca	19 Ca	56 Ba	1474 Cb	54 Ba
72	13 Ba	15 Ca	13 Ca	16 Ba	1144 Bb	64 Ba

Obs.: Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 1 % de significância

Tabela 18. Teste de Tukey para as médias de **acidez volátil**, comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de *S. cerevisiae* e bactérias tratadas com irradiação

Períodos (horas)	Cultivo misto de <i>S. cerevisiae</i> com					<i>S. cerevisiae</i> (controle)
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Lactobac. plantarum</i>	<i>Lactobac. fermentum</i>	
	Acidez Volátil (mg ácido acético / L)					
0	267 Aa	157 Ac	299 Aa	274 Aa	941 Ab	155 Ac
24	439 Ba	188 Ad	439 Ba	408 Ba	1113 Bb	280 Bc
48	141 Cb	170 Abd	267 Aa	204 Cde	1161 Bc	222 Cae
72	94 Cb	95 Bb	173 Ca	173 Ca	1725 Cc	161 Aa

Obs.: Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 1 % de significância

Através da Tabela 19, 20 e 21, fica evidente o aumento do pH ao longo do período de incubação para o controle e para a maioria dos cultivos mistos de *S. cerevisiae* com bactérias tratadas por qualquer um dos tratamentos.

Os valores de pH, dos cultivos mistos das bactérias tratadas com calor úmido e *S. cerevisiae* (Tabela 19), exceto quando em cultivo misto com *L. fermentum*, não apresentaram diferença significativa entre os microrganismos estudados e o controle. Apesar dos valores de pH (Tabela 20 e 21), dos cultivos mistos de *S. cerevisiae* com *B. stearothermophilus* ou *B. subtilis* ou *B. coagulans* ou *L. plantarum* tratadas com antimicrobiano ou radiação gama, diferirem estatisticamente do controle, a variável demonstrou a mesma

tendência, em todos os tratamentos, de diminuir nas 24 h do período de incubação, vindo posteriormente a aumentar até o final do período.

No cultivo misto de *S. cerevisiae* e *L. fermentum* tratado por calor úmido ou Kamoran HJ o pH mantêve-se constante entre os períodos e sempre menor e diferindo significativamente do controle (Tabelas 19 e 20). Esta mesma tendência é observada na Tabela 21 para o pH no cultivo misto de *S. cerevisiae* e *L. fermentum* tratado por radiação gama, porém, neste caso, o aumento a partir das 48 horas de cultivo é significativamente observado.

Tabela 19. Teste de Tukey para as médias de **pH**, comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de *S. cerevisiae* e bactérias tratadas com calor

Períodos (horas)	Cultivo misto de <i>S. cerevisiae</i> com					<i>S. cerevisiae</i> (controle)
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Lactobac. plantarum</i>	<i>Lactobac. fermentum</i>	
	pH					
0	5,37 Aca	5,47 ABa	5,46 Aa	5,48 Aa	4,00 Ab	5,57 ABa
24	5,04 BCa	5,12 Aa	5,07 Ba	4,96 Ba	4,29 Ab	5,18 Aa
48	5,89 ABa	5,87 Ba	6,05 Aa	5,93 Ca	4,17 Ab	5,76 Ba
72	5,91 Ca	5,85 Ba	6,00 Aa	6,01 Ca	4,38 Ab	5,72 Ba

Obs.: Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 1 % de significância

Tabela 20. Teste de Tukey para as médias de **pH**, comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de *S. cerevisiae* e bactérias tratadas com Kamoran HJ

Períodos (horas)	Cultivo misto de <i>S. cerevisiae</i> com					<i>S. cerevisiae</i> (controle)
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Lactobac. plantarum</i>	<i>Lactobac. fermentum</i>	
	pH					
0	5,94 Aa	5,60 Aac	5,91 Aa	5,34 Ac	4,17 Ab	5,57 Aac
24	5,24 Ba	5,23 Aa	5,16 Ba	5,08 Aa	3,98 Ab	5,24 ABa
48	6,15 Aa	6,11 Ba	6,15 Aa	6,16 Ba	4,04 Ab	5,06 Bc
72	6,82 Ca	6,85 Ca	6,81 Ca	6,29 Bc	4,30 Ab	5,98 Cc

Obs.: Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 1 % de significância

Tabela 21. Teste de Tukey para as médias de **pH**, comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de *S. cerevisiae* e bactérias tratadas com irradiação

Períodos (horas)	Cultivo misto de <i>S. cerevisiae</i> com					<i>S. cerevisiae</i> (controle)
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Lactobac. plantarum</i>	<i>Lactobac. fermentum</i>	
	pH					
0	4,72 Aa	5,27 Ad	4,70 Aa	4,86 Ac	3,77 Ab	4,77 Aac
24	4,63 Aac	5,19 Ae	4,65 Aa	4,77 Ad	3,82 Ab	4,64 Acd
48	5,17 Bb	5,64 Bd	5,00 Ba	5,28 Bb	3,94 Bc	4,95 Ba
72	5.31 Cb	5.51 Be	5.16 Ca	5.28 Bab	4.01 Bc	5.02 Bd

Obs.: Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 1 % de significância

Há que se destacar o comportamento da bactéria *L. fermentum* em cultivo misto com *S. cerevisiae*. Os meios inoculados com essa bactéria tratada pelos diferentes processos apresentaram os maiores valores de acidez, tanto total (Figuras 7A, 8A e 9A) quanto volátil (Figuras 7B, 8B e 9B), e, conseqüentemente, os menores valores de pH (Figuras 7C, 8C e 9C) sugerindo novamente que, nestas condições de cultivo, esta bactéria entre os microrganismos estudados foi a mais eficiente produtora de ácidos orgânicos.

Os demais meios de cultivo inoculados com as outras bactérias tratadas através dos diferentes processos, de um modo geral, apresentaram acidez total (Figuras 7A, 8A e 9A), acidez volátil (Figuras 7B, 8B e 9B) e pH (Figuras 7C, 8C e 9C) semelhantes ao tratamento controle (*S. cerevisiae*).

De um modo geral a viabilidade celular de *S. cerevisiae* (Figura 10A, 11A e 12A) não foi afetada pelas diferentes bactérias tratadas por qualquer tratamento, a taxa de brotamento de *S. cerevisiae* (Figura 10B, 11B e 12B) não apresentou uma tendência definida, porém diminuiu ao longo do período de incubação, e a população de células de *S. cerevisiae* (Figura 10C, 11C e 12C) apresentou-se sempre ligeiramente abaixo do controle.

Figura 10 - Variações das determinações microbiológicas: viabilidade celular (A), Taxa de brotamento (B) e população de células (C) de *S. cerevisiae*; durante o cultivo misto de *S. cerevisia* com as bactérias tratadas pelo calor úmido: *B. stearothermophilus* (◆), *B. coagulans* (■), *B. subtilis* (▲), *L. fermentum* (×), *L. plantarum* (*); e o controle (●) refere-se de *S. cerevisiae* cultivada sem a presença de bactérias

Figura 11 - Variações das determinações microbiológicas: viabilidade celular (A), Taxa de brotamento (B) e população de células (C) de *S. cerevisiae*; durante o cultivo misto de *S. cerevisia* com as bactérias tratadas pelo antimicrobiano Kamoran HJ: *B. stearothermophilus* (◆), *B. coagulans* (■), *B. subtilis* (▲), *L. fermentum* (×), *L. plantarum* (*); e o controle (●) refere-se de *S. cerevisiae* cultivada sem a presença de bactérias

Figura 12 - Variações das determinações microbiológicas: viabilidade celular (A), Taxa de brotamento (B) e população de células (C) de *S. cerevisiae*; durante o cultivo misto de *S. cerevisiae* com as bactérias tratadas com irradiação: *B. stearothermophilus* (◆), *B. coagulans* (◻), *B. subtilis* (▲), *L. fermentum* (×), *L. plantarum* (*); e o controle (●) refere-se de *S. cerevisiae* cultivada sem a presença de bactérias

Os resultados da viabilidade celular de *S. cerevisiae* (Tabela 22 e 23) não apresentaram diferenças significativas na interação entre microrganismos e períodos. No controle e em todos os cultivos mistos de *S. cerevisiae* e bactérias tratadas com calor úmido ou Kamoran HJ a viabilidade manteve-se estável.

A única bactéria tratada por radiação gama que interferiu na viabilidade celular de *S. cerevisiae* foi *B. subtilis*, que reduziu a viabilidade das leveduras em 9 % trazendo-a para 88,5% (Tabela 24). Isto sugere que a população remanescente da bactéria, após a irradiação, pode ter trazido consigo no meio de cultura substâncias capazes de reduzir ou inibir, de alguma maneira, o desenvolvimento de *S. cerevisiae*.

A viabilidade celular de *S. cerevisiae* nos cultivos mistos com *B. stearothermophilus* ou *L. fermentum* tratadas com radiação gama diferiram estatisticamente do controle (Tabela 24) porém em menor intensidade que no cultivo misto com *B. subtilis*. Em realidade, apesar de diferenças estatísticas, a viabilidade celular de *S. cerevisiae* em condições de carência nutricional e em sobrevivência com outros microrganismos precisa ser mais intensivamente investigada para se isolar as variáveis atuantes no fenômeno.

Tabela 22. Teste de Tukey para as médias de **viabilidade celular de *S. cerevisiae***, comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de *S. cerevisiae* e bactérias tratadas com calor

Períodos (horas)	Cultivo misto de <i>S. cerevisiae</i> com					<i>S. cerevisiae</i> (controle)
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Lactobac. plantarum</i>	<i>Lactobac. fermentum</i>	
	Viabilidade celular de <i>S. cerevisiae</i> (%)					
0	96,20 Aa	97,68 Aa	96,35 Aa	93,50 Aa	93,75 Aa	95,30 Aa
24	97,65 Aa	98,25 Aa	98,25 Aa	97,45 Aa	94,95 Aa	97,70 Aa
48	97,70 Aa	97,95 Aa	97,30 Aa	97,40 Aa	95,15 Aa	97,55 Aa
72	98,10 Aa	98,20 Aa	98,30 Aa	97,95 Aa	95,70 Aa	97,45 Aa

Obs.: Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 1 % de significância

Tabela 23. Teste de Tukey para as médias de **viabilidade celular de *S. cerevisiae***, comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de *S. cerevisiae* e bactérias tratadas com Kamoran HJ

Períodos (horas)	Cultivo misto de <i>S. cerevisiae</i> com					<i>S. cerevisiae</i> (controle)
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Lactobac. plantarum</i>	<i>Lactobac. fermentum</i>	
	Viabilidade celular de <i>S. cerevisiae</i> (%)					
0	96,90 Aa	96,70 Aa	97,85 Aa	96,00 Aa	94,30 Aa	96,65 Aa
24	98,85 Aab	98,70 Aac	99,30 Aa	96,25 Aac	95,40 Abc	98,15 Aac
48	98,75 Aab	99,40 Ab	99,15 Aab	97,55 Aab	95,60 Aa	98,40 Aab
72	97,50 Aa	98,45 Aa	98,80 Aa	97,35 Aa	95,40 Aa	98,35 Aa

Obs.: Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 1 % de significância

Tabela 24. Teste de Tukey para as médias de **viabilidade celular de *S. cerevisiae***, comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de *S. cerevisiae* e bactérias tratadas com irradiação

Períodos (horas)	Cultivo misto de <i>S. cerevisiae</i> com					<i>S. cerevisiae</i> (controle)
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Lactobac. plantarum</i>	<i>Lactobac. fermentum</i>	
	Viabilidade celular de <i>S. cerevisiae</i> (%)					
0	96,55 Aa	97,25 Ab	96,75 Aab	96,65 Aab	97,30 Ab	97,10 Aab
24	94,10 Bb	90,35 Bd	97,95 Bae	97,30 ABa	96,45 Bc	98,35 Bc
48	96,35 Ab	88,40 Ce	98,05 Ba	97,10 ABd	93,45 Cc	98,15 Ba
72	95,50 Cb	88,50 Ce	98,60 Ba	97,65 Bd	92,90 Cc	98,20 Bad

Obs.: Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 1 % de significância

A taxa de brotamento de *S. cerevisiae* variou bastante entre os períodos e os microrganismos, porém apresentou o mesmo comportamento para a maioria dos cultivos mistos, diminuindo ao longo do período de incubação, principalmente após 48 h (Tabela 25, 26 e 27) quando possivelmente o substrato foi exaurido. Exceto, novamente, o cultivo misto de *S. cerevisiae* com *L. fermentum* tratado por qualquer um dos tratamentos, que apresentou as maiores taxas de brotamento e praticamente se manteve durante todos os ensaios.

A interpretação do percentual de brotação numa fermentação é particularmente difícil, porém pode ser interpretada da seguinte maneira: uma elevada porcentagem de brotamento superior a 25% revela provavelmente boa

composição do mosto e condições favoráveis à fermentação; e um baixo percentual de brotação com alta viabilidade pode estar relacionado à composição do mosto e outros fatores ambientais (Harrison e Graham, 1970).

Segundo Carvalho (2001), a taxa de brotamento não apresentou tendência definida e não guarda necessariamente relação com o crescimento do fermento e nem com a viabilidade, pois, segundo o autor, esta é uma medida pontual e pode sofrer a crítica de que o broto demora mais ou não se desprende da célula mãe se a condição nutricional assim induzir.

Tabela 25. Teste de Tukey para as médias de **taxa de brotamento de *S. cerevisiae***, comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de *S. cerevisiae* e bactérias tratadas com calor

Cerevisiae e bactérias tratadas com calor						
Períodos (horas)	Cultivo misto de <i>S. cerevisiae</i> com					<i>S. cerevisiae</i> (controle)
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Lactobac. plantarum</i>	<i>Lactobac. fermentum</i>	
	Taxa de brotamento de <i>S. cerevisiae</i> (%)					
0	30,90 Abc	36,50 Acd	22,50 Aa	30,40 Abd	25,85 Aab	23,35 Aab
24	9,60 Ba	11,55 Bae	10,75 Bac	10,60 Bad	22,00 ABbc	17,80 ABcde
48	6,40 Ba	9,40 Ba	6,00 Ba	7,80 Ba	17,05 Bb	13,40 Bab
72	6,05 Ba	9,15 Ba	6,45 Ba	7,20 Ba	18,35 ABb	11,45 Bab

Obs.: Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 1 % de significância

Tabela 26. Teste de Tukey para as médias de **taxa de brotamento de *S. cerevisiae***, comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de *S. cerevisiae* e bactérias tratadas com Kamoran HJ

Períodos (horas)	Cultivo misto de <i>S. cerevisiae</i> com					<i>S. cerevisiae</i> (controle)
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Lactobac. plantarum</i>	<i>Lactobac. fermentum</i>	
	Taxa de brotamento de <i>S. cerevisiae</i> (%)					
0	15,75 Aa	15,60 ABa	12,75 ABa	27,15 Ab	33,55 Ab	22,25 Aa
24	20,10 Aab	22,20 Aab	20,20 Aa	15,05 Ba	25,30 ABb	22,05 Aab
48	14,80 Aab	14,05 ABa	11,85 ABa	8,75 Ba	24,30 ABb	16,05 Aab
72	15,85 Aab	10,60 Ba	10,00 Ba	8,90 Ba	21,75 Bb	14,10 Aab

Obs.: Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 1 % de significância

Tabela 27. Teste de Tukey para as médias de **taxa de brotamento de *S. cerevisiae***, comparando os microrganismos e os períodos, quando em cultura mista de *S. cerevisiae* e bactérias tratadas com irradiação

Períodos (horas)	Cultivo misto de <i>S. cerevisiae</i> com					<i>S. cerevisiae</i> (controle)
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Lactobac. plantarum</i>	<i>Lactobac. fermentum</i>	
	Taxa de brotamento de <i>S. cerevisiae</i> (%)					
0	28,80 Ab	25,70 Ac	27,20 Aa	20,20 Ad	25,45 Ac	27,85 Aab
24	25,50 Bac	21,00 Be	26,60 Aa	26,40 Bc	28,20 Bb	31,25 Bd
48	23,60 Ca	19,30 Ce	24,00 Bad	25,20 Bd	28,40 Bb	28,05 Ab
72	15,40 Db	13,20 Da	13,40 Ca	16,05 Cb	26,40 Ac	16,75 Cb

Obs.: Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 1 % de significância

A população de células de *S. cerevisiae* quando em cultivo misto com bactérias tratadas com calor ou Kamoran HJ ou radiação gama (Tabelas 28, 29 e 30), apesar de mostrar-se diferente do controle em quase todos os períodos, apresentou valores próximos de UFC/mL. Observa-se que os valores diferem estatisticamente, porém têm pouco significado microbiológico e podem ser considerado semelhantes.

Tabela 28. Teste de Tukey para as médias de **população de células de *S. cerevisiae***, comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de *S. cerevisiae* e bactérias tratadas com calor

Períodos (horas)	Cultivo misto de <i>S. cerevisiae</i> com					<i>S. cerevisiae</i> (controle)
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Lactobac. plantarum</i>	<i>Lactobac. fermentum</i>	
	População de células de <i>S. cerevisiae</i> (log UFC/mL)					
0	7,922 Ab	7,781 Ac	7,982 Aa	7,814 Ad	7,782 Ac	7,826 Ae
24	8,284 Bb	8,233 Bf	8,271 Ba	8,196 Bd	8,023 Bc	8,301 Be
48	8,414 Ca	8,274 Ce	8,419 Ca	8,329 Cc	7,993 Cb	8,385 Cd
72	8,366 Db	8,263 Df	8,347 Da	8,315 Dd	8,003 Cc	8,377 Ce

Obs.: Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 1 % de significância

Tabela 29. Teste de Tukey para as médias de **população de células de *S. cerevisiae***, comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de *S. cerevisiae* e bactérias tratadas com Kamoran HJ

Cerevisias e bactérias tratadas com Ramoran 110						
Períodos (horas)	Cultivo misto de <i>S. cerevisiae</i> com					<i>S. cerevisiae</i> (controle)
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Lactobac. plantarum</i>	<i>Lactobac. fermentum</i>	
	População de células de <i>S. cerevisiae</i> (log UFC/mL)					
0	8,102 Ab	8,044 Af	8,029 Aa	7,929 Ad	7,757 Ac	7,976 Ae
24	8,204 Bad	8,129 Be	8,194 Ba	8,231 Bc	7,982 Bb	8,211 Bd
48	8,211 Bb	8,275 Ced	8,261 Ca	8,270 Cad	8,042 Cc	8,273 Cd
72	8,274 Cb	8,254 Df	8,302 Da	8,227 Bd	8,029 Dc	8,342 De

Obs.: Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 1 % de significância

Tabela 30. Teste de Tukey para as médias de **população de células de *S. cerevisiae***, comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de *S. cerevisiae* e bactérias tratadas com irradiação

Períodos (horas)	Cultivo misto de <i>S. cerevisiae</i> com					<i>S. cerevisiae</i> (controle)
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Lactobac. plantarum</i>	<i>Lactobac. fermentum</i>	
	População de células de <i>S. cerevisiae</i> (log UFC/mL)					
0	8,103 Ab	8,044 Af	8,029 Aa	7,927 Ad	7,955 Ac	8,074 Ae
24	8,202 Bb	8,031 Be	8,123 Ba	8,232 Bd	7,982 Bc	8,225 Bd
48	8,212 Ca	7,975 Ce	8,208 Ca	8,270 Cc	7,942 Cb	8,296 Cd
72	8,275 Db	7,856 Df	8,232 Da	8,329 Dd	7,929 Dc	8,360 De

Obs.: Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 1 % de significância

O objetivo dos diferentes tratamentos empregados neste trabalho foi verificar a influência dos produtos metabólicos das culturas isoladas de bactérias sobre a viabilidade celular de *S. cerevisiae*, contudo o que foi observado na maioria dos cultivos mistos de *S. cerevisiae* tanto com bactérias ativas ou tratadas por qualquer um dos tratamentos foi que as bactérias, nestas condições de cultivo, pouco produziram ácidos, com exceção de *L. fermentum*.

O único tratamento capaz de inativar 100% das bactérias em estudo foi o calor úmido e, para este tratamento, observou-se que a viabilidade de *S. cerevisiae* não foi afetada durante o ensaio; estes resultados indicaram que a

presença dos metabólitos celulares dessas bactérias não foi suficiente para reduzir a porcentagem de células vivas de *S. cerevisiae*.

Apenas as bactérias *B. subtilis*, *L. fermentum* e *B. stearothermophilus* tratadas com irradiação em cultivo misto com *S. cerevisiae*, causaram redução na viabilidade celular de *S. cerevisiae* (Figura 12A). *B. subtilis*, *L. fermentum* e *B. stearothermophilus* tratadas com calor ou antimicrobiano e as demais bactérias (*B. coagulans* e *L. plantarum*) tratadas pelos diferentes processos (calor, irradiação e antimicrobiano) não afetaram a viabilidade celular de *S. cerevisiae* (Figuras 10A e 11A).

O comportamento de *L. fermentum* e *B. stearothermophilus* tratados com irradiação em cultivo misto com *S. cerevisiae* foi minuciosamente observado, pois a queda da viabilidade foi baixa, quase que insignificante, indicando que a redução pode ter sido mais induzida pela exaustão de substrato do que pela associação com os metabólicos das bactérias.

Vale ressaltar o comportamento da bactéria *B. subtilis* tratada pela radiação gama. Observa-se que a viabilidade celular (Figura 12A) e a população de células (Figura 12C) de *S. cerevisiae* cultivada nesse meio diminuíram durante o período de incubação. Isto aconteceu porque o tratamento utilizado, de 15 kGy de radiação gama, não foi suficiente para inativar completamente a cultura dessa bactéria (Tabela 10). Assim, as células remanescentes da bactéria *B. subtilis* (Tabela 12) reduziram a porcentagem de células vivas e a população de células de *S. cerevisiae* (Figuras 12A e 12C), conforme observado no tratamento com a bactéria ativa (Figuras 6A e 6C), porém em menor intensidade provavelmente devido à menor densidade populacional da bactéria no meio irradiado.

Estes resultados, mais uma vez, indicaram que a presença isolada dos metabólitos celulares dessas bactérias não foi suficiente para reduzir a porcentagem de células vivas de *S. cerevisiae*. Este ponto de vista também é discutido por Bayrock e Ingledew (2004), que atribuíram a redução de 83% da

viabilidade de *S. cerevisiae* à competição por nutrientes do substrato do que pelo ácido láctico formado por *L. paracasei*.

4.3 Comparação dos meios de cultivos convencionais e alternativo MCC-agar

Para todos os microrganismos, as contagens obtidas com o cultivo em meio à base de caldo de cana foram semelhantes às obtidas nos meios convencionais (Tabela 31). O meio de cultivo à base de caldo de cana proporcionou contagens semelhantes provavelmente porque simula a composição do mosto de caldo de cana-de-açúcar, meio a partir do qual as bactérias foram isoladas do processo industrial de produção de etanol.

Horii (1983) também utilizou um meio de cultivo constituído de caldo de cana-de-açúcar clarificado, diluído a 8º brix e suplementado com extrato de levedura e actidiona para isolamento e contagem de bactérias lácticas contaminantes da fermentação alcoólica. Freguglia (1997) obteve resultados semelhantes de crescimento de colônias de *L. fermentum* em meio de caldo de cana suplementado com extrato de levedura e peptona e em meio MRS-agar.

Segundo Rosales et al. (1987), para a preparação de um meio indefinido, o caldo decantado apresenta-se ideal pela sua concentração de açúcares, porém sua composição está sujeita a muitas variações ligadas ao setor agrícola e industrial, e a formulação a partir deles terá sempre uma composição bastante variável, o que pode conferir uma inadequada reprodutividade. Por esta razão, o meio preparado com caldo, embora seja rico em traços nutritivos, deve ser suplementado com outros elementos que lhe garantam estabilidade em parte de sua composição.

Tabela 31. Comparação dos meios de cultivo convencionais e alternativo (MCC-agar) na contagem microbiológica no início (0 h) e ao final (72 h) do período de incubação das culturas mista de bactéria e levedura

CONTAGEM MICROBIOLÓGICA (UFC/mL)*				
MICRORGANISMO	INICIAL (0 h)*		FINAL (72 h)*	
	Meio convencional*	Meio alternativo*	Meio convencional *	Meio alternativo*
<i>B. stearothermophilus</i>	$6,7 \times 10^8$ a	$8,6 \times 10^8$ b	$3,4 \times 10^8$ a	$2,7 \times 10^8$ b
<i>B. coagulans</i>	$1,2 \times 10^7$ a	$1,3 \times 10^7$ b	$8,4 \times 10^7$ a	$7,0 \times 10^7$ b
<i>B. subtilis</i>	$4,8 \times 10^7$ a	$3,9 \times 10^7$ b	$7,7 \times 10^8$ a	$4,9 \times 10^8$ b
<i>L. fermentum</i>	$8,6 \times 10^6$ a	$2,8 \times 10^7$ b	$1,0 \times 10^7$ a	$2,8 \times 10^7$ b
<i>L. plantarum</i>	$2,8 \times 10^6$ a	$5,3 \times 10^6$ b	$6,3 \times 10^6$ a	$7,8 \times 10^6$ b
<i>S. cerevisiae</i>	$4,5 \times 10^7$ a	$4,1 \times 10^7$ b	$4,4 \times 10^8$ a	$3,7 \times 10^8$ b

* Média de 18 plaqueamentos

* Inicial (0 h) = início do período de incubação das culturas mistas de bactérias e leveduras

* Final (72 h) = final do período de cultivo misto

* Meio convencional = PCA para bactérias do gênero *Bacillus*, MRSA para bactérias do gênero *Lactobacillus* e YEPDA para a levedura *S. cerevisiae*

* Meio alternativo = MCC-agar

Obs.: Médias seguidas pelas mesmas letras nas linhas não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 1 % de significância

A análise dos resultados (Tabela 31) obtidos nos plaqueamentos evidencia que os dois meios de cultivos possibilitaram a obtenção de resultados similares aceitáveis do ponto de vista microbiológico, porém diferentes estatisticamente.

Embora tenha surgido essa diferença estatística detectada pelo teste de Tukey, a metodologia de plaqueamento, precedido pela alta diluição seriada, conduz as diferenças encontradas. Em termos de UFC/mL, fica claro que esses meios são similares pois se fossem específicos teríamos sempre uma tendência clara de preferência.

5 CONCLUSÕES

- Das bactérias ativas testadas, somente *L. fermentum* e *B. subtilis* reduziram a viabilidade celular de *S. cerevisiae* em cultivo misto.
- As bactérias *L. plantarum*, *B. coagulans* e *B. stearothermophilus* e/ou seus produtos metabólicos não influenciaram a viabilidade celular da levedura, nestas condições de cultivo.
- A presença isolada dos metabólitos celulares de todas as bactérias não foram suficientes para reduzir as porcentagens de células vivas de *S. cerevisiae*.
- A acidez do meio juntamente com a presença das bactérias foram os principais fatores relacionados à redução da viabilidade celular de *S. cerevisiae*.
- O meio de cultivo à base de caldo de cana-de-açúcar a 5° brix suplementado com 1% de extrato de levedura e peptona pôde substituir os meios tradicionais para o cultivo da levedura e das bactérias testadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCARDE, A.R. Efeito da radiação gama em alguns parâmetros microbiológicos e bioquímicos da fermentação alcoólica. Piracicaba, 2000. 111p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo.

ALCARDE, A.R.; WALDER, J.M.M.; HORII, J. Fermentation of irradiated sugarcane must. **Scientia Agricola**, v.60, n.4, p.677-681, 2003.

ALCARDE, V.E. Avaliação de antimicrobianos em germinação de esporos e na multiplicação de bactérias isoladas de processos de fermentação alcoólica. Piracicaba, 1995. 114p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

ALCARDE, V.E.; YOKOYA, F. Efeito da população de bactérias na floculação de leveduras isoladas de processos industriais de fermentação alcoólica. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.21, n.4, p.40-43, 2003.

ALEXANDER, M. **Microbial ecology**. London: John Wiley & Sons, 1971. 511p.

ALTERTHUM, F.; CRUZ, M.R.M.; VAIRO, M.L.R.; GAMBASSI, D.M. Efeito dos microrganismos contaminantes da fermentação alcoólica nas microdestilarias. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.3, n.1, p.42-49, 1984.

ALVES, D.M.G. Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica. Piracicaba, 1994. 274p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

ALVES, D.M.G. Respostas fisiológicas de duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* frente ao potássio durante a fermentação alcoólica. Rio Claro, 2000. 118p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

AMERINE, M.A.; OUGH, C.S. **Wine and must analysis**. London: John Wiley & Sons, 1974. 121p.

AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; CAMPOS, H. Infecção, problema sério na produção de álcool. In: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DOS TÉCNICOS AÇUCAREIROS DO BRASIL, 2., Rio de Janeiro, 1981. **Anais**. Piracicaba: STAB, 1981. p.158-168.

AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J. Infecção na fermentação: como evitá-la. **Álcool e Açúcar**, v.2, n.5, p.12-18, 1982.

BAYROCK D.; INGLEDEW, W.M. Changes In steady state on introduction of a *Lactobacillus* contaminat to a continuous culture ethanol fermentation. **Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.27, p.39-45, 2001.

BAYROCK D.; INGLEDEW, W.M. Inhibition of yeast by lactic acid bacteria In continuos culture: nutrient depletion and/or acid toxicity? **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.31, n.8, p.362-368, 2004.

- BAYROCK D.; INGLEDEW, W.M. Ethanol production in multistage continuous, single stage continuous, *Lactobacillus*-contaminated continuous, and batch fermentations. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.83-88, 2005.
- BEVAN, D.; BOND, J. Microorganism in field and mill - a preliminary survey. In: CONFERENCE OF THE QUEENSLAND SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 38., Cairns, 1971. **Proceedings**. Brisbane: Watson Fergunson, 1971. p.137-143.
- CARVALHO, R.S. Interação entre leveduras e bactérias durante a fermentação alcoólica. Piracicaba, 2001. 74p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- CASAL, M.; CARDOSO, H.; LEAO, C. Mechanisms regulating the transport of acetic acid in *Sacharomyces cerevisiae*. **Microbiology-UK**, v.142, p.1385-1390, 1996.
- CHERUBIN, R.A. Efeito da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica. Piracicaba, 2003. 124p. Dissertação (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- CHESTER, V.E. Endogenous metabolism of freshly harvested cells of a brewer's yeast. **Nature**, v.183, n.4665, p.902-903, 1959.
- CHIN, P.M.; INGLEDEW, W.M. Effect of lactic acid bacteria on wheat mash fermentation prepared with laboratory backset. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.16, n.4, p.311-317, 1994.

CONTROLE microbiológico da usina de açúcar e álcool. **Boletim Técnico Copersucar**, n.22, p.2-17, maio, 1983.

CONWAY, E.J.; DOWNEY, M. pH values of the yeast cell. **Biochemical Journal**, v.47, n.2, p.355-360, 1950.

CRUZ, S.H. Efeito da natureza da fonte de nitrogênio no fluxo metabólico do carbono em microrganismos: estudo enzimático e fisiológicos com leveduras Crabtree positivo e negativo. Araraquara, 2002. 133p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

EGUCHI, S.Y.; YOKOYA, F.; CANHOS, V.P.; GALLO, C.R. **Pontos críticos microbiológicos em usinas de açúcar e álcool**. Campinas: Fundação tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 1989. 78p.

ESSIA-NGANG, T.J.E.; LETOURNEAU, F.; VILLA, P. Alcoholic fermentation of beet molasses: effects of lactic acid on yeast fermentation parameters. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.31, p.125-128, 1989.

FREGUGLIA, R.M.O. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* em cultura mista com *Lactobacillus fermentum*. Piracicaba, 1997. 104p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

GALLO, C.R. Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica. Campinas, 1989. 388p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas.

- GALLO, C.R.; CANHOS, V.P. Contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica – revisão. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, p.35-40, mar./jun. 1991.
- GILLILAND, R.P.; LACEY, J.P. Lethal action by an *Acetobacter* on yeasts. **Nature**, v.202, p.727-728, 1964.
- GOMES, E. Efeito do tratamento ácido da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação alcoólica. Piracicaba, 1988. 206p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- HARRISON, J.S.; GRAHAM, J.C.J. Yeast in distillery practice. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. (Ed.) **The yeasts**. London: Academic Press, 1970. v.3, cap.6, p. 283-348.
- HORII, J. Isolamento e contagem de bactérias contaminantes do caldo de cana em meio de cana e PCA. In: SEMINÁRIO AGROINDUSTRIAL "LUIZ DE QUEIROZ", 2., Piracicaba, 1983.
- HUANG, Y.C.; EDWARDS, C.G.; PETERSON, J.C.; HAAG, K.M. Relationship between sluggish fermentations and the antagonism of yeast by lactic acid bacteria. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.47, p. 1-10, 1996.
- IEMMA, J.; ALCARDE, A.R.; WALDER, J.M.M.; HORII, J. Comparação entre a Radiação Gama e Kamoran HJ na descontaminação do mosto de caldo de cana-de -açúcar. In: ENCONTRO CIENTÍFICO DOS PÓS-GRADUANDOS, 6., Piracicaba, 2000. **Resumos**. Piracicaba: CENA/USP, 2000.
- INGLEDEW, W.M. The biochemistry of alcohol production In: LYONS, T.P.; KELSALL, D.R.; MURTAGH, J.E.(Ed.) **The alcohol textbook**. Nottingham: Nottingham University Press, 1995. p.55-79.

- KANEKO, T.; YAMAMOTO, Y. Killing of yeast by acid bacteria. **Journal of the Institute of Brewing**, v.74, n.5, p.476, 1968.
- KHAN, A.R.; HOQ, M.M. Lactic acid bacteria as contaminant in alcohol fermentation. **Bangladesh Journal of Microbiology**, v.7, n.2, p.119-121, 1990.
- KUNKEE, R.E.; AMERINE, M.A. Yeast In wine-making. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. (Ed.) **The yeasts**. London: Academic Press, 1970. v.3, cap.2, p. 6-71.
- MAIORELLA, B.; BLANCH, H.W.; WILKE, C.H. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.25, p.103-121, 1983.
- MAKANJUOLA, D.B.; TYMON, A.; SPRINGHAM, D.G. Some effects of lactic acid bacteria on laboratory-scale yeast fermentation. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.14, n.4, p.350-357, 1992.
- NARENDRANATH, N.V.; POWER, R. Effect of yeast inoculation rate on the metabolism of contaminating lactocilli during fermentation of corn mash. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.31, p.581-584, 2004.
- OLIVA-NETO, P. Influência da contaminação por bactérias lácticas na fermentação alcoólica por batelada-alimentada. Campinas, 1990. 199p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas.

- OLIVA-NETO, P; YOKOYA, F. Effects of nutritional factors on growth of *Lactobacillus fermentum* mixed with *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation. **Revista de Microbiologia**, v.28, n., p.25-31, 1997.
- OLIVEIRA, A.J.; GALLO, C.R.; ALCARDE, V.E.; GODOY, A.; AMORIM, H.V. **Métodos para o controle microbiológico na produção de álcool e açúcar**. Piracicaba: FERMENTEC; FEALQ; ESALQ-USP, 1996. 89p.
- PÁCA, J. Reserve carbohydrate metabolism and cell survival in aerobically starving baker's yeast. **Journal of Institute of Brewing**, v.87, p.147-150, 1981.
- POSTMES, T.; BOGAARD, A.E.; HAZEN, M. The sterilization of honey with cobalt 60 gamma radiation: a study of honey spike with spores of *Clostridium botulinum* and *Bacillus subtilis*. **Experientia**, v.51, n.9, p.986-989, 1995.
- PREGNOLATO, W.; PREGNOLATO, N.P. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para a análise de alimentos**. 3.ed. v.1. São Paulo, 1985. 533p.
- RODINI, M.A.T. Isolamento, caracterização e identificação de bactérias contaminantes de dornas de fermentação nas destilarias de etanol. Piracicaba, 1985. 92p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

ROSALES, S.Y.R.; ANGELIS, D.D.F.; FURLETTI, M.E.M.; VIOTTI, A.V. Propostas de meios de cultivo para dinamizar a identificação dos principais problemas microbiológicos da indústria alcooleira. In: Congresso Nacional da STAB, 4., Convenção da Associação Civil de Técnicos Açucareiros da América Latina e das Caraíbas, 5., São Paulo, 1984. **Anais**. São Paulo: STAB, 1987.

ROSALES, S.Y.R. Contaminantes bacterianos da fermentação etanólica: isolamento em meios diferenciais, identificação e avaliação de desinfetantes. Rio Claro, 1989. 200p. Tese (Doutorado) – Faculdade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ROTHSTEIN, A.; BRUCE, M. The efflux of potassium from yeast cells into a potassium free medium. **Journal Cellular Comparative Physiology**, v.51, n.3, p.439-455, 1958.

SAS Institute. **SAS users guide: statistic**. 6.ed. Cary: SAS Institute, 1990. 584p.

SEASTON, A.; CARR, G.; EDDY, A.A. The concentration of glycine by preparations of the yeast *Saccharomyces carlsbergensis* depleted of adenosine triphosphate: effects of proton gradients and uncoupling agents. **Biochemical Journal**, v.154, n.3, p.669-676, 1976.

SHIN, J.; PYUN, Y. Inactivation of *Lactobacillus plantarum* by pulsed-microwave irradiation. **Journal of Food Science**, v.62, n.1, p.163-166, 1997.

SKINNER, K.A.; LEATHERS, T.D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.31, p.401-408, 2004.

- SILVA, E. da. Estudo preliminar de controle da infecção de moendas através de bactericidas. In: Seminário Copersucar da Agroindústria Açucareira, 3., Águas de Lindóia, 1975. **Anais**. Piracicaba: Copersucar, 1975. p.473-483.
- SILVA, N. Influência do resfriamento em torres sobre a microflora do caldo de cana no processo de produção de álcool. Campinas, 1988. 117p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas.
- SOLS, A.; GANCEDO, C.; DELAFUENTE G. Energy-yielding metabolism In yeast. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. (Ed.) **The yeasts**. London: Academic Press, 1971. v.2, cap.7, p. 271-307.
- STUPIELLO, M.G. Avaliação de metodologia para estudo de alguns antimicrobianos frente às bactérias gram (+) isoladas da fermentação alcoólica. Piracicaba, 1993. 96p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- TANIWAKI, M.H. Meios de cultura para contagem de fungos em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n.2, p.132-141, 1996.
- THOMAS, K.C.; HYNES, S.H.; INGLEDEW, W.M. Effect of lactobacilli on yeast growth, viability and batch and semi continuos alcoholic fermentation of corn mash. **Journal of Applied Microbiology**, v.90, p.819-828, 2001.
- URBAIN, W.M. **Food irradiation**. Orlando: Academic Press, 1986. 351p.
- YOKOYA, F. Problemas com contaminantes na fermentação alcoólica. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.9, n.6, p.38-39, 1991.

YOKOYA, F. Microbiologia do processo de fermentação. In: EGUCHI, S.Y.; YOKOYA, F.; CANHOS, V.P.; GALLO, C.R. **Pontos críticos microbiológicos em usinas de açúcar e álcool**. Campinas: Fundação tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", 1989. p.1-22.

ZAGO, E.A.; SILVA, L.F.L.F.; BERNARDINO, C.D.; AMORIM, H.V. **Métodos analíticos para o controle da produção de álcool e açúcar**. 2.ed. Piracicaba: Fermentec, FEALQ, ESALQ-USP, 1996. p.59.

ZELLER, A.L.V.; OLIVEIRA, A.J.; ZAGO, E.A. Conservação de xarope de cana-de-açúcar pelo emprego da radiação gama. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.2, n.4, p.29-36, 1984.

APÊNDICE

Tabela 32. Resultados das determinações físico-químicas e microbiológicas do 1º ensaio dos cultivos mistos de *S. cerevisiae* com bactérias ativas

Microrganismos		Períodos	Determinações físico-químicas			Determinações microbiológicas		
			Acidez total	Acidez volátil	pH	Viabilidade celular	Taxa de Brotamento	População de células
			(mg de ácido acético/L)	-	(%)	(log UFC/mL)		
Cultivo misto de <i>S. cerevisiae</i> com	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	0	763	300	6,28	99,40	16,60	7,916
		24	3455	375	4,80	98,00	12,40	8,157
		48	740	60	6,12	98,00	10,10	8,171
		72	509	0	7,10	97,60	8,00	8,152
	<i>Bacillus subtilis</i>	0	2595	260	4,80	96,00	22,60	7,893
		24	3520	1230	5,12	68,20	9,20	7,879
		48	2590	1235	5,00	49,20	6,30	7,799
		72	2810	1385	4,94	39,20	3,30	7,733
	<i>Bacillus coagulans</i>	0	720	100	5,92	97,05	15,90	7,877
		24	3090	266	4,89	99,20	12,00	8,202
		48	679	101	6,38	98,10	11,90	8,314
		72	603	15	6,08	98,60	10,60	8,280
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0	860	45	6,65	99,00	17,20	8,102
		24	2907	250	5,28	99,60	13,00	8,259
		48	780	65	6,46	99,50	9,40	8,253
		72	538	0	7,17	99,20	7,40	8,239
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	0	5315	1139	3,77	98,00	16,10	8,021
		24	7665	1594	3,75	77,20	12,50	7,845
		48	6000	2582	3,82	48,40	7,10	7,789
		72	6020	3031	3,91	25,90	5,40	7,635
<i>S. cerevisiae</i> (controle)		0	1145	220	5,35	97,00	15,80	8,022
		24	3644	500	5,03	98,60	15,10	8,297
		48	1092	399	5,63	98,80	13,40	8,358
		72	1334	404	5,60	99,00	11,50	8,418

Tabela 33. Resultados das determinações físico-químicas e microbiológicas do 2º ensaio dos cultivos mistos de *S. cerevisiae* com bactérias ativas

Microrganismos		Períodos	Determinações físico-químicas			Determinações microbiológicas		
			Acidez total	Acidez volátil	pH	Viabilidade celular	Taxa de Brotamento	População de células
			(mg de ácido acético/L)	-	(%)		(log UFC/mL)	
Cultivo misto de <i>S. cerevisiae</i> com	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	0	857	387	6,44	98,50	16,80	7,913
		24	3802	610	5,00	97,70	12,40	8,157
		48	833	75	6,34	98,70	10,30	8,170
		72	641	30	7,16	97,40	8,10	8,153
	<i>Bacillus subtilis</i>	0	3078	321	4,60	96,30	21,90	7,894
		24	3787	1570	5,41	68,63	9,50	7,878
		48	2101	1495	5,25	49,96	6,70	7,798
		72	2969	1615	5,09	39,37	3,40	7,732
	<i>Bacillus coagulans</i>	0	843	156	6,18	96,80	15,80	7,875
		24	3150	225	4,72	99,27	11,90	8,203
		48	695	139	6,50	98,46	12,00	8,314
		72	697	45	6,16	99,10	10,50	8,281
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0	944	74	6,55	98,70	17,20	8,103
		24	3143	427	5,56	99,10	12,80	8,257
		48	839	124	6,68	98,00	9,50	8,256
		72	682	26	7,35	99,10	7,40	8,240
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	0	6150	1485	3,88	98,60	16,00	8,023
		24	7914	1823	3,80	77,59	12,60	7,846
		48	6069	2849	3,93	49,90	7,30	7,791
		72	6500	3480	4,05	25,10	5,30	7,638
<i>S. cerevisiae</i> (controle)		0	1776	299	5,53	97,16	15,90	8,020
		24	4063	532	5,15	98,30	15,20	8,296
		48	1731	443	5,80	98,70	13,20	8,356
		72	1585	483	5,86	99,20	11,20	8,419

Tabela 34. Resultados das determinações físico-químicas e microbiológicas do 3º ensaio dos cultivos mistos de *S. cerevisiae* com bactérias ativas

Microrganismos		Períodos	Determinações físico-químicas			Determinações microbiológicas		
			Acidez total	Acidez volátil	pH	Viabilidade celular	Taxa de Brotamento	População de células
			(mg de ácido acético/L)	-	(%)	(log UFC/mL)		
Cultivo misto de <i>S. cerevisiae</i> com	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	0	750	273	6,21	99,20	16,50	7,918
		24	3408	440	4,75	97,90	12,20	8,156
		48	737	55	6,20	98,40	10,00	8,169
		72	485	54	7,04	97,80	8,30	8,150
	<i>Bacillus subtilis</i>	0	2112	259	4,78	95,80	23,30	7,890
		24	3253	1250	5,13	68,37	9,20	7,878
		48	3079	1275	4,75	48,80	6,20	7,800
		72	2651	1455	4,79	39,03	3,20	7,730
	<i>Bacillus coagulans</i>	0	597	104	5,90	97,15	16,10	7,879
		24	3150	225	4,72	99,27	11,90	8,203
		48	595	105	6,26	98,04	12,00	8,313
		72	605	62	6,00	98,70	10,70	8,281
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0	836	25	6,75	99,30	17,00	8,100
		24	2875	243	5,27	99,00	12,90	8,260
		48	721	66	6,54	98,30	9,30	8,251
		72	565	19	7,23	98,60	7,30	8,237
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	0	5680	1093	3,66	97,80	15,80	8,021
		24	7716	1665	3,76	77,11	12,40	7,842
		48	5970	2615	3,83	48,40	7,20	7,787
		72	5840	3182	3,83	27,00	5,60	7,636
<i>S. cerevisiae</i> (controle)		0	1114	211	5,29	97,06	16,00	8,019
		24	3825	480	5,00	98,10	15,00	8,296
		48	1092	376	5,64	98,90	13,30	8,352
		72	1083	385	5,64	99,10	11,30	8,421

Tabela 35. Resultados das determinações físico-químicas e microbiológicas do 1º ensaio realizado com os cultivos mistos de *S. cerevisiae* com bactérias tratadas com calor úmido

Microrganismos		Períodos	Determinações físico-químicas			Determinações microbiológicas		
			Acidez total	Acidez volátil	pH	Viabilidade celular	Taxa de Brotamento	População de células
			(mg de ácido acético/L)	-	(%)		(log UFC/mL)	
Cultivo misto de <i>S. cerevisiae</i> com	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	0	1209	184	5,42	96,00	30,20	7,921
		24	3627	283	4,96	97,80	9,70	8,285
		48	934	156	5,90	97,60	6,50	8,415
		72	906	152	5,92	98,00	6,00	8,367
	<i>Bacillus subtilis</i>	0	1300	180	5,57	97,60	40,00	7,782
		24	3300	300	5,22	98,30	12,50	8,233
		48	997	126	5,87	97,90	9,50	8,274
		72	1004	101	5,87	98,30	9,00	8,264
	<i>Bacillus coagulans</i>	0	1100	168	5,42	96,20	22,70	7,981
		24	4435	266	5,06	98,20	10,30	8,272
		48	874	143	6,03	97,00	6,00	8,420
		72	883	158	5,99	98,00	6,60	8348
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0	1328	218	5046	93,00	30,90	7,815
		24	3394	309	4,93	97,30	10,70	8,196
		48	983	202	5,96	97,00	7,90	8,330
		72	925	163	5,99	97,70	7,30	8,316
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	0	4416	877	3,99	91,60	25,40	7,783
		24	6200	1330	4,22	94,90	21,60	8,025
		48	4208	1511	4014	95,20	17,20	7,992
		72	3523	1073	4,34	95,80	18,40	8,005
<i>S. cerevisiae</i> (controle)		0	1151	147	5,54	95,00	22,60	7,825
		24	4300	234	5,20	97,60	17,60	8,302
		48	959	173	5,72	97,50	12,80	8,384
		72	955	173	5,74	97,60	10,90	8,376

Tabela 36. Resultados das determinações físico-químicas e microbiológicas do 2º ensaio realizado com os cultivos mistos de *S. cerevisiae* com bactérias tratadas com calor úmido

Microrganismos		Períodos	Determinações físico-químicas			Determinações microbiológicas		
			Acidez total	Acidez volátil	pH	Viabilidade celular	Taxa de Brotamento	População de células
			(mg de ácido acético/L)	-		(%)		(log UFC/mL)
Cultivo misto de <i>S. cerevisiae</i> com	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	0	1269	165	5,32	96,40	31,60	7,923
		24	3557	269	5,12	97,50	9,50	8,283
		48	964	148	5,89	97,80	6,30	8,412
		72	902	152	5,89	98,20	6,10	8,365
	<i>Bacillus subtilis</i>	0	1476	168	5,37	97,75	33,00	7,780
		24	3402	312	5,02	98,20	10,60	8,232
		48	993	138	5,86	98,00	9,30	8,273
		72	1001	114	5,82	98,10	9,30	8,262
	<i>Bacillus coagulans</i>	0	1150	184	5049	96,50	22,30	7,982
		24	4535	286	5,08	98,30	11,20	8,270
		48	894	179	6,07	97,10	6,00	8,418
		72	899	146	6,01	98,60	6,30	8,345
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0	1346	219	5,49	94,00	29,90	7,813
		24	3334	324	4,99	97,60	10,50	8,196
		48	989	205	5,89	97,80	7,70	8,328
		72	916	183	6,02	98,20	7,0	8,314
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	0	4486	887	4,01	95,90	26,30	7,781
		24	6300	1358	4,36	95,00	22,40	8,021
		48	4246	1495	4,20	95,10	16,90	7,994
		72	3453	1095	4,41	95,60	18,30	8,001
<i>S. cerevisiae</i> (controle)		0	1203	150	5,60	95,60	24,10	7,826
		24	4330	268	5,16	97,80	18,00	8,300
		48	964	168	5,79	97,60	14,00	8,385
		72	948	170	5,69	97,30	12,00	8,377

Tabela 37. Resultados das determinações físico-químicas e microbiológicas do 1º ensaio realizado com os cultivos mistos de *S. cerevisiae* com bactérias tratadas com antimicrobiano Kamoran HJ

Microrganismos		Períodos	Determinações físico-químicas			Determinações microbiológicas		
			Acidez total	Acidez volátil	pH	Viabilidade celular	Taxa de Brotamento	População de células
			(mg de ácido acético/L)	-	(%)	(log UFC/mL)		
Cultivo misto de <i>S. cerevisiae</i> com	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	0	1473	170	5,98	97,00	15,60	8,103
		24	1349	218	5,22	98,90	19,20	8,204
		48	1276	0	6,16	98,80	14,50	8,212
		72	1210	0	6,89	97,70	15,80	8,274
	<i>Bacillus subtilis</i>	0	1563	134	5,58	96,55	15,60	8,045
		24	2600	248	5,30	98,80	23,20	8,132
		48	1555	0	6,13	99,50	13,80	8,274
		72	1196	0	6,86	98,50	10,20	8,255
	<i>Bacillus coagulans</i>	0	1406	105	5,93	97,90	13,00	8,030
		24	2691	292	5,15	99,40	20,60	8,193
		48	1206	0	6,09	99,30	12,10	8,262
		72	1145	0	6,73	98,70	10,10	8,303
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0	1336	202	5,32	96,00	30,00	7,928
		24	3646	291	5,04	96,30	15,20	8,232
		48	1067	58	6,17	97,60	7,30	8,271
		72	1016	0	6,30	97,40	8,30	8,228
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	0	4161	713	4,18	92,60	36,10	7,756
		24	5910	12,22	3,96	94,80	26,60	7,983
		48	3860	1470	4,04	95,40	24,90	8,042
		72	3208	1142	4,29	95,50	22,10	8,029
<i>S. cerevisiae</i> (controle)		0	1265	144	5,50	96,50	21,60	7,975
		24	3942	184	5,22	98,20	20,70	8,212
		48	1032	52	5,00	98,30	16,20	8,274
		72	1091	66	6,01	98,20	14,40	8,343

Tabela 38. Resultados das determinações físico-químicas e microbiológicas do 2º ensaio realizado com os cultivos mistos de *S. cerevisiae* com bactérias tratadas com antimicrobiano Kamoran HJ

Microrganismos		Períodos	Determinações físico-químicas			Determinações microbiológicas		
			Acidez total	Acidez volátil	pH	Viabilidade celular	Taxa de Brotamento	População de células
			(mg de ácido acético/L)	-	(%)	(log UFC/mL)		
Cultivo misto de <i>S. cerevisiae</i> com	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	0	1499	162	5,89	96,80	15,90	8,101
		24	1389	225	5,26	98,80	21,00	8,203
		48	1273	31	6,14	98,70	15,10	8,210
		72	1212	26	6,75	97,30	15,90	8,274
	<i>Bacillus subtilis</i>	0	1625	156	5,62	96,85	15,60	8,044
		24	2660	249	5,16	98,60	21,20	8,126
		48	1253	39	6,09	99,30	14,30	8,275
		72	1180	29	6,84	98,40	11,00	8,253
	<i>Bacillus coagulans</i>	0	1403	115	5,89	97,80	12,50	8,029
		24	2685	272	5,16	99,20	19,80	8,195
		48	1186	38	6,20	99,00	11,60	8,260
		72	1144	25	6,89	98,90	9,90	8,301
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0	1352	199	5,36	96,00	24,30	7,930
		24	366	286	5,12	96,20	14,90	8,230
		48	1098	53	6,15	97,50	10,20	8,269
		72	1046	32	6,29	97,30	9,50	8,226
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	0	4123	746	4,16	96,00	31,00	7,758
		24	5896	1234	3,99	96,00	24,00	7,982
		48	3799	1478	4,03	95,80	23,70	8,041
		72	3199	1146	4,31	95,30	21,40	8,028
<i>S. cerevisiae</i> (controle)		0	1264	152	5,65	96,80	22,90	7,976
		24	3896	183	5,26	98,10	23,40	8,210
		48	1043	55	5,12	98,50	15,90	8,272
		72	1065	61	5,96	98,50	13,80	8,341

Tabela 39. Resultados das determinações físico-químicas e microbiológicas do 1º ensaio realizado com os cultivos mistos de *S. cerevisiae* com bactérias tratadas com radiação gama

Microrganismos		Períodos	Determinações físico-químicas			Determinações microbiológicas		
			Acidez total	Acidez volátil	pH	Viabilidade celular	Taxa de Brotamento	População de células
			(mg de ácido acético/L)	-		(%)		(log UFC/mL)
Cultivo misto de <i>S. cerevisiae</i> com	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	0	1629	265	4,72	96,60	28,80	8,103
		24	4575	432	4,61	94,20	25,20	8,204
		48	1048	137	5,17	96,40	23,40	8,212
		72	956	92	5,30	95,60	15,30	8,274
	<i>Bacillus subtilis</i>	0	2180	151	5,28	97,20	25,50	8,045
		24	2853	191	5,19	90,30	21,00	8,032
		48	1104	164	5,60	88,30	19,50	7,974
		72	1362	94	5,48	88,50	13,10	7,855
	<i>Bacillus coagulans</i>	0	1568	298	4,68	96,70	27,30	8,030
		24	4230	435	4,64	97,90	26,50	8,123
		48	1247	263	4,99	98,00	24,10	8,209
		72	1079	170	5,16	98,60	13,30	8,233
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0	1591	270	4,85	96,60	20,10	7,928
		24	4950	402	4,78	97,20	26,40	8,232
		48	1163	202	5,29	97,10	25,10	8,271
		72	1255	167	5,28	97,60	16,10	8,328
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	0	4544	934	3,75	97,20	25,90	7,956
		24	7290	1110	3,82	96,40	28,20	7,983
		48	4070	1153	3,93	93,40	28,30	7,942
		72	4200	1711	4,00	93,00	26,20	7,929
<i>S. cerevisiae</i> (controle)		0	972	155	4,78	97,00	27,90	8,075
		24	3590	275	4,65	98,30	31,30	8,225
		48	825	218	4,94	98,10	28,00	8,297
		72	741	157	5,02	98,10	16,80	8,359

Tabela 40. Resultados das determinações físico-químicas e microbiológicas do 2º ensaio realizado com os cultivos mistos de *S. cerevisiae* com bactérias tratadas com radiação gama

Microrganismos		Períodos	Determinações físico-químicas			Determinações microbiológicas		
			Acidez total	Acidez volátil	pH	Viabilidade celular	Taxa de Brotamento	População de células
			(mg de ácido acético/L)	-	(%)	(log UFC/mL)		
Cultivo misto de <i>S. cerevisiae</i> com	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	0	1560	269	4,72	96,50	28,80	8,102
		24	4369	446	4,65	94,00	25,80	8,201
		48	1055	145	5,16	96,30	23,80	8,212
		72	1001	96	5,32	95,40	15,50	8,275
	<i>Bacillus subtilis</i>	0	2142	163	5,26	97,30	25,90	8,044
		24	2849	185	5,18	90,40	21,00	8,031
		48	1115	176	5,68	88,50	19,10	7,975
		72	1265	95	5,54	88,50	13,30	7,857
	<i>Bacillus coagulans</i>	0	1564	299	4,72	96,80	27,10	8,029
		24	4169	443	4,65	98,00	26,70	8,124
		48	1267	271	5,01	98,10	23,90	8,207
		72	1103	176	5,15	98,60	13,50	8,231
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0	1610	278	4,86	96,70	20,30	7,927
		24	4876	414	4,76	97,40	26,40	8,233
		48	1146	206	5,27	97,10	25,30	8,269
		72	1256	179	5,28	97,70	16,00	8,330
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	0	4544	948	3,78	97,40	25,00	7,954
		24	6989	1116	3,81	96,50	28,20	7,982
		48	4010	1169	3,95	93,50	28,50	7,941
		72	4187	1738	4,01	92,80	26,60	7,930
<i>S. cerevisiae</i> (controle)		0	968	156	4,76	97,20	27,80	8,073
		24	3590	275	4,65	98,30	31,30	8,225
		48	824	226	4,95	98,20	28,10	8,295
		72	759	165	5,01	98,30	16,70	8,361

Tabela 41. Média geral, R^2 , coeficiente de variação e desvio padrão para as variáveis quando em cultivo misto de bactérias ativas e *S. cerevisiae*

Variável	Média Geral	R^2	Coeficiente de variação	Desvio Padrão
Acidez Total	2540,542 mg de ác. acético/L	0,9910	9,43	239,696
Acidez volátil	698,5417 mg de ác. acético/L	0,9905	14,55	101,658
pH	5,446528	0,9894	2,31	0,126
Viabilidade celular	86,60667 %	0,9997	0,47	0,407
Taxa de brotamento	11,78611 %	0,9986	1,63	0,192
População de células	8,066847 log UFC/mL	0,9999	0,02	0,002

Tabela 42. Média geral, R^2 , coeficiente de variação e desvio padrão para as variáveis em cultivo misto de bactérias tratadas com calor e *S. cerevisiae*

Variável	Média Geral	R^2	Coeficiente de variação	Desvio Padrão
Acidez Total	2218,083 mg de ác. acético/L	0,9996	1,98	44,002
Acidez volátil	362,7083 mg de ác. acético/L	0,9995	3,27	11,881
pH	5,354375	0,9950	1,13	0,060
Viabilidade celular	96,89688 %	0,8972	0,69	0,675
Taxa de brotamento	15,43750 %	0,9914	7,45	1,150
População de células	8,162333 log UFC/mL	0,9999	0,02	0,001

Tabela 43. Média geral, R^2 , coeficiente de variação e desvio padrão para as variáveis quando em cultivo misto de bactérias tratadas com Kamoran HJ e *S. cerevisiae*

Variável	Média Geral	R^2	Coeficiente de variação	Desvio Padrão
Acidez Total	2080,625 mg de ác. acético/L	0,9998	1,04	21,704
Acidez volátil	285,4792 mg de ác. acético/L	0,9993	4,97	14,187
pH	5,548750	0,9978	0,98	0,055
Viabilidade celular	97,48958 %	0,9309	0,55	0,541
Taxa de brotamento	17,62292 %	0,9742	8,04	1,416
População de células	8,147792 log UFC/mL	0,9999	0,02	0,001

Tabela 44. Média geral, R^2 , coeficiente de variação e desvio padrão para as variáveis quando em cultivo misto de bactérias tratadas com irradiação e *S. cerevisiae*

Variável	Média Geral	R^2	Coeficiente de variação	Desvio Padrão
Acidez Total	2442,625 mg de ác. acético/L	0,9994	2,40	58,780
Acidez volátil	397,7083 mg de ác. acético/L	0,9998	1,85	7,354
pH	4,833750	0,9992	0,41	0,019
Viabilidade celular	95,78958 %	0,9994	0,11	0,097
Taxa de brotamento	23,49583 %	0,9991	0,92	0,215
População de células	8,117250 log UFC/mL	0,9999	0,01	0,002

Tabela 45. Quadrado médio (Q.M.) da análise de variância, seguido da significância do Teste F dos fatores Microorganismo (Micro), Período (Per) e Interação (Micro * Per) para todas as variáveis em cultivo misto de bactérias ativas e *S. cerevisiae*

Fonte de variação	G.L.	Ac. total	Ac. volátil	pH	Viabilidade	Brotamento	População
		Q.M.					
Variável	23	13207619,5**	2271378,57**	3,13**	1516,50**	58,37**	0,15**
Micro	5	47393312,8**	8249030,19**	10,70**	4044,06**	22,60**	0,46**
Per	3	20189007,4**	874843,75**	3,14**	1537,14**	314,16**	0,08**
Micro * Per	15	416110,8**	558135,00**	0,61**	669,85**	19,14**	0,06**
Resíduos	48	57454,2	10334,39	0,02	0,16	0,04	0,0000027
Total	71						

Tabela 46. Quadrado médio (Q.M.) da análise de variância, seguido da significância do Teste F dos fatores Microorganismo (Micro), Período (Per) e Interação (Micro * Per) para todas as variáveis em cultivo misto de bactérias tratadas com calor e *S. cerevisiae*

Fonte de variação	G.L.	Ac. total	Ac. volátil	pH	Viabilidade	Brotamento	População
		Q.M.					
Variável	23	5378300,9**	320490,78**	0,77**	4,16**	160,32**	0,09**
Micro	5	10992685,78**	1358829,48**	2,53**	9,64**	87,19**	0,11**
Per	3	21884073,50**	72051,14**	1,33**	11,44**	914,64**	0,53**
Micro * Per	15	205684,82**	24065,80**	0,07**	0,87ns	33,83**	0,008**
Resíduos	24	1936,3	141,17	0,0037	0,46	1,32	0,0000023
Total	47						

Tabela 47. Quadrado médio (Q.M.) da análise de variância, seguido da significância do Teste F dos fatores Microorganismo (Micro), Período (Per) e Interação (Micro * Per) para todas as variáveis em cultivo misto de bactérias tratadas com Kamoran HJ e *S. cerevisiae*

Fonte de variação	G.L.	Ac. total	Ac. volátil	pH	Viabilidade	Brotamento	População
		Q.M.					
Variável	23	3583991,88**	348467,98**	1,44**	4,12**	79,31**	0,05**
Micro	5	9435800,00**	1416183,52**	4,29**	13,76**	163,97**	0,08**
Per	3	9077008,97**	88860,35**	2,92**	6,87**	186,39**	0,18**
Micro * Per	15	534785,76**	44484,32**	0,19**	0,35ns	29,67**	0,0042**
Resíduos	24	471,08	201,27	0,003	0,292	2,01	0,0000021
Total	47						

Tabela 48. Quadrado médio (Q.M.) da análise de variância, seguido da significância do Teste F dos fatores Microorganismo (Micro), Período (Per) e Interação (Micro * Per) para todas as variáveis em cultivo misto de bactérias tratadas com irradiação e *S. cerevisiae*

Fonte de variação	G.L.	Ac. total	Ac. volátil	pH	Viabilidade	Brotamento	População
		Q.M.					
Variável	23	6108853,28**	340383,22**	0,54**	17,94**	55,59**	0,05**
Micro	5	12787004,55**	1364905,68**	2,07**	53,05**	57,21**	0,12**
Per	3	23829108,97**	40800,75**	0,57**	7,68**	240,55**	0,06**
Micro * Per	15	338751,57**	58792,22**	0,02**	8,29**	18,07**	0,02**
Resíduos	24	3455,2	54,08	0,0004	0,0094	0,05	0,000002
Total	47						

Tabela 49. Média geral, R^2 , coeficiente de variação e desvio padrão para as contagens microbiológicas quando em comparação dos meios de cultivo convencionais (PCA, MRSA e YEPDA) e alternativo (MCC-agar) no início (0 h) do período de incubação das culturas mistas de bactéria e levedura

Microorganismo	Média Geral (log UFC/mL)	R^2	Coeficiente de variação	Desvio Padrão
<i>B. stearothermophilus</i>	8,88	0,9848	0,08	0,007
<i>B. coagulans</i>	7,10	0,8787	0,09	0,007
<i>B. subtilis</i>	7,64	0,9689	0,12	0,009
<i>L. fermentum</i>	6,59	0,9975	0,12	0,008
<i>L. plantarum</i>	7,12	0,9995	0,08	0,006
<i>S. cerevisiae</i>	7,64	0,9659	0,06	0,005

Tabela 50. Média geral, R^2 , coeficiente de variação e desvio padrão para as contagens microbiológicas quando em comparação dos meios de cultivo convencionais (PCA, MRSA e YEPDA) e alternativo (MCC-agar) no final (72 h) do período de incubação das culturas mistas de bactéria e levedura

Microorganismo	Média Geral (log UFC/mL)	R^2	Coeficiente de variação	Desvio Padrão
<i>B. stearothermophilus</i>	8,45	0,9921	0,06	0,005
<i>B. coagulans</i>	7,89	0,9942	0,05	0,004
<i>B. subtilis</i>	8,79	0,9990	0,04	0,004
<i>L. fermentum</i>	6,85	0,9941	0,06	0,004
<i>L. plantarum</i>	7,22	0,9996	0,07	0,005
<i>S. cerevisiae</i>	8,61	0,9905	0,05	0,005

Tabela 51. Quadrado médio (Q.M.) da análise de variância, seguido da significância do Teste F para as contagens microbiológicas quando em comparação dos meios de cultivo convencionais (PCA, MRSA e YEPDA) e alternativo (MCC-agar) no início (0 h) do período de incubação das culturas mistas de bactérias e *S. cerevisiae*

Fonte de variação	G.L.	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Lactobac. fermentum</i>	<i>Lactobac. plantarum</i>	<i>S. cerevisiae</i>
		Q.M.					
Meios de cultivo	1	0,0671**	0,0061**	3,13**	0,4868**	1,541**	0,0109**
Resíduos	34	0,00005	0,000038	0,02	0,00006	0,00004	0,00002
Total	35						

Tabela 52. Quadrado médio (Q.M.) da análise de variância, seguido da significância do Teste F para as contagens microbiológicas quando em comparação dos meios de cultivo convencionais (PCA, MRSA e YEPDA) e alternativo (MCC-agar) no final (72 h) do período de incubação das culturas mistas de bactérias e *S. cerevisiae*

Fonte de variação	G.L.	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Lactobac. fermentum</i>	<i>Lactobac. plantarum</i>	<i>S. cerevisiae</i>
		Q.M.					
Meios de cultivo	1	0,0588**	0,0382**	0,2214**	0,0536**	1,1878**	0,0372**
Resíduos	34	0,00003	0,00001	0,000009	0,00002	0,00002	0,00002
Total	35						