Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Relações tróficas entre *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus* sp. nas condições da fermentação alcoólica industrial

Stefania Vital

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2013

Stefania Vital
Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas

Relações tróficas entre *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus* sp. nas condições da fermentação alcoólica industrial

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2013

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

Vital, Stefania
Relações tróficas entre *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus* sp. nas condições da fermentação alcoólica industrial / Stefania Vital.- - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2013.
91 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Fermentação alcoólica 2. *Saccharomyces cerevisiae* 3. *Lactobacillus* 4. Metabólitos I. Título

CDD 660.28449
V836r

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

Aos meus maravilhosos pais Angela e Claudinê,

ao meu amado esposo Fabrício,

à minha querida irmã Priscila,

ao meu irmão Elivelto, cunhada Joyce e meus sobrinhos Eduardo e Henrique,

dedico...

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e por todas as bênçãos diárias. Por me dar forças sempre para seguir em frente.

Aos meus amados pais, por me incentivarem a seguir nos estudos, por todo apoio, amor e compreensão de sempre. Amo vocês!

Ao meu esposo Fabrício pelo amor, dedicação e ajuda nos momentos difíceis. Te amo!

À minha irmã Priscila, pelo carinho, conselhos e por simplesmente existir na minha vida.

Ao meu irmão Elivelto e minha cunha cunhada Joyce, por sempre se preocuparem comigo. Aos meus sobrinhos Eduardo e Henrique por tornarem minha vida mais alegre.

Às minhas cachorras, por representarem tanto na vida. À Sofia, minha companheira de 14 anos que infelizmente se foi há pouco tempo.

Ao meu orientador Luiz Carlos Basso, por me guiar pelo mundo da bioquímica e me permitir realizar esse trabalho.

Ao amigo Cometa, por todas as risadas, bom humor e ajuda imprescindível.

Às amigas de laboratório, Natália, Renata, Camila, Nara, Elisa, Elisângela e Thalita. Obrigada pela ajuda nos trabalhos, pelo convívio no dia a dia, mas principalmente pelo companheirismo e amizade dentro e fora do laboratório.

Aos novos companheiros de laboratório Osni e Ananda pela ajuda na finalização do trabalho.

Ao Osmar Netto, pela identificação das bactérias.

À todos os meus amigos e pessoas que direta ou indiretamente ajudaram a concluir essa etapa.

Meu sincero obrigada!

"Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos."

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

RESUMO 11
ABSTRACT 13
1 INTRODUÇÃO 15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 17
2.1 O ambiente fermentativo 17
2.2 Bactérias láticas 18
2.3 Interações entre levedura e bactéria 21
2.4 Prejuízos da contaminação bacteriana 23
2.5 Produção de glicerol 25
3 OBJETIVO 27
4 MATERIAL E MÉTODOS 29
4.1 Microrganismos 29
4.2 Cultivo dos microrganismos 29
4.3 Preservação das bactérias 30
4.4 Teste de metabolismo 31
4.5 Teste fermentativo 32
4.5.1 Experimento suporte: perfil de consumo de açúcares e formação de etanol das leveduras PE-2 e Mauri 34
4.6 Análises químicas e microbiológicas 34
4.6.1 Análises microbiológicas 34
4.6.2 Análises de açúcares mediante HPAEC 35
4.6.3 Análises de ácidos orgânicos, manitol e glicerol mediante HPLC 35
4.6.4 Análises de pH, Biomassa e velocidade de fermentação 35
4.6.5 Análises de etanol e cálculo da eficiência fermentativa 36
4.7 Análise estatística 36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 37
5.1 Perfil de consumo de açúcares e produção de etanol das leveduras PE-2 e Mauri (experimento suporte) 37
5.2 Isolamento, teste e escolha das bactérias 38
5.3 Contaminação, viabilidade e taxa de brotamento 39
5.4 Valores de pH e teores de lactato 44
5.5 Teores de acetato 47
5.6 Teores de succinato 49

5.7 Teores de glicerol 51
5.8 Teores de manitol 52
5.9 Açúcares residuais, etanol e rendimento alcoólico 54
5.10 Acréscimo de biomassa 61
5.11 Velocidade de fermentação 63
6 CONCLUSÕES 69
REFERÊNCIAS 71
ANEXOS 77

RESUMO

Relações tróficas entre *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus* sp. nas condições da fermentação alcoólica industrial

Historicamente o Brasil tem marcado importante presença no setor sucroalcoleiro devido a fatos como o Programa Nacional do Álcool (Pró-álcool) e mais recentemente a tecnologia dos carros flex. Esses fatos somados aos problemas da utilização de uma matriz energética não renovável, cara e muito poluente como o petróleo, trazem a importância de aperfeiçoar a atividade no país. No entanto, diversos fatores afetam a fermentação e reduzem o rendimento fermentativo, como a entrada de contaminantes no processo e a pemanência deles, através de problemas como a qualidade da matéria prima e práticas como o processo de "Melle-Boinot, respectivamente. Estudos anteriores revelam que grande parte desses contaminantes são do grupo chamado de bactérias láticas e que essas apresentam duas maneiras distintas de metabolizar os açúcares (homofermentativas e heterofermentativa), sendo que o tipo presente influencia em outros fatores importantes como a produção de glicerol por parte das leveduras. Além disso, acredita-se que as heterofermentativas sejam favorecidas pelas condições impostas na dorna fermentativa. Nesse contexto, o presente trabalho objetiva fazer um levantamento do tipo metabólico predominante das bactérias láticas contaminantes de destilarias brasileiras, além de entender melhor as relações existentes entre esses microrganismos e as leveduras. Para isso, foram isoladas 221 bactérias de destilarias e testadas quanto ao tipo metabólico. Adicionalmente, 2 bactérias foram escolhidas (I8 e I9), identificadas e testadas em ensaios de fermentação em conjunto com as leveduras PE-2 e Mauri, sob condições que simulam o processo industrial. Foram testados cinco tratamentos (PE-2; PE-2+I8; PE-2+I9; Mauri; Mauri+I8 e Mauri+I9), com 3 repetições cada e um total de 5 reciclos fermentativos. Ao final de cada reciclo fermentativo, amostras foram retiradas para análises químicas e microbiológicas. Os resultados revelam que, embora as hetero sejam mais agressivas e predominem em relação às homo quando simulamos o processo industrial dentro do laboratório, diferentemente do que se pensava, não ocorre essa predominância dentro da destilaria, já que 51,3% dos isolados eram homo e 48,69% eram hetero. Além disso os resultados também mostraram que todas as bactérias homo identificadas pertenciam à espécie *Lactobacillus plantarum*, enquanto as hetero à espécie *L. fermentum*, o que de acordo com dados anteriores da literatura sugerem que possa haver uma divisão de tipos metabólicos por espécie. Ao analisarmos os metabólitos de ambos os microrganismos vemos que houve menor produção de glicerol por parte das leveduras quando elas estavam em cultivo conjunto com as bactérias homofermentativas, mesmo em comparação com o controle (sem contaminação) o que pode ser explicado pelo fato de ter havido produção de succinato exclusivamente nos tratamentos com a I8 (homo). Ou seja, como as bactérias homo produzem quantidades muito superiores de ácido lático se compararmos com as heterofermentativas, as leveduras foram estimuladas a excretarem mais ácido succínico, desviando o metabolismo da produção massiva de glicerol.

Palavras-chave: Fermentação alcoólica; *Saccharomyces cerevisiae*; *Lactobacillus*; Metabólitos

ABSTRACT

Trophic relations between *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus* sp. in industrial alcoholic fermentation conditions

Brazil has been historically very present in ethanol industry because some facts as National Alcohol Program (“Pro-Alcohol”) and more recently the flex fuel car technology. These facts, added to the problems of using petroleum that is a non-renewable energy source, very expensive and polluting, bring the importance of improving brazilian activity. However, several factors affect the fermentation and reduce alcoholic yields, as the entry of contaminants into the process and their permanency because, for example, the quality of raw materials and everyday practices as "Melle-Boinot” process, respectively. Previous studies have shown that many of these contaminants are called lactic acid bacteria, which have two distinct ways to metabolize sugars (homofermentative and heterofermentative), and the type present could influence important factors such as glycerol production by yeasts. Additionally, it is believed that the hetero bacteria are favored by the fermentative industrial conditions. In this context, this work aims to survey the predominant metabolic type of lactic acid bacteria contaminants in brazilian distilleries, and understand the relationship between this microorganisms and yeasts. For that, we isolated 221 bacteria from distilleries and tested their metabolic type. In addition, two strains were chosen (I8 and I9), identified and tested with PE-2 and Mauri yeasts under industrial process simulating conditions. By this mean, we have 6 treatments (PE-2; PE-2+I8; PE-2+I9; Mauri; Mauri+I8 and Mauri+I9) with 3 replicates each one and a total of 5 cell recycling fermentation. At the end of each recycle, samples were taken for chemical and microbiological analysis. The results showed that, although the heterofermentative are more aggressive and dominant in relation to homo when we simulate the industrial process in the laboratory, unlike previously thought, we can not find this predominance in distilleries, since 51,3% of the isolates were homo and 48,69% were hetero. In addition, the results also showed that all the homo bacteria identify was a *Lactobacillus plantarum*, while all the hetero identify was a *L. fermentum*, which according to previous literature, suggests that should exist a division of metabolic types by species. When analyzing the metabolites of both microorganisms we see that there was less glycerol production by the yeast when they were growing together with homofermentative bacteria, even in comparison with the control (without contamination) which might be explained by the fact that there was only succinate production in treatments with homo (I8). In other words, homofermentative bacteria produce much higher amounts of lactic acid when compared with hetero, so yeast cells were stimulated to excrete more succinic acid and take the metabolism away from glycerol mass production.

Keywords: Alcoholic fermentation; *Saccharomyces cerevisiae*; *Lactobacillus*; Metabolites

1 INTRODUÇÃO

Acontecimentos mundiais como mudanças climáticas e oscilações no preço do petróleo trazem, cada vez mais, a necessidade de substituição da matriz energética mundial, que é baseada principalmente nos combustíveis fósseis. Nesse cenário os biocombustíveis tem sido considerados como uma alternativa viável, pois: se tratam de fontes renováveis de energia; seu uso apresenta a possibilidade de redução da dependência do petróleo e de seus preços voláteis e crescentes; reduzem a poluição do ar e a emissão de gases do efeito estufa; além de criarem um novo ciclo de desenvolvimento rural, gerando empregos e oportunidades (FAO, 2005; SACHS, 2005).

O Brasil marca presença nesse quadro, pois desde o acontecimento de fatos históricos como a implementação do Programa Nacional do Álcool (Pró-Álcool), e mais recentemente a tecnologia dos carros flex, sua indústria sucroenergética tem se desenvolvido, levando o país a ocupar o lugar de maior produtor mundial de cana-de-açúcar e de açúcar, e segundo maior produtor mundial de etanol. De acordo com o terceiro levantamento da safra brasileira de cana-de-açúcar (safra 2012/2013), a produção de etanol atingiu 23,62 bilhões de litros, mas as projeções são ainda mais otimistas, chegando a 58,8 bilhões de litros em 2019, valor superior ao dobro da produção registrada no ano de 2008 (NASS et al., 2007; BRASIL, 2013; COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB, 2012). Além disso, o etanol brasileiro foi classificado pela agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (Environmental Protection Agency – EPA) como um “biocombustível avançado”, que permite a maior redução de emissões de gases causadores do efeito estufa entre os disponíveis atualmente. Segundo os estudos da EPA, o etanol de cana reduz as emissões em 44% na comparação com a gasolina. Adicionalmente, quando colocado ao lado do etanol produzido na América do Norte a partir do milho, o brasileiro apresenta um balanço energético cerca de cinco vezes maior, visto que para cada unidade de energia fóssil consumida no ciclo de produção do etanol da cana, outras oito unidades de energia renovável são geradas (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR – UNICA, 2009). Dessa forma, podemos ver a importância do setor para a economia brasileira e entender que o aperfeiçoamento do processo visando o aumento da produtividade é de extrema importância. Considerando todos os fatores que levam à redução do rendimento no processo de produção de etanol empregado no Brasil, a contaminação bacteriana se destaca como um dos maiores responsáveis, e deve ser controlada se o objetivo é produzir álcool com elevados rendimentos (AMORIM; OLIVEIRA, 1982).

De acordo com a literatura, essa condição pode acarretar problemas graves como o desvio de moléculas de açúcar para a produção de ácidos orgânicos, realizado pelas bactérias (BEVAN; BOND, 1971), sendo que a cada molécula de glicose direcionada para a produção de ácido lático, por exemplo, resulta na perda de duas moléculas de etanol que deixam de ser produzidas pelas leveduras (INGLEDEW, 1995). Outros problemas também relacionados por alguns autores são: formação de goma; floculação do fermento; diminuição da viabilidade celular do fermento; e ainda o esgotamento dos nutrientes disponíveis no meio para a levedura (ALTERTHUM et al., 1984; AMORIM, OLIVEIRA, 1982; AMORIM et al., 1981; OLIVA-NETO; YOKOYA, 1997; YOKOYA, 1991; NARENDRANATH et al., 1997).

A literatura traz, principalmente, estudos sobre a caracterização da microbiota contaminante existente no ambiente fermentativo, como descrito por Gallo (1990), que revelou que na produção de etanol cerca de 60% dos contaminantes são do gênero *Lactobacillus*, ou por outros autores que identificaram a microbiota contaminante da produção de etanol a partir do milho e igualmente encontraram esse grupo como predominante (SKINNER; LEATHERS, 2004). Entretanto, as relações travadas entre os microrganismos presentes e o meio em questão e entre os próprios microrganismos ainda permanecem até certo ponto desconhecidas.

Frente à complexidade dos processos envolvidos na fermentação, o presente trabalho busca avaliar as interações metabólicas existentes entre leveduras e bactéria láticas (homo e heterofermentativas) quanto à estequiometria da fermentação, principalmente no que diz respeito ao desvio de açúcar para a produção de glicerol, o produto secundário mais abundante da fermentação alcoólica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O ambiente fermentativo

Trata-se de um ambiente complexo, formado por diversos componentes e microrganismos interagindo entre si, a exemplo das bebidas produzidas a partir da fermentação de caldos de frutas, em que os ácidos mais encontrados no mosto fermentativo são os ácidos málico e cítrico, além de diversos açúcares que podem ser usados como fonte de energia pela comunidade microbiológica. Dessa maneira, as dificuldades de se entender como esse sistema funciona resultam, principalmente, das inúmeras interações entre o ambiente e os microrganismos e entre os próprios microrganismos. (KENNES et al., 1991). Considerando leveduras e bactérias, estudos já realizados revelam que esses microrganismos podem colonizar certos alimentos e bebidas caracterizados por baixo pH, sendo este processo conhecido como fermentação espontânea; dessa maneira, são frequentemente encontradas convivendo em ecossistemas naturais onde competem pelos mesmos nutrientes do substrato. Nesse ambiente natural as leveduras geralmente fermentam os açúcares e as bactérias láticas fermentam os ácidos (AMERINE; KUNKEE, 1968; ALEXANDER, 1971; KUNATH; KANDLER, 1981; BULL, 1982).

Diferentemente das fermentações para produção de grande parte das bebidas, a produção de etanol não ocorre em condições de assepsia, dessa maneira, infecções graves são esperadas e até toleradas. No entanto, essa condição leva à redução dos nutrientes do meio e cria um ambiente estressante para o bom funcionamento da levedura (SKINNER; LEATHERS, 2004).

Como comprovado por diversos autores, nesse ambiente as bactérias láticas são o grupo de contaminantes mais presentes (CONOLLY, 1999; HOUGH et al., 1982; INGLEDEW, 1999; RAINBOW, 1971). Segundo Chang et al. (1995), após se realizar uma avaliação em uma usina de etanol da Coreia, cujas matérias-primas para o preparo do mosto fermentativo eram milho e cevada, foram encontradas em sua grande maioria bactérias láticas, sendo essas predominantemente das espécies *Lactobacillus fermentum*, *L. salivarus* e *L. casei*. Gallo (1991) caracterizou a microbiota contaminante do ambiente fermentativo das usinas de cana, e embora o mosto nesse caso fosse composto proveniente de matéria prima distinta, os resultados foram semelhante aos encontrados pelos autores coreanos, sendo que os contaminantes eram principalmente bactérias láticas (BLs) e que 60% delas pertenciam ao gênero Lactobacillus, principalmente as espécies: *L. fermentum*; *L. helveticus*; *L. plantarum*;

L. animalis e *L. buchneri*. Adicionalmente, Skinner e Leathers (2004), após um trabalho de caracterização da microbiota contaminante da produção de etanol a partir do milho, também demonstraram a prevalência das bactérias láticas, especialmente *Lactobacillus sp*., com 40% do total de contaminantes. Outros gêneros representados com menor frequência dentre os contaminantes foram: *Clostridium*; *Eubacterium*; *Lactococcus*; *Leuconostoc*; *Pediococcus* e *Weisella*.

Parte do sucesso desses microrganismos como contaminantes ocorre devido ao fato de serem tolerantes às temperaturas elevadas, ao baixo pH e apresentarem habilidade de crescimento rápido (NARENDRANATH et al., 1997).

Embora todos os casos citados apontem as BLs como as maiores causadoras de injúria no ambiente fermentativo industrial, segundo Cherubin (2003), cada indústria seleciona determinadas espécies ou linhagens de microrganismos de acordo com as particularidades das etapas de seu processo de produção, sendo que um tipo de microrganismo pode representar um grande problema em uma destilaria e nem sequer ter sua presença identificada em outra.

2.2 Bactérias láticas

Segundo a literatura, as bactérias láticas são caracterizadas como microrganismos gram-positivos; não esporogênicos; microaerófilos; exigentes nutricionalmente; tolerantes a pH mais ácido e estritamente fermentativos, tendo como principal produto da degradação do açúcar o ácido lático.

São representadas pelos gêneros *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus* que apresentam formato de cocos, enquanto *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* tem forma de bastonetes (KANDLER, 1983; YOKOYA et al., 1997). Com exceção do gênero *Bifidobacterium*, que está associado ao intestino de homens e animais, os outros gêneros das BLs estão associados a matérias primas utilizadas na indústria alimentícia e possuem grande relevância tecnológica. A exemplo disso, alguns representantes como os *Lactobacillus* são empregados como probióticos na produção de leites fermentados e iogurtes, além de estarem associados ao desenvolvimento de qualidades organolépticas desejáveis em alimentos e bebidas, através do desenvolvimento de compostos realçadores de sabor (SCARDOVI, 1982; KANDLER; WEISS, 1986; CARR et al., 2002). No entanto, como já citado anteriormente, a presença dessas bactérias no ambiente fermentativo de produção de etanol pode trazer consequências indesejáveis.

Segundo Kandler (1983) e Kandler e Weiss (1986), as bactérias láticas também podem ser agrupadas de acordo com a maneira que fermentam os carboidratos, ou seja, embora todos os lactobacilos sejam conhecidos por fermentar apenas hexoses, também podem ser diferenciados com base nos produtos resultantes da fermentação desses açúcares, resultando em três grupos, explicados abaixo e esquematizados na Figura 1:

- Homofermentativos obrigatórios: através da via Embden-Meyerhof, convertem 1 mol de hexose em 2 moles de ácido lático e 2 moles ATP. Nas vias intermediárias desse metabolismo, ocorre a quebra de frutose 1,6-bifosfato em duas trioses fosfato (3C), que serão convertidas em lactato.

- Heterofermentativos obrigatórios: através da via 6-fosfoglucanato/fosfocetolase, convertem 1 mol de hexose em 1 mol de CO_2, 1 mol de etanol ou ácido acético e 1 mol de ácido lático. Ou seja, transformam, primeiramente, a glicose-6-fosfato a gluconato-6-fosfato, que sofrerá descarboxilação, resultando na pentose xilulose-5-fosfato e CO_2 (que será liberado), rendendo então duas moléculas, sendo elas gliceraldeído-3-fosfato e acetil-fosfato, com três e dois carbonos respectivamente. Posteriormente, o gliceraldeído-3-fosfato dará origem ao lactato, enquanto o acetil-fosfato pode dar origem ao etanol ou ao ácido acético, gerando, nesse segundo caso, 1 mol adicional de ATP. Caso houver um aceptor de hidrogênio disponível, como por exemplo O_2 ou frutose, não haverá formação de etanol, e sim o O_2 será reduzido em H_2O_2 ou H_2O e a frutose será reduzida a manitol. De acordo com Basso (2006), o manitol é produzido em menores proporções apenas em relação ao ácido lático, sendo, portanto, o segundo produto resultante do metabolismo dessas bactérias.

- Heterofermentativos facultativos: comportam-se de forma semelhante ao primeiro grupo, mas em condições limitantes de glicose produzem outros ácidos como o ácido acético, além de etanol.

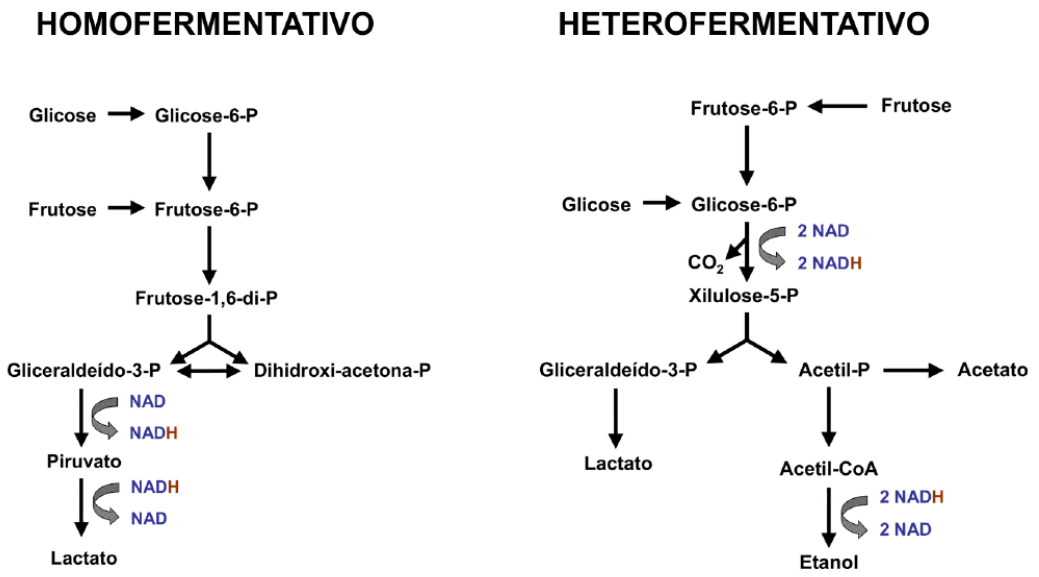

Figura 1 – Representação simplificada das vias de degradação do carbono do tipo homofermentativa e heterofermentativa das bactérias láticas do gênero *Lactobacillus* (Adaptado de KANDLER, 1983 apud GOMES, 2009)

Dados de Gomes (2009) sugerem que, sob condições industriais, a bactéria heterofermentativa aparentemente é favorecida em relação à homofermentativa, já que apresenta maior resistência ao etanol produzido, provavelmente por também possuir a capacidade de sintetizar tal composto de acordo com a condição ambiental de baixa concentração de frutose, já citada anteriormente. Dessa maneira, tal tipo metabólico deve resultar em maior desvio de açúcar e consequentemente menor produção de etanol por parte das leveduras.

Entretanto, esse sistema se mostra mais complexo na realidade do que em teoria, visto que embora possamos confirmar a presença das bactérias láticas através dos produtos resultantes do seu metabolismo, não há como fazer uma correlação direta entre a presença dos ácidos acético e/ou lático decorrente da contaminação bacteriana e a queda na produção de etanol, já que as bactérias homofermentativas metabolizam a glicose em quantidades equimolares de ácido lático, enquanto as heterofermentativas produzem ácido lático, CO_2 e etanol, além de pequenas quantidades de glicerol e ácido acético (KANDLER, 1983; NARENDRANATH et al., 1997). Ainda de acordo com Kandler (1983), quando o substrato fermentado é complexo e apresenta outros compostos além de hexoses fermentescíveis, como é o caso dos substratos naturais, o piruvato pode não ser reduzido apenas a lactato, mas convertido a muitos outros produtos através de mecanismos alternativos, dependendo das condições de crescimento e de particularidades do microrganismo.

2.3 Interações entre levedura e bactéria

É comum encontrarmos leveduras e bactérias convivendo, e na maioria das vezes competindo pelo mesmo substrato (ALEXANDER, 1971; BULL; SLATER, 1982). De acordo com Cherubim (2003), diferentes linhagens, tanto de leveduras quanto de bactérias, podem afetar de maneira distinta o crescimento ou a viabilidade do microrganismo presente no cultivo; o autor descreve que a linhagem M-26 de *S. cerevisiae* exerceu maior inibição à multiplicação da linhagem de bactéria testada (*L. fermentum*) em comparação com a PE-2, enquanto a linhagem de Fleischmann testada estimulou o crescimento da bactéria, em detrimento de sua viabilidade celular.

Embora possam coexistir, *Lactobacillus* e *Saccharomyces cerevisiae* exercem antagonismo umas sobre as outras. Os ácidos orgânicos produzidos pelas células das bactérias inibem substancialmente o metabolismo da levedura, levando à queda no rendimento fermentativo (ESSIA-NGANG et al., 1989; MAIORELLA et al., 1983). Estudos realizados com modelos de laboratório usando culturas puras de leveduras e bactérias específicas, ou apenas seus subprodutos, indicam que *S. cerevisiae* é claramente estressada pela adição dos ácidos lático e acético, resultando na queda das taxas de crescimento e da produção de etanol (MAIORELLA et al., 1983; NARENDRANATH et al., 2001; THOMAS et al., 2002). Segundo Thomsson e Larson (2006), o ácido lático provoca na levedura a diminuição dos níveis intracelulares de ATP, o que pode estar relacionado com a elevada quantidade de energia requerida para manter a homeostase celular, bombeando prótons e ânions do ácido lático dissociado para fora da célula. Dados de Gomes (2009) também sugerem que o ácido lático e o acético, juntamente com o etanol podem agir sinergeticamente afetando o rendimento alcoólico da levedura.

No entanto, embora sofram fisiologicamente com o estresse causado pela liberação de metabólitos por parte das bactérias, resultados obtidos por Boram et al. (1993) indicam que as leveduras apresentam um certo nível de tolerância ao ambiente ácido decorrente dos ácidos láticos e acético, o que propicia a coexistência, mesmo que em detrimento dos altos índices de produção alcoólica por parte das leveduras. Em contrapartida elas também produzem ácido succínico, que atuará na redução do crescimento bacteriano no meio. Segundo consta na literatura, a produção desse ácido ocorre por parte de algumas linhagens de leveduras, e como não há evidências da função fisiológica do composto, acredita-se que tenha mesmo a função de aumentar a competitividade da levedura no ambiente fermentativo, já que, juntamente com

o etanol presente nas dornas de fermentação, o composto pode ajudar no controle das bactérias produtoras de ácido lático (BASSO et al., 1997).

Com base nesses dados, e em estudo realizado por Alves (1994), é possível demonstrar que a quantidade de ácido lático presente no meio pode ser considerado como indicador de contaminação, já que esse composto é produzido exclusivamente pelas bactérias. O mesmo trabalho revela que o ácido succínico é produzido principalmente pelas leveduras, enquanto o ácido acético é um composto produzido tanto por leveduras quanto por bactérias.

Além da excreção de subprodutos tóxicos, existe ainda outra maneira de influência dos contaminantes sobre as leveduras; de acordo com Bayrock e Ingledew (2004), o estresse nutricional também pode prejudicar o desempenho das leveduras, já que as bactérias competem pelos nutrientes presentes no meio e os assimilam com grande velocidade. Os mesmos autores registraram uma redução no número de células viáveis de leveduras, maior quantidade de açúcar residual no mosto e ainda uma redução na produção de etanol e aumento do ácido lático no meio contaminado. Entretanto, Nobre (2005) relata que o efeito sinérgico entre a acidificação do meio e a redução dos nutrientes presentes por conta da competição é que são responsáveis pela queda na viabilidade das leveduras e na sua densidade celular. No trabalho realizado pelo autor, a presença dos metabólitos celulares das bactérias testadas (*B. coagulans*; *B. stearothermophilus*; *L. fermentum* e *L. plantarum*) após inativação por diversos processos (calor, radiação e antibióticos) não foi suficiente para reduzir a densidade e viabilidade celular de *S. cerevisiae.*

Além da injúria que a própria presença das bactérias causa no organismo de interesse para a produção de etanol, existem relatos na literatura de que as bactérias láticas também podem produzir peptídeos antimicrobianos, mais conhecidos como bacteriocinas, que também podem acabar prejudicando o desempenho das leveduras (QADRI, 2002).

No entanto, nem todas as relações travadas são de antagonismo, muitas vezes a própria levedura pode estimular o crescimento da bactéria, figurando como o microrganismo ativo e sintetizando a substância ausente para o crescimento ótimo da bactéria (CHALLINOR; ROSE, 1954). Como já citado anteriormente, as bactérias láticas são exigentes nutricionalmente e crescem apenas em meios relativamente complexos, contendo aminoácidos, vitaminas, sais, ácidos graxos, carboidratos e outros (KANDLER; WEISS, 1986); dessa maneira, esses microrganismos se valem de nutrientes provenientes da levedura e de seu processo fermentativo, como aminoácidos liberados pela autólise de levedura, monossacarídeos liberados após a hidrólise da sacarose, além do etanol quando em

concentrações inferiores a 2% (SELBY-SMITH et al., 1975; ESSIA-NGANG et al., 1992; KING; BEELMAN, 1986).

Dessa forma, percebemos que diversos aspectos que dizem respeito às possíveis relações no ambiente fermentativo ainda não foram esclarecidos por completo.

2.4 Prejuízos da contaminação bacteriana

A contaminação da produção de etanol em si é uma situação em que o número de microrganismos presentes no ambiente fermentativo, que não seja a levedura selecionada, atinge níveis que levam a quedas na produção alcoólica (AMORIM; OLIVEIRA, 1982). Os problemas e prejuízos decorrentes desse processo iniciam-se, principalmente, após o número de células contaminantes atingir valor próximo ou superior a 10^7 células/ml de meio fermentativo, quando o rendimento alcoólico é então prejudicado (AMORIM et al., 1981).

Como observado por Amorim et al. (2005), diversos fatores podem afetar o rendimento industrial, levando à transformação de 8% a 15% do açúcar disponível em produtos secundários, sendo que a contaminação bacteriana é um dos principais fatores que afetam o processo. De acordo com o mesmo autor juntamente com colaboradores, após o levantamento de seis destilarias brasileiras em diferentes regiões do Estado de São Paulo, os contaminantes podem afetar o rendimento alcoólico em até 55% em relação ao esperado em teoria (AMORIM et al., 1981). Adicionalmente, segundo consta na literatura verificou-se que em laboratório, após o 15º ciclo de fermentação, a eficiência alcoólica sofreu redução significativa quando a quantidade de ácido lático foi superior a 6 g/L e a contaminação bacteriana foi superior a $1{,}2 \times 10^9$ UFC/mL (OLIVA-NETO; YOKOYA, 1994), comprovando a importância da presença desses microrganismos.

As razões pelas quais essa queda no rendimento ocorre são diversas, sendo que certamente uma das mais importantes é o consumo de açúcar pelos contaminantes, já que para cada molécula de açúcar desviada para a produção de ácido lático por parte das BLs, duas moléculas de etanol deixam de ser produzidas pelas leveduras (AMORIM; OLIVEIRA, 1982; INGLEDEW, 1995; NARENDRANATH et al., 1997).

Outra razão importante é a queda na viabilidade ou morte das leveduras, causadas pelos compostos tóxicos lançados no meio pelas bactérias, principalmente os ácidos láticos e acéticos (YOKOYA, 1991; BEVAN, BOND, 1971). Dados de Ferguglia (1997) comprovam que *S. cerevisiae* em cultura mista com *L. fermentum* sofre uma redução de sua viabilidade de 97% para 55% após 12 horas de cultivo em conjunto. A competição por outros nutrientes do

meio, como vitaminas e aminoácidos também figura como um importante fator para redução da viabilidade celular das leveduras de interesse (NOBRE, 2005).

Além dessas razões, é essencial destacar que a presença dessas bactérias pode levar à floculação do fermento, fenômeno decorrente da adesão mecânica das bactérias às células de levedura por meio da capa proteica de origem gelatinosa presente nas BLs, ocasionando a formação de aglomerados celulares (GALLO; CANHOS, 1991). Esse processo leva à decantação do fermento e consequente perda de células no fundo das dornas, além de reduzir a velocidade de fermentação e dificultar a operação das centrífugas (AMORIM; OLIVEIRA, 1982; OLIVA-NETO; YOKOYA, 1997). Segundo ensaios de fermentação relatados na literatura, ao se utilizar uma concentração bacteriana (*L. fermentum*) de 1,38 a 3,76 g/L de biomassa seca, a porcentagem de floculação chegou a atingir 100% , enquanto ao se utilizar uma concentração bacteriana de 0,434 e 0,851 g/L de biomassa seca, os índices de floculação caíram para 0% e 13-25% respectivamente (LUDWIG et al., 2001).

A entrada dos microrganismos contaminantes no processo fermentativo ocorre através de diversas formas, como a má qualidade da cana-de-açúcar, que contribui grandemente para as infecções, ou seja, aspectos como: a presença de impureza mineral nos colmos, que pode carregar microrganismos; idade avançada da cana colhida, que propicia sua deterioração e consequente contaminação; perfurações por insetos, que constituem uma porta de entrada para contaminantes; dentre outras condições que contribuem para o aumento de contaminantes dentro do processo. Além disso, existem outros fatores como: más condições de armazenamento do melaço; má assepsia das instalações; resfriamento insuficiente das dornas; limpeza incorreta ou insuficiente das dornas e canalizações, perpetuando os pontos com biofilme de bactérias; ausência do controle da acidez e nutrientes do mosto; funcionários despreparados e ausência de assistência técnica (AMORIM; OLIVEIRA, 1982; GALLO, 1990; GALLO; CANHOS, 1991).

No entanto, a permanência desses contaminantes no processo é resultado de outras práticas cotidianas nas usinas. Segundo Alterthum et al. (1984), o efeito da elevada concentração bacteriana (acima de 10^8 cel/ml) pode ser verificado especialmente após o reciclo de células presente no processo “Melle-Boinot”. Essa prática, largamente empregada nas destilarias brasileiras, consiste na re-utilização do levedo em sucessivas fermentações ao longo da safra. Embora represente grande economia de tempo e dinheiro para a usina, já que não há necessidade de se multiplicar o fermento ao longo da safra, pode levar ao consequente reciclo dos contaminantes. O mesmo autor demonstra que a queda no rendimento fermentativo pode atingir cerca de 30% nesses casos.

2.5 A produção de glicerol

Durante a fermentação alcoólica realizada por *S. cerevisiae* é sabido que outros subprodutos são formados além do etanol e do CO_2, sendo que o principal deles é o glicerol (BAI et al., 2008). Se considerarmos a produção de bebidas, a presença do metabólito faz-se importante, pois está ligada a presença de propriedades sensoriais desejáveis, e consequentemente sua degradação tem numa influência negativa sobre a qualidade do produto fermentado (EUSTACE; THORNTON, 1987). No entanto, na produção de etanol combustível é um acontecimento indesejável, como veremos mais adiante.

Segundo Oura (1977), o glicerol é formado principalmente em condições anaeróbias, chegando a uma taxa de 5% de conversão de açúcares disponíveis no meio, enquanto que em cultivos aeróbios a produção é expressivamente menor. Dados de Radler e Schultz (1992) também descrevem que, dependendo das condições de cultivo, o desvio dos açucares do meio para a produção de glicerol pode atingir uma taxa entre 4-10%.

Quando o cultivo ocorre em condições citadas acima, a síntese do glicerol está intimamente ligada ao esgotamento da reserva intracelular de NAD+, já que a produção metabólica de ácidos orgânicos (ácidos acético, succínico e pirúvico) por parte das leveduras leva à redução do NAD+ à NADH (OURA, 1977; VAN DIJKEN, SCHEFFERS, 1986; NISSEN et al., 1997). Visto que a cadeia respiratória não pode funcionar nessas condições, o NADH é reoxidado à NAD+ através da produção do glicerol, sendo que a síntese de 1 mol de glicerol a partir da glicose leva a reoxidação de 1 mol de NADH; dessa maneira, o balanço do redox da célula é reestabelecido (ANDRÉ et al., 1991; LARSSON et al., 1993). Segundo Basso et al. (1996), como essa situação ocorre quando há excesso de NADH dentro da célula, podemos observa-la no desenvolvimento de processos oxidativos, como a produção de biomassa ou de ácido orgânicos, já citada anteriormente.

Diferentemente do primeiro caso, a formação do glicerol em condições aeróbias ocorre quando a célula se encontra em um ambiente com maiores concentrações de açúcar, situação em que a respiração é reprimida, e por consequência a célula não consegue reoxidar o NADH resultante dos processos metabólicos, que se acumula em seu interior, funcionando como um protetor osmótico e minimizando o risco de lise celular (ANDRÉ et al., 1991; LARSSON et al.,1993; ANSELL et al., 1997).

O problema está no fato de que, quando o composto ocorre em quantidade expressiva pode prejudicar o rendimento alcoólico, já que resulta no desvio de parte significativa dos açúcares do meio para sua produção. E ele pode ser ainda maior se considerarmos os dados de

Gutierrez (1991), que revelam que além do estresse osmótico outros fatores também podem influenciar esse catabolismo, como: aumento da temperatura; aumento do pH e principalmente a linhagem da levedura em questão.

Como já destacado, a produção de glicerol é uma defesa da célula de levedura frente ao estresse osmótico e uma maneira de restaurar a presença do NAD+ resultante do seu metabolismo, portanto, não é possível eliminar sua produção por vias convencionais. A engenharia genética é capaz de solucionar esse desvio através da deleção de genes que codificam a enzima glicerol 3-fosfato desidrogenase (NISSEN et al., 2000; PAGLIARDINI, et al., 2010), no entanto a levedura possivelmente assumiria maior susceptibilidade à formas de estresse presentes no meio.

De acordo com estudos realizados por Gomes (2009), as variáveis no que tange a produção de glicerol podem ser ainda mais expressivas, considerando que no trabalho em questão foram testadas duas linhagens de bactérias, uma homofermentativa e outra heterofermentativa, em conjunto com quatro linhagens de leveduras. Os resultados obtidos revelam que a produção de glicerol foi significativamente menor no tratamento com bactéria homofermentativa para as quatro linhagens de leveduras, sendo inclusive inferior do que o tratamento controle, sem a presença de bactérias; a exemplo disso, a síntese de glicerol por parte da levedura PE-2 após 24h de cultivo sem bactéria atingiu o valor médio de 8,38 mM, enquanto que em presença de bactéria homofermentativa o valor foi de 6,41 mM. Como se trata do primeiro relato em literatura sobre esse comportamento, ainda não se sabe se o glicerol é de fato produzido em menores quantidades quando a levedura está em cocultivo com a bactéria homofermentativa, ou se essas bactérias estariam consumindo o composto.

3 OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo realizar um levantamento dos tipos metabólicos das BLs contaminantes de destilarias brasileiras e verificar se ocorre a predominância do tipo heterofermentativo, como sugerem estudos anteriores. Além disso, objetiva avaliar 2 linhagens de bactérias de tipos metabólicos diferentes em co-cultura com as leveduras PE-2 e Mauri em condições de fermentação com reciclo de células.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no laboratório de Bioquímica e Tecnologia de Leveduras do Departamento de Ciências Biológicas da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – ESALQ, USP, Piracicaba – SP.

4.1 Microrganismos

Foram avaliadas duas linhagens de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* e duas linhagens de bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus*. Os testes foram realizados com as leveduras PE-2 e Mauri. A primeira delas é uma levedura selecionada e amplamente aplicada no processo industrial de produção de etanol no Brasil, enquanto a segunda é uma levedura de panificação, que atualmente é empregada no processo fermentativo do início de safra ("starter") de poucas usinas. Ambas foram resgatadas da coleção permanente do laboratório de Bioquímica e Tecnologia de Leveduras do Departamento de Ciências Biológicas – ESALQ/USP, onde estavam preservadas em glicerol com concentração de 15% e em ultrafreezer a -80°C.

Já as bactérias foram isoladas de materiais provenientes de destilarias brasileiras, e após o isolamento foram preservadas em glicerol com concentração de 20% e em ultrafreezer a -80°C, para que pudessem compor o banco de isolados do laboratório.

Paralelamente, um grupo de 18 bactérias foram selecionadas mediante análise do crescimento em MRS e identificadas de acordo com o protocolo proposto por Ausubel et al. (2002), em parceria com o laboratório de Genética e Biologia Molecular – Universidade Estadual de Campinas.

4.2 Cultivo dos microrganismos

As leveduras foram reativadas, separadamente, através da inoculação de 100 µL da suspensão de leveduras e glicerol em 3,0 mL de meio de cultura YEPD estéril (2% de glicose; 1% de peptona; 1% de extrato de levedura), e incubadas a 30°C por 24 horas. Após o período de incubação em anaerobiose, o conteúdo foi transferido para um volume de 100 mL do mesmo meio e incubado nas mesmas condições anteriores, para que prosseguisse o crescimento do fermento que seria utilizado nos ensaios. Passadas as 24 horas, a suspensão de meio de cultura e leveduras resultante foi transferida para 1 L de mosto de crescimento estéril,

produzido a partir da diluição de melaço da usina Furlan até atingir a concentração de 10% de açúcares, e inoculado novamente em estufa a 30°C por 24 horas. O volume da suspensão foi então duplicado com o uso do mesmo meio de crescimento a 10%, para que se atingisse a biomassa desejada. O fermento foi coletado por centrifugação a 800 x g, por 20 minutos.

Já as bactérias foram isoladas a partir de creme de levedo contaminado ou vinho bruto provenientes de destilarias brasileiras. As amostras foram diluídas convenientemente, levando em consideração a concentração de contaminantes presentes em cada uma delas mediante contagem de bastonetes ao microscópio, e plaqueadas em meio MRS ágar (2% dextrose; 1% de peptona; 1% de extrato de carne; 0,5% de extrato de levedura; 0,5% de acetato de sódio; 0,2% de citrato de amônio dibásico; 0,2% de fosfato de potássio dibásico; 0,02% de sulfato de magnésio; 0,005% de sulfato de manganês, 0,1% de Tween 80, 2% de Agar) contendo actidiona (10 ppm). No geral foram realizados plaqueamentos das diluições 10-4, 10-5 e 10-6, sendo que cada placa recebeu 100 µL da suspensão de vinho bruto diluída que foi espalhada com o auxílio de um alça de Drigalsky. As placas foram incubadas a 32°C por 48 horas.

Após o crescimento das colônias isoladas, as bactérias foram individualizadas em 3 mL de MRS líquido estéril cada uma, e incubadas a 32°C por 24 horas. Passado esse período, as bactérias isoladas foram preservadas em glicerol (item 4.3), testadas quanto ao seu tipo metabólico (item 4.4) e selecionadas duas candidatas para fazerem parte do ensaio de fermentação, conforme descrito no ítem 4.4.

As duas bactérias escolhidas para comporem os experimentos foram reativadas separadamente em 3 mL de MRS líquido estéril e incubadas a 32°C por 24 horas. Passado o período de incubação, a suspensão de MRS e bactéria foi transferida para 100 ml de MRS e incubada novamente nas mesmas condições. As bactérias foram novamente alimentadas com 100 mL de MRS cada e incubadas também sob as mesmas condições. A multiplicação das bactérias aconteceu paralelamente à reativação e multiplicação das leveduras, sendo que a biomassa foi coletada por centrifugação (800 x g, por 20 minutos).

4.3 Preservação das bactérias

Após a individualização e crescimento das bactérias em MRS líquido, como descrito no item 4.2, foi realizado o plaqueamento das mesmas. Placas de petri contendo meio de cultivo MRS ágar com actidiona (10 ppm) foram preparadas com 72 horas de antecedência do plaqueamento das amostras e armazenadas em estufa a 30°C, para permitir a desidratação parcial do meio e a posterior absorção completa da alíquota a ser aplicada. Cada placa foi

dividida em quatro quadrantes para que se pudesse otimizar o espaço ao se plaquear quatro bactérias simultaneamente. Um volume de 10 µL da suspensão de cada bactéria foi aplicado sobre a superfície do meio. As placas foram deixadas em repouso por 40 minutos para que as gotas fossem absorvidas por completo e depois incubadas a 32°C por 48 horas (Figura 2). Passado o período de incubação a massa de bactéria foi raspada, transferida para tubos eppendorf com capacidade para 1,5 mL contendo 1 ml de glicerol estéril com concentração de 20%, agitada vigorosamente com o auxílio de um agitador, etiquetada convenientemente e depois armazenada em ultrafreezer a -80°C. Para padronizar o volume de massa bacteriana em cada isolado, cada gota de 10 µL que se desenvolvia foi transferida para um tubo eppendorf.

Figura 2 – Bactérias isoladas e plaqueadas em MRS ágar após a incubação a 32°C por 48 horas

4.4 Teste de metabolismo

Após o isolamento e preservação das bactérias provenientes das destilarias, foi realizado um teste de tipo metabólico para poder escolher as duas bactérias que seriam usadas nos testes e também para avaliar se há a predominância de um dos dois tipos metabólicos no ambiente industrial.

As bactérias foram reativadas a partir da inoculação de 100 µL das respectivas suspensões de glicerol (20%) contendo os inóculos em 3 mL de MRS líquido, e incubação a 32°C por 24 horas. Passadas as 24 horas uma alíquota de 150 µL das amostras em MRS foi transferida para o meio de teste MBL estéril (0,5% de extrato de levedura; 0,5% de peptona; 1% de frutose; 1% de glicose; 0,2% de K_2HPO_4; 0,02% $MgSO_4.7H_2O$; 0,001% $MnSO_4.H_2O$) e incubadas 32°C por 48 horas. Alíquotas de 1 mL foram retiradas após o cultivo e centrifugadas para análise de açúcares residuais e manitol mediante HPAEC. A escolha das bactérias foi feita aleatoriamente, baseada na produção expressiva de manitol para a heterofermentativa e a ausência do composto para a homofermentativa. Foram denominadas I8 a homofermentativa e I9 a heterofermentativa.

4.5 Teste fermentativo

O ensaio de fermentação foi conduzido a 30°C em tubos de centrífuga com capacidade para 50 mL e que foram previamente pesados e identificados. Os tratamentos avaliados durante os 5 reciclos fermentativos foram: PE-2; PE-2 em conjunto I8; PE-2 em conjunto com I9; Mauri; Mauri em conjunto com I8 e Mauri em conjunto com I9. Cada tratamento estava representado em triplicata.

Com a finalidade de se certificar que concentração de bastonetes nos tratamentos com contaminação permaneceria em torno de 10^8 cel/mL, um período de adaptação foi realizado (nas mesmas condições em que o teste se processou) dois dias antes de se iniciar o ensaio fermentativo, e assim a contaminação foi se elevando aos pouco enquanto as características dos microrganismos presentes já começava a se manifestar.

Primeiramente foi determinada a concentração de bastonetes do inóculo inicial que havia crescido em meio MRS e também o teor de fermento das leveduras que estavam em mosto de crescimento (descrito no item 4.2). Baseado no teor de fermento o volume total da suspensão (mosto+fermento) cada levedura foi separada em 2 erlenmeyers de capacidade de 1 L, contendo 600 mL cada um, e o restante foi descartado.

A suspensão de MRS+I8 e MRS+I9 foi centrifugada e a massa resultante foi ressuspendida em 50 ml de água mili-Q cada uma. Um volume de 6 mL dessa água mili-Q com as respectivas bactérias foi inoculado nas leveduras PE-2 e Mauri, e esses cultivos foram alimentados com 38 mL mosto de crescimento (10%) descrito no item 4.2, resultando em uma concentração final de 10^5 cel/mL.

Os seis tratamentos foram incubados a 32°C por 24 horas, e o restante das duas suspensões de água com bactéria foi armazenado em geladeira para uma nova inoculação, com a finalidade de atingir e garantir a concentração de bastonetes do ensaio. Passadas 24 horas, novas contagens foram feitas para acompanhar a multiplicação das bactérias e a viabilidade da levedura e uma nova inoculação da água com bactéria foi realizada, sendo que cada tratamento recebeu um volume de 19 mL de água com concentração de 10^7 cel/mL. Além disso, cada um dos seis tratamentos recebeu 85 mL do mosto de crescimento estéril já mencionado, e permaneceu em estufa a 32°C por 24 horas.

Após a incubação novas análises microbiológicas foram realizadas e os fermentos foram centrifugados e ressuspendidos no volume total de água que iria compor o pé-de-cuba de cada tratamento. Esse volume foi dividido em 3 partes iguais, visto que o ensaio era composto por 3 repetições de cada tratamento.

O pé-de-cuba, feito separadamente em todos os tubos de centrífuga, foi composto por: 8,6 mL de suspensão (aproximadamente 3g de fermento) de levedura ou de levedura e bactéria nos tratamentos com contaminação para o primeiro reciclo fermentativo; 2 mL de vinho da fermentação anterior, simulando assim a condição industrial em que as centrífugas operam com uma eficiências média de 70%; e 28 mL de mosto misto constituído por melaço diluído até uma concentração de 18% e previamente esterilizado.

A cada reciclo fermentativo o volume de mosto das alimentações foi dividido em 3 porções iguais administradas em intervalos de duas horas, até a quarta hora da fermentação, sendo que o peso do fermento antes e depois de cada alimentação foi determinado. Ao longo das outras quatro horas em que os tubos permaneceram em estufa mais duas pesagens foram realizadas, para se verificar o desprendimento de CO_2 e consequentemente a velocidade de fermentação. Decorridas 8 horas de fermentação os tubos eram retirados da estufa e mantidos em temperatura ambiente (27-28°C) até o dia seguinte, quando completavam aproximadamente 21 horas de fermentação. Ao término de cada ciclo 600 µL de amostra de todos os tratamentos foram retirados para as análises microbiológicas. A levedura foi separada do vinho fermentado pela centrifugação a 800 x g por 20 minutos, pesada e ressuspensa novamente com o volume de água e vinho que iria compor o novo pé-de-cuba, conforme descrito acima. Os vinhos delevedurados resultantes de cada reciclo fermentativo foram analisados quanto aos parâmetros: teores de etanol, pH, densidade, glicerol, manitol, sacarose, glicose, frutose e ácidos orgânicos.

4.5.1 Experimento suporte: perfil de consumo de açúcares e formação de etanol das leveduras PE-2 e Mauri

As leveduras Mauri e PE-2 foram propagadas conforme protocolo descrito anteriormente. Com a biomassa obtida foram conduzidos dois ciclos fermentativos para adaptação das leveduras que precederam um estudo cinético no qual se verificou o perfil de hidrólise da sacarose, o consumo de glicose e frutose assim como a formação de etanol. Para tal, simulou-se uma fermentação tipo batelada alimentada como conduzida no processo industrial com um pé-de-cuba correspondendo a 30% do volume final da fermentação, sendo constituído de uma mistura de vinho da fermentação anterior e água. Tal mistura de vinho e água simulou uma concentração de 70% de biomassa úmida no creme de levedura, resultando num pé-de-cuba com 34% (m/v) de fermento. Dessa maneira iniciou-se a alimentação durante 6 horas, a vazão constante (mediante auxílio de uma bomba peristáltica), com mosto misto (16% de ART) constituído de melaço e caldo de cada. A alimentação foi sendo conduzida, enquanto a fermentação se processou a 32°C com agitação de 70 rpm, o suficiente apenas para manter a levedura em suspensão. Em tempos pré-determinados (0, 2, 4, 6, 8 e 10 horas) amostras foram removidas para as análises de etanol (no vinho bruto) e teores de açúcares (sacarose, glicose e frutose).

4.6 Análises químicas e microbiológicas

4.6.1 Análises microbiológicas

A viabilidade celular e a população de células de leveduras e bactérias foram determinadas ao longo da multiplicação da biomassa de ambos os microrganismos, com a finalidade de monitorar se as células estavam saudáveis e se estavam se multiplicando suficientemente. Além disso, as mesmas análises foram feitas antes do início do ensaio de fermentação, para que ocorresse a inoculação da concentração celular adequada para o experimento, e também ao longo dos ciclos, para dar suporte aos outros parâmetros avaliados.

A determinação da viabilidade celular das leveduras, bem como a porcentagem de brotamento, foi realizada com o auxílio de microscópio óptico em objetiva de 40x e a contagem diferencial de células em retículos da câmara de Neubauer. As células foram previamente colocadas em contato com o corante eritrosina em tampão fosfato, visto que as mortas adquiriam coloração rósea enquanto as vivas permaneciam sem serem coradas. Já a

determinação do número de bastonetes viáveis foi realizada com o auxílio do mesmo microscópio em objetiva de 100x e lâmina de vidro, de forma que a amostra foi previamente posta em contato com solução corante de Azul de Metileno (0,2%) e Sulfato Azul de Nilo (2%) e os bastonetes mortos se coraram de azul, enquanto os vivos permaneceram sem cor (OLIVEIRA et al., 1996).

4.6.2 Análises de açúcares mediante HPAEC

Ao final de cada reciclo fermentativo alíquotas de 1 ml do vinho resultante eram retiradas para as análises de glicose, frutose e sacarose. Para tanto, utilizou-se a cromatografia de troca aniônica (HPAEC) por meio do equipamento Dionex DX-300 (Sunnyvale, CA, USA), equipado com coluna Carbopak PA-1 e detector de amperometria de pulso, tendo NaOH 100mM como fase móvel a um fluxo de 0.9 $ml.min^{-1}$.

4.6.3 Análises de ácidos orgânicos, manitol e glicerol mediante HPLC

Assim como nas análises do item 4.6.2, os ácidos orgânicos (succínico, lático e acético), glicerol e manitol foram quantificados através da análise do vinho delevedurado resultante de cada reciclo fermentativo. As análises foram realizadas mediante cromatografia líquida (HPLC), com coluna de exclusão iônica Aminex HPX-87H BioRad (Hercule, CA, USA) a 65°C, utilizando-se H2SO4 (5mM) como fase móvel a uma vazão de 0,6 mL/min e detector de índice de refração CG 410 (Instrumentos Científicos C.G. LTDA, São Paulo, Brasil).

4.6.4 Análises de pH, Biomassa e velocidade de fermentação

Também ao final de cada reciclo fermentativo o vinho delevedurado de todas as amostras foi avaliado com relação ao seu pH. A biomassa foi determinada mediante a pesagem do fermento após a centrifugação ocorrida ao final de cada reciclo, enquanto a velocidade de fermentação foi determinada através do desprendimento de CO_2, verificado pela diferença de peso dos tubos a cada 2 horas no decorrer de um reciclo fermentativo.

4.6.5 Análises de etanol e cálculo da eficiência fermentativa

Os teores de etanol foram avaliados ao final de cada reciclo por meio da destilação do vinho delevedurado por arraste de vapor (Microdestilador Kjeldhal, Piracicaba, Brasil), seguido por densimetria através do densímetro digital (Anton-Paar DMA-48, Graz, Áustria), de acordo com metodologia descrita por Zago et al. (1996). A eficiência fermentativa (rendimento alcoólico) foi determinada também ao longo dos reciclos, baseada na equação estequiométrica da fermentação alcoólica de Gay-Lussac, em que a conversão de 100 g açúcares totais seria tal que resultaria na formação de 51,11 g de etanol (64,74 mL) a 20°C, para uma eficiência de 100% de conversão.

4.7 Análises estatísticas

Para que se pudesse comparar as médias dos parâmetros avaliados durante os reciclos fermentativos realizou-se análises estatísticas mediante o uso do software ESTAT (Sistema para análise estatística, versão 2.0, Departamento de Ciências Exatas – UNESP, Jaboticabal, 1992). As médias foram comparadas pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Perfil de consumo de açúcares das leveduras PE-2 e Mauri (experimento suporte)

As Figuras 23 e 24 trazem os valores da hidrólise da sacarose e consequente disponibilização da glicose e frutose, para as leveduras PE-2 e Mauri, isso atrelado à produção de etanol ao longo de 10 horas de fermentação com 6 horas de alimentação, como foi descrito anteriormente. Ao observarmos a figura 24, podemos perceber que a atividade de invertase da levedura Mauri é mais expressiva do que a da levedura PE-2 (Figura 23), reduzindo o teor de sacarose no meio fermentativo e disponibilizando maior quantidade de frutose, o que pode explicar o rápido desenvolvimento da bactéria I9 quando cresce em conjunto com essa levedura, o que acaba prejudicando a própria levedura, já que é favorece o desenvolvimento de determinado tipo de bactéria e é obrigada a conviver com o estresse decorrente dessa contaminação excessiva.

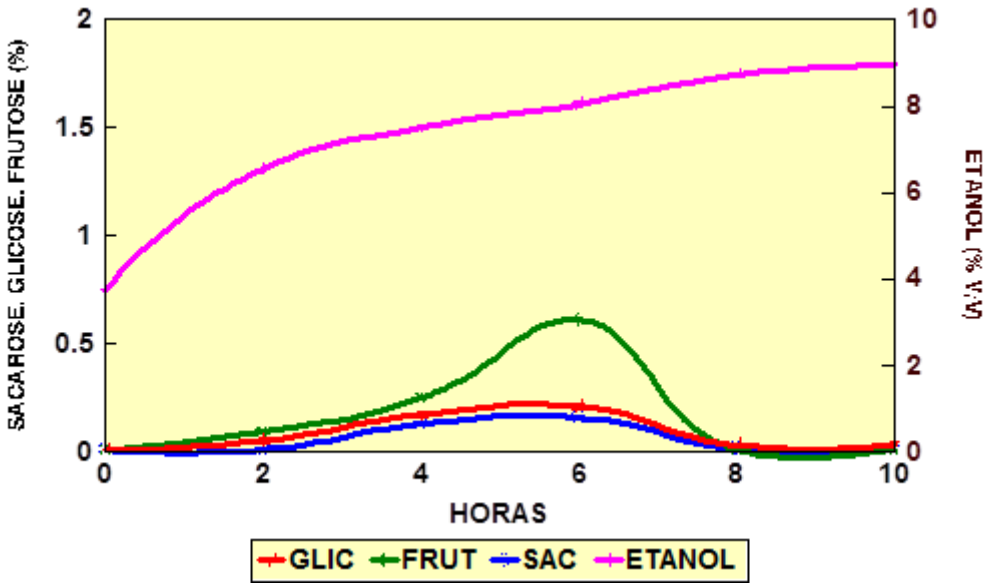

Figura 3 - Hidrólise da sacarose, consumo de glicose e frutose e formação de etanol, no transcorrer de 10 horas de fermentação, pela levedura PE-2 em fermentação tipo batelada-alimentada

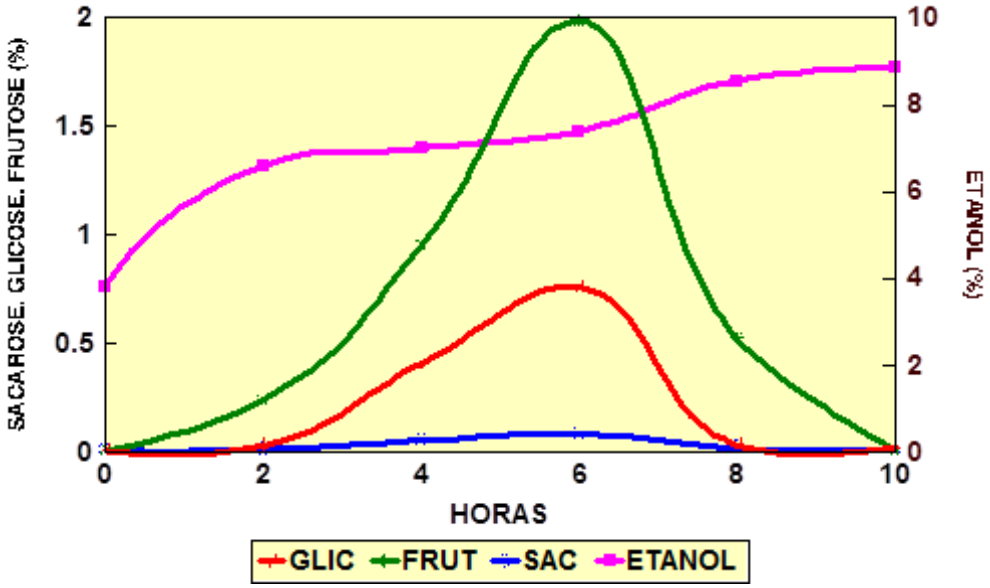

Figura 4 - Hidrólise da sacarose, consumo de glicose e frutose e formação de etanol, no transcorrer de 10 horas de fermentação, pela levedura Mauri em fermentação tipo batelada-alimentada

5.2 Isolamento, teste e escolha das bactérias.

Como anteriormente mencionado, o material a partir do qual obtivemos as linhagens de bactérias para o teste fermentativo foi proveniente de destilarias brasileiras. Foram realizados 15 isolamentos durante as safras de 2011/2012 e 2012/2013, em um total de 6 destilarias. Das 15 amostras apenas uma era material proveniente de dorna fermentativa (vinho bruto) enquanto o restante era amostra de creme de levedura. Foram isoladas 221 bactérias do gênero *Lactobacillus*, sendo que após o teste de tipo metabólico realizado, descobriu-se que 51,3% pertenciam ao grupo de lactobacilos que apresenta metabolismo homofermentativo, enquanto 48,69% ao grupo que apresenta metabolismo heterofermentativo. Esse resultado apresentou-se diferente dos dados obtidos por Gomes (2009), que sugerem que sob condições industriais as bactérias heterofermentativas provavelmente seriam favorecidas em relação às homofermentativas, visto que apresentam maior resistência ao etanol produzido do meio, uma vez que também possuem a capacidade de sintetizar esse composto, como já citado anteriormente. No entanto, tais dados se referem às observações de simulação do ambiente fermentativo dentro do laboratório, o que nos leva a crer que possivelmente existem muitas outras variáveis no complexo ambiente fermentativo que podem influenciar nessa prevalência ou não de um tipo metabólico.

Das 18 bactérias identificadas, nove eram homofermentativas e pertenciam à espécie *Lactobacillus plantarum* e nove eram heterofermentativas e pertenciam à espécie

Lactobacillus fermentum, sendo que essa separação de tipos metabólicos por espécie já havia sido observada por outros autores (HOFVENDAHL; HAHN-HAGERDAL, 2000; WEYMARN et al., 2002). Dessa maneira, a bactéria I8 (homofermentativa) usada nos experimentos era da espécie *L. plantarum*, enquanto a bactéria I9 (heterofermentativa) era da espécie *L. fermentum*.

5.3 Contaminação, viabilidade e taxa de brotamento

Com relação ao ensaio de fermentação do presente trabalho, se considerarmos o sucesso da contaminação das bactérias homo e hetero ao longo dos reciclos fermentativos, concluímos que de fato houve a predominância das bactérias heterofermentativas ao longo das análises (Figuras 3 e 4). É importante lembrar que, com o intuito de garantir que as relações entre leveduras e bactérias poderiam de fato resultar em diferenças entre os tratamentos, houve uma pré-inoculação das bactérias com dois dias de antecedência ao início dos reciclos fermentativos, e que os valores iniciais referem-se a esse período, ou seja, no dia do início do ensaio fermentativo, sendo que os dados do reciclo 1 referem-se ao final desse período (após 1 dia de fermentação). Dessa maneira, as diferenças entre as contaminações iniciais são resultados de dois dias de contaminação e não de uma inoculação diferente entre os tratamentos, já que, como descrito no item 4.5 as inoculações foram as mesmas para todos os tratamentos.

Como podemos observar apenas no reciclo 1 do tratamento em conjunto com a levedura Mauri não houve diferença estatística entre as bactérias I8 (homofermentativa) e I9 (heterofermentativa). Já nesse mesmo reciclo as bactérias I8 e I9 apresentaram diferença quando em conjunto com a levedura PE-2, assim como em todos os outros tratamentos de todos os outros reciclos. Esse dado reforça a ideia já citada de que quando o processo industrial é simulado em condições de laboratório a bactéria heterofermentativa de fato se comporta de forma mais agressiva, visto que a diferença é muito significativa.

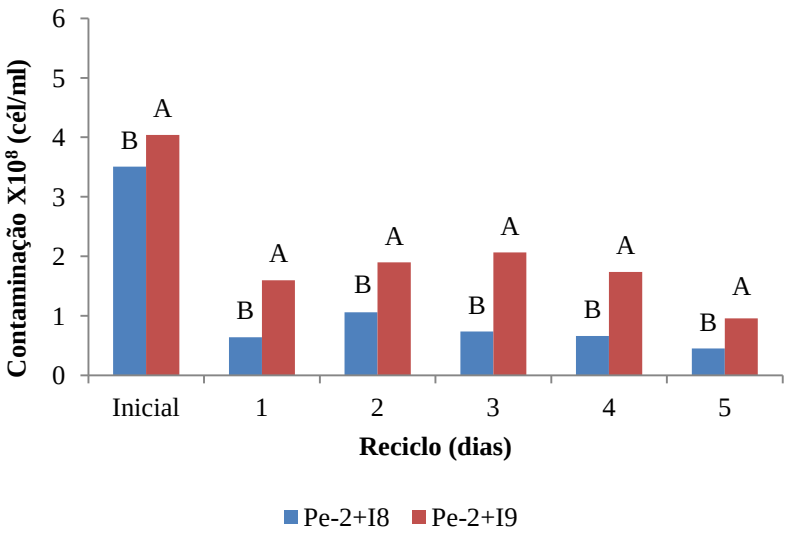

Figura 5 – População de células bacterianas (x10^8 cel/mL de vinho) para a levedura PE-2, em cultivo com as bactérias láticas I8 (homofermentativa) e I9 (heterofermentativa) durante os 5 reciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada reciclo

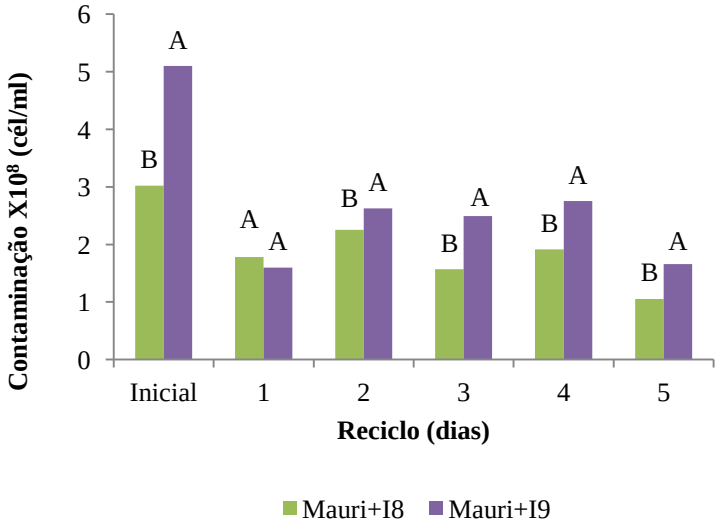

Figura 6 – População de células bacterianas (x10^8 cel/mL de vinho) para a levedura Mauri, em cocultivo com as bactérias láticas I8 (homofermentativa) e I9 (heterofermentativa) durante os 5 reciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada reciclo

Se observarmos mais detalhadamente os dados de contaminação, percebemos que assim como descrito por Cherubin (2003), diferentes linhagens tanto de leveduras quanto de bactérias podem afetar de maneira distinta outro microrganismo presente no cultivo. Dessa maneira, embora as contaminações tenham sido as mesmas no início da fase de adaptação,

encontramos valores superiores de contaminação, tanto de homofermentativa quanto de heterofermentativa, em grande parte das amostras que se encontram em conjunto com a levedura Mauri, em comparação com as amostras em cocultivo com a levedura PE-2, indicando, como já demonstrado anteriormente, que a PE-2 apresenta maior antagonismo sobre a contaminação, não permitindo que a contaminação se desenvolva com tanta expressividade mesmo em condições ideais para tal fato.

Com relação à viabilidade celular das leveduras testadas, demonstrada nas figuras a seguir, a levedura PE-2 permaneceu sem variações na sua viabilidade quando dentro dos reciclos. Podemos observar que a levedura em questão manteve o padrão de queda dos percentuais de viabilidade nos tratamentos com contaminação, ou seja, os maiores valores foram encontrados nos tratamentos sem bactéria, seguido pelos tratamentos em conjunto com a bactéria I9 e posteriormente os tratamentos em conjunto com a bactéria I8 (Figura 5). Essa observação pode ser decorrente da grande quantidade de ácido lático produzido pelas bactérias homofermentativas. Por outro lado, Gomes (2009), após realizar testes fermentativos entre leveduras industriais (dentre elas a PE-2) e uma de panificação (Fleischmann) com bactérias homo e heterofermentativas, descreveu não ter havido diminuição na taxa de viabilidade celular, com exceção dos últimos ciclos do tratamento com a levedura de panificação que apresentaram pequena redução.

A levedura Mauri apresentou o mesmo padrão da PE-2 de queda do percentual de viabilidade nos tratamentos contaminados em comparação ao tratamento sem bactéria, o que pode ser observado em todos os reciclos (Figura 6). Pode-se também verificar que nos reciclos 1, 2, 4 e 5 não houve diferença significativa entre os tratamentos contaminados com as bactérias I8 e I9, diferentemente dos resultados referentes à levedura PE-2. No entanto, em todos os ciclos a diferença entre as amostras sem contaminação e as contaminadas (com ambas as bactérias) foi muito expressiva, ou seja, após o período de adaptação, os tratamentos da levedura Mauri em cultivo com ambas as bactérias foram muito debilitados, permanecendo com baixa viabilidade em todos os reciclos, no entanto, percebe-se que o valor não continuou a diminuir substancialmente ao longo do experimento. Esse fato está de acordo com dados de Thomas et al. (2001), em que foi testado o efeito de algumas espécies de *Lactobacillus* (*L. collinoides*, *L. fermentum*, *L. plantarum* e *L. paracasei*) em cultura mista com *S. cerevisiae* durante 6 reciclos de fermentação em batelada de mosto a base de milho e relataram que a presença da bactéria, quando inoculada com 24h de antecedência afetou substancialmente mais os parâmetros da fermentação do que quando a bactéria foi inoculada, simultaneamente com as leveduras, no início do experimento.

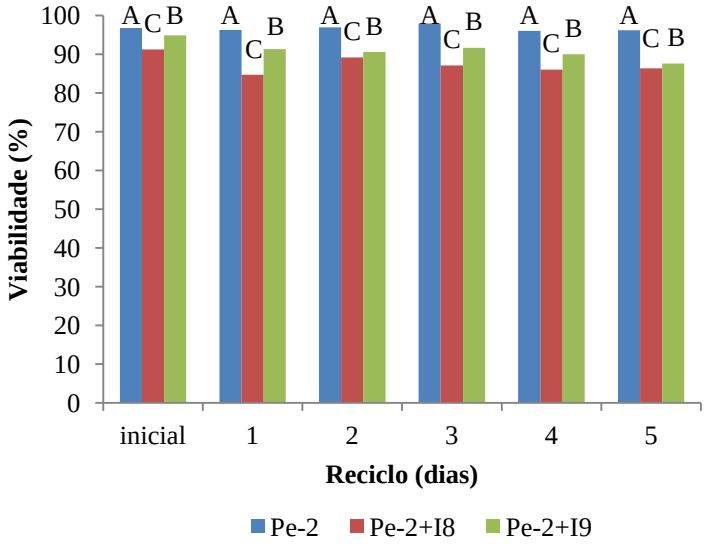

Figura 7 – Valores percentuais de viabilidade para a levedura PE-2 sem contaminação bacteriana, em cultivo com a bactéria I8 e em cultivo com a bactéria I9. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada reciclo

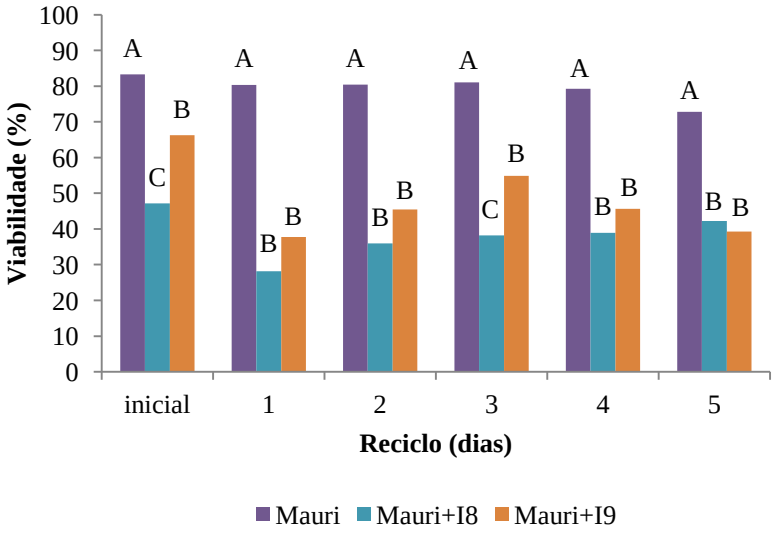

Figura 8 – Valores percentuais de viabilidade para a levedura Mauri sem contaminação bacteriana, Mauri em cultivo com a bactéria I8 e em cultivo com a bactéria I9. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada reciclo

Com relação ao brotamento, houve muita variação entre todos os tratamentos de todos os ciclos. A levedura PE-2 apresentou maior taxa de brotamento quando contaminada com a bactéria homo, em todos os reciclos (Figura 7), enquanto a levedura Mauri não apresentou esse mesmo padrão, já que não houve diferença significativa entre os tratamentos contaminados com as diferentes bactérias (Figura 8), o que pode ser decorrente da maior susceptibilidade dessa levedura aos efeitos da contaminação. No geral houve um aumento na taxa de brotamento após o final do período de adaptação.

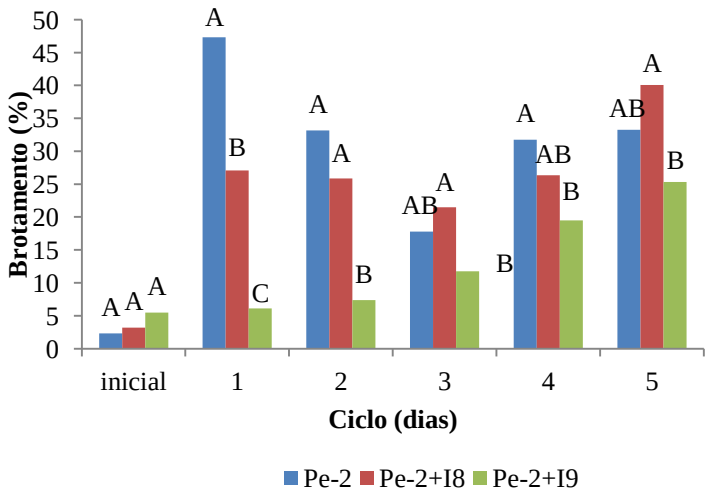

Figura 9 – Valores percentuais de brotamento para a levedura PE-2 sem contaminação bacteriana, em cultivo com a bactéria I8 e em cultivo com a bactéria I9. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada reciclo

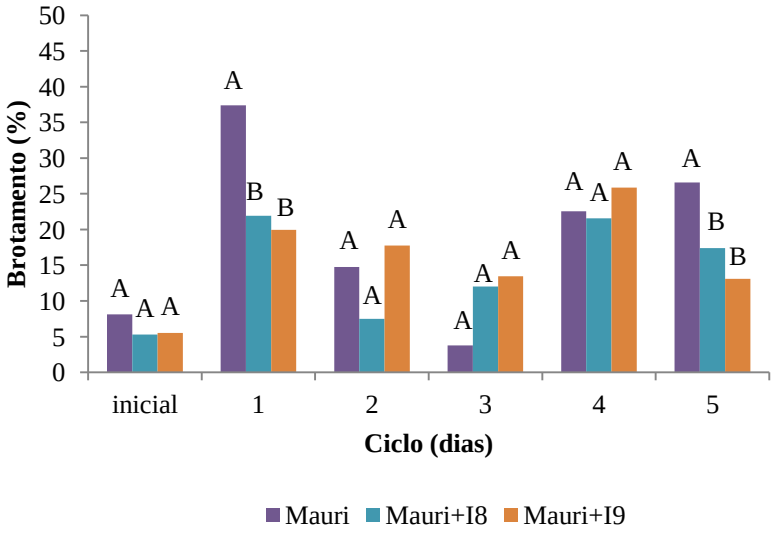

Figura 10 – Valores percentuais de brotamento para a levedura Mauri sem contaminação bacteriana, em cultivo com a bactéria I8 e em cultivo com a bactéria I9. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada reciclo

5.4 Valores de pH e teores de lactato

Os valores de pH encontrados nos vinhos, como era esperado, foram ligeiramente menores nos tratamentos contaminados com as bactérias em comparação com o tratamento controle das duas leveduras testadas, devido a grande produção de ácidos orgânicos realizada por parte das bactérias láticas. Segundo consta na literatura, a redução no pH deixa a levedura mais susceptível ao etanol, prejudicando seu rendimento devido a toxidade do ambiente. Além disso, em condições anaeróbias a produção de ácido lático por parte das homofermentativas é maior do que nas heterofermentativas (NARENDRANATH et al., 1997), o que nos leva a crer que o pH deve ser menor nos tratamentos com a I8, já que esse ácido orgânico contribui fortemente para baixar os níveis de pH.

No entanto, o que podemos observar é que na prática outros parâmetros influenciaram. Ao considerarmos os tratamentos com a levedura PE-2 podemos perceber que justamente o pH do tratamento em que a levedura foi cultivada em conjunto com a bactéria I9 (heterofermentativa) sofre uma ligeira diminuição ao longo dos reciclos, sendo completada nos três últimos, quando seu pH é significativamente menor em comparação com o cocultivos com a I8 (Figura 9). Esse evento pode ser explicado pelo fato, já citado anteriormente, da prevalência das bactérias heterofermentativas em relação às homo quando cultivadas em laboratório sob condições que simulam o processo industrial, além disso, tais bactérias produzem quantidades significativas de ácido acético, o que também deve ter contribuído para a queda no pH. É possível observar que a produção de ácido lático foi superior quando a PE-2 foi cultivada em conjunto com a I8 (Figura 10), como é descrito na literatura e já foi anteriormente citado. No entanto, observamos que essa produção não é acompanhada de uma queda proporcional do pH quando comparamos com o cultivo com a I9 (principalmente nos reciclos 3, 4 e 5 da figura 9), o que reforça a ideia de que mesmo produzindo grande quantidade de ácido lático, a bactéria I8 não foi capaz de baixar o pH significativamente em comparação à I9, devido ao bom desempenho e a alta concentração celular da mesma.

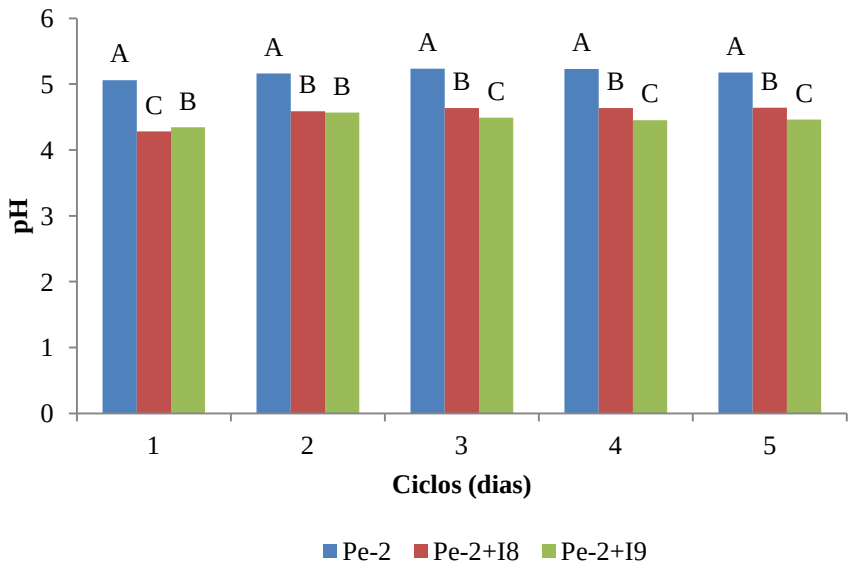

Figura 11 – Valores de pH dos vinhos para a levedura PE-2 sem contaminação bacteriana, em cultivo com a bactéria I8 e em cultivo com a bactéria I9 ao longo de 5 reciclos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada reciclo

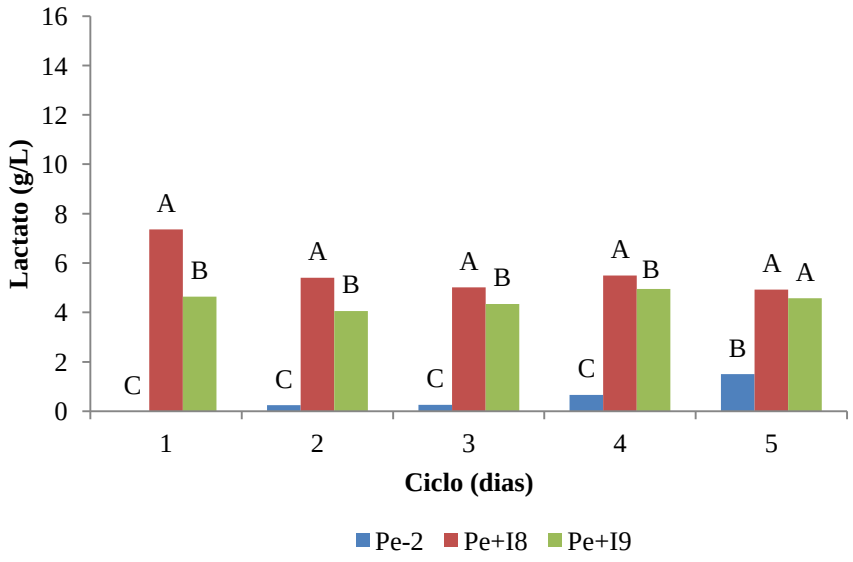

Figura 12 – Produção de ácido lático (g/L) nos vinhos para a levedura PE-2 sem contaminação bacteriana, em cultivo com a bactéria I8 e em cultivo com a bactéria I9 ao longo de 5 reciclos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada reciclo

No entanto, quando as bactérias crescem em cocultivo com a levedura Mauri (Figura 11) o pH é significativamente menor, em todos os reciclos, na presença das bactérias homofermentativas o que corrobora com os dados de Gomes (2009), que ao testar uma levedura de panificação, assim como a Mauri, em conjunto com bactérias homo e hetero,

também encontrou esse padrão de menor pH nos cocultivos com a homofermentativa; em contrapartida, ao testar a PE-2 também obteve menores valores de pH quando o cultivo se processou na presença de heterofermentativa. Embora nos testes com a levedura Mauri a contaminação com a bactéria I9 (heterofermentativa) superou grandemente a contaminação com I8, a diferença entre a produção de ácido lático na presença da I8 em relação à produção na presença da I9 (Figura 12) foi muito maior do que nos testes com a levedura PE mostrados na figura 9, o que foi suficiente para manter o pH mais baixo nesses cultivos (Mauri+I8), mesmo frente ao grande desenvolvimento da bactéria I9 e os ácidos acético e lático também produzidos por elas. Esses dados nos mostram que provavelmente a levedura PE-2 exerce maior antagonismo sobre as bactérias contaminantes e assim a produção de ácido não é tão elevada e nem tão diferente entre as bactérias I8 e I9, isso somado ao fato de que a I9 se desenvolveu mais, acabou por influenciar as análises de pH, baixando seus valores na presença da heterofermentativa. Já a levedura Mauri não exerce tanta influência sobre as bactérias, então a I8 produz muito ácido lático e acaba reduzindo o valor do pH nos tratamentos em que está presente, mesmo frente ao expressivo desenvolvimento da I9.

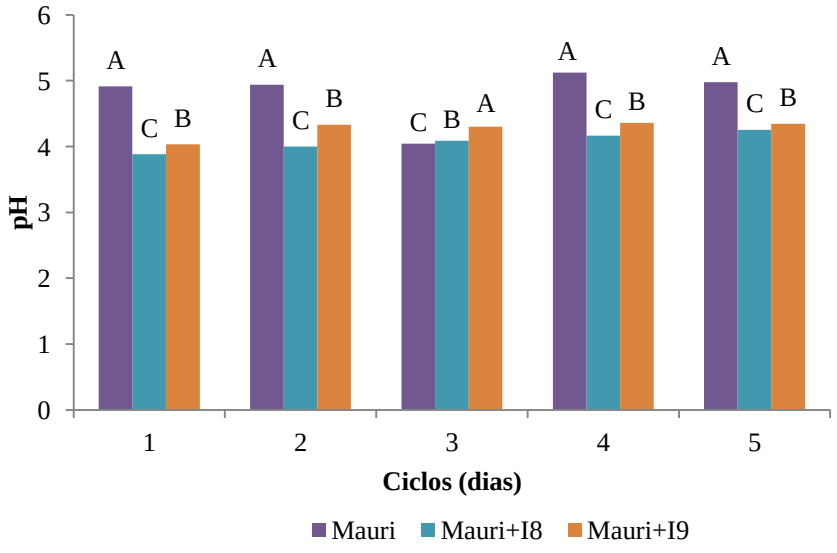

Figura 13 – Valores de pH dos vinhos para a levedura Mauri sem contaminação bacteriana, em cultivo com a bactéria I8 e em cultivo com a bactéria I9 ao longo de 5 reciclos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada reciclo

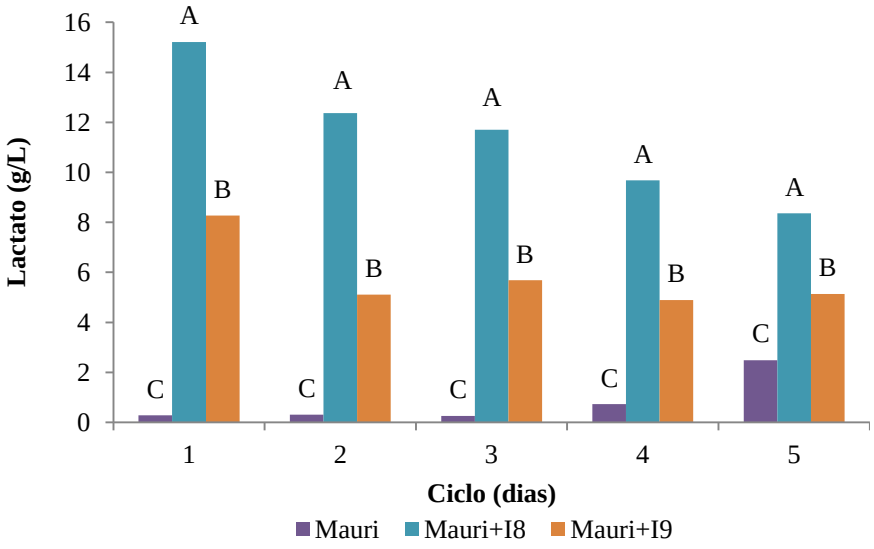

Figura 14 – Produção de ácido lático (g/L) nos vinhos para a levedura Mauri sem contaminação bacteriana, em cultivo com a bactéria I8 e em cultivo com a bactéria I9 ao longo de 5 reciclos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada reciclo

5.5 Teores de acetato

O ácido acético é um composto produzido tanto por leveduras como por bactérias heterofermentativas, quando essas se encontram em ambiente anaeróbio e com alta concentração de frutose, condições muito comuns na fermentação de mosto à base de cana-de-açúcar para a produção de etanol. Trata-se do principal ácido orgânico volátil produzido durante a fermentação, podendo ser prejudicial à levedura Saccharomyces quando em concentrações elevadas (KANDLER, 1983; KANDLER; WEISS, 1986; ALVES, 1994). De acordo com a literatura, o ácido acético é mais tóxico quando comparado com o lático, devido seu natureza mais polar (MAIORELLA et al., 1983; PAMPULHA, 1989). Além do efeito tóxico inerente a ele, também pode agir sinergisticamente de forma negativa, e afetar o crescimento e metabolismo das leveduras quando se encontra na presença do ácido lático, ou ainda ter seu poder acentuado pela presença do etanol, prejudicando ainda mais as leveduras (PAMPULHA; LOUREIRO-DIAS, 1989).

Como é demonstrado na Figura 13, a concentração de ácido acético foi muito superior quando as leveduras estavam em cultivo conjunto com a bactéria I9 (heterofermentativa), sendo que provavelmente o valor encontrado refere-se à soma do ácido produzido pelas leveduras e pelas bactérias. Quando observamos a levedura PE-2 em conjunto com a bactéria I8, podemos ver que, em comparação ao tratamento sem contaminação, houve um aumento

significativo na produção de ácido acético em todos os reciclos, muito provavelmente porque a presença das bactérias estimulou a produção de ácido por parte da levedura.

Assim como no caso do ácido lático, a levedura Mauri exerceu menor pressão sobre as bactérias, então a produção de ácido acético foi mais elevada em todos os reciclos nos tratamentos que testaram a levedura Mauri em conjunto com a bactéria I9 (Figura 14) em comparação ao tratamento da PE-2 em conjunto com a I9. Nos tratamentos em que a Mauri não se encontrava na presença de bactérias podemos observar que a produção de ácido acético foi superior à produção nesse mesmo tratamento da levedura PE-2, o que poder ter tido um influência negativa sobre o metabolismo, crescimento e viabilidade dessa levedura, visto a elevada toxidez desse ácido à célula.

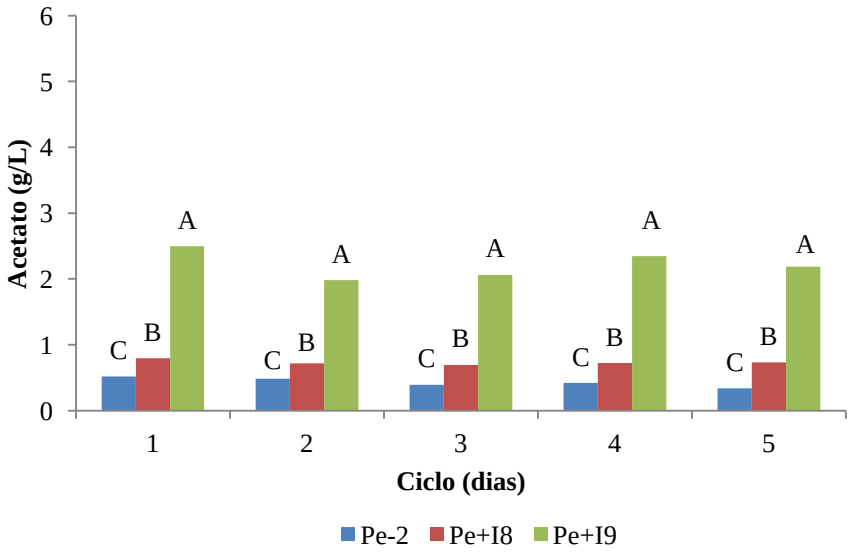

Figura 15 – Produção de ácido acético (g/L) nos vinhos para a levedura PE-2 sem contaminação bacteriana, em cultivo com a bactéria I8 e em cultivo com a bactéria I9 ao longo de 5 reciclos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada reciclo

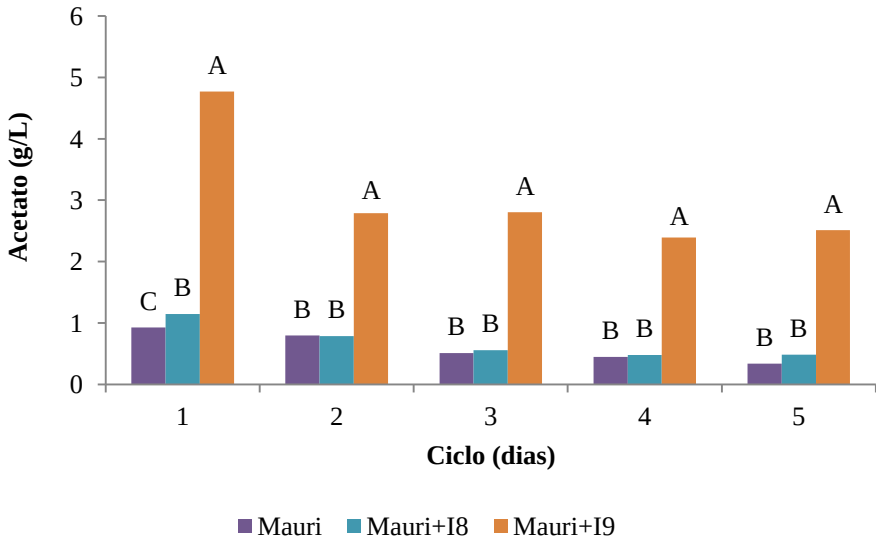

Figura 16 – Produção de ácido acético (g/L) nos vinhos para a levedura Mauri sem contaminação bacteriana, em cultivo com a bactéria I8 e em cultivo com a bactéria I9 ao longo de 5 reciclos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada reciclo

5.6 Teores de succinato

O succinato, como já foi citado, é um subproduto sintetizado exclusivamente pelas leveduras; de acordo com dados da literatura, acredita-se que esse composto além de ser o principal ácido produzido pelas leveduras funciona como uma defesa desses microrganismos frente ao estresse causado pela contaminação bacteriana, agindo de forma sinergística com o etanol também sintetizado por elas (ALVES, 1994; BASSO et al., 1997; OURA 1977).

Um fato interessante demonstrado através das figuras 15 e 16, é que houve produção do composto quase que exclusivamente nos tratamentos contaminados com a bactéria I8 (homofermentativa), com exceção do reciclo 5 do tratamento da levedura Mauri sem contaminação, em que o succinato foi detectado em pequena quantidade. É importante observar que a ausência de succinato em todos os tratamentos contaminados com a bactéria I9 e em quase todos os tratamentos sem contaminação das duas leveduras, pode ser apenas decorrente da capacidade de detecção do aparelho usado (que é de 60 ppm), ou seja, como a concentração nesses casos era baixa, o equipamento não detectou. Dados de Gomes (2009) indicam uma tendência de menor teor de succinato quando a levedura é cultivada em conjunto com a bactéria heterofermentativa em condições que simulam o processo industrial. No entanto, a presença de tão baixas concentrações do composto, que possivelmente nem puderam ser detectadas, quando o cultivo é deliberadamente contaminado com bactérias

heterofermentativas sugerem que o isolado I9 poderia estar metabolizando esse ácido, já que a multiplicação em massa dessa bactéria certamente teria influência sobre a levedura.

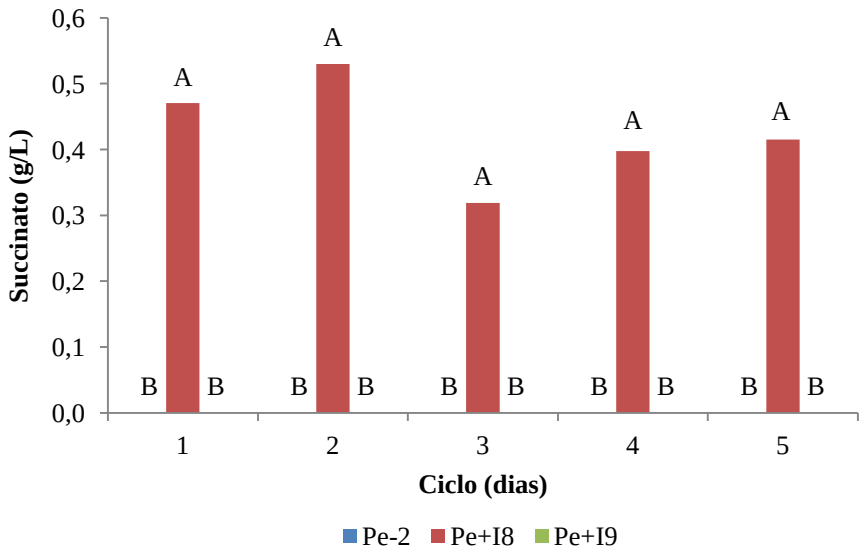

Figura 17 – Concentração de Succinato (g/L) nos vinhos para a levedura PE-2 sem contaminação bacteriana, em cultivo com a bactéria I8 e em cultivo com a bactéria I9 ao longo de 5 reciclos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada reciclo

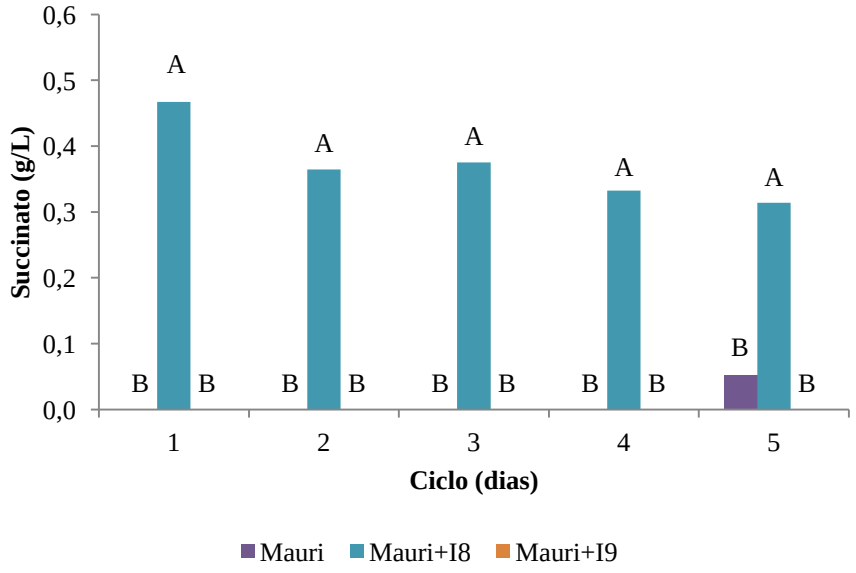

Figura 18 – Concentração de Succinato (g/L) nos vinhos para a levedura Mauri sem contaminação bacteriana, em cultivo com a bactéria I8 e em cultivo com a bactéria I9 ao longo de 5 reciclos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada reciclo

5.7 Teores de glicerol

Dentre os subprodutos resultantes da fermentação, o glicerol se coloca como importante fisiologicamente e indesejado ao mesmo tempo. Sabe-se que o composto é produzido por leveduras em menor quantidade apenas que o etanol, principalmente quando elas se encontram sob estresse osmótico, bem como sob outras condições estressantes impostas durante o processo de fermentação (GUTIERREZ, 1991; OURA, 1977). Após a perda de água e turgor naturais de uma situação hiperosmótica, a levedura acumula glicerol no citoplasma como uma forma de neutralizar a desidratação (MAGER et al., 2002), no entanto, esse processo pode desencadear o desvio de 5 a 8% do açúcar metabolizado pela levedura, resultando em menores rendimentos alcoólicos (ALVES, 2000).

Dados da literatura já haviam comprovado que a presença de bactéria no meio fermentativo estimula a produção de glicerol (CHERUBIN, 2003), no entanto, o primeiro relato da ocorrência de menor quantidade do composto quando observamos cultivos contaminados com bactéria homofermentativa, em relação ao tratamento contaminado com bactéria hetero e também em relação ao padrão (não contaminado) foi realizado por Gomes (2009). Os dados demonstrados na figura 17 concordam com essa observação já descrita na literatura, enquanto os dados revelados na figura 18 mostram que essa tendência ocorreu nos reciclos 1, 4 e 5.

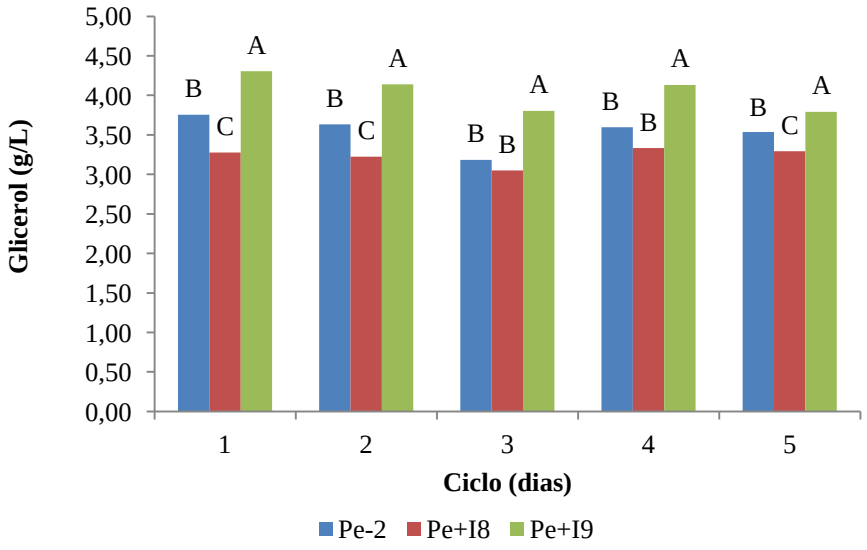

Figura 19 – Concentração de Glicerol (g/L) nos vinhos para a levedura PE-2 sem contaminação bacteriana, em cultivo com a bactéria I8 e em cultivo com a bactéria I9 ao longo de 5 reciclos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada reciclo

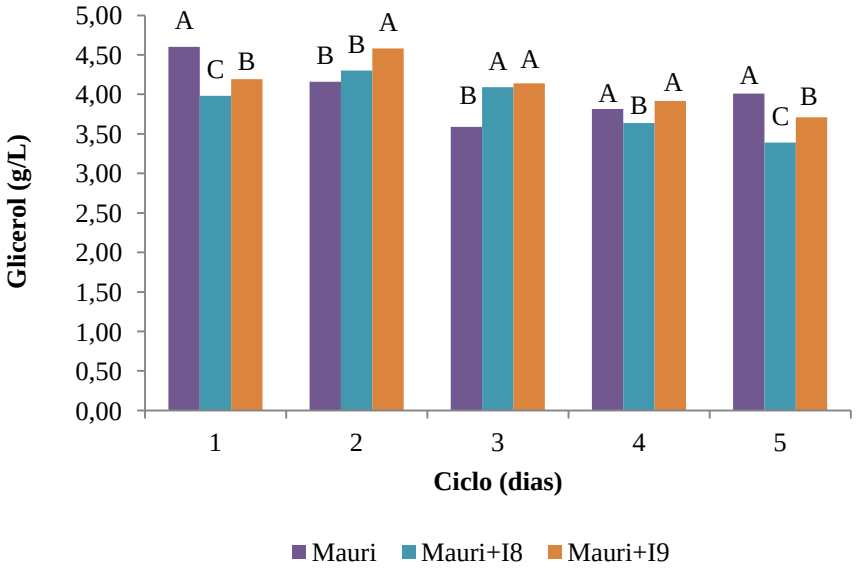

Figura 20 – Concentração de Glicerol (g/L) nos vinhos para a levedura Mauri sem contaminação bacteriana, em cultivo com a bactéria I8 e em cultivo com a bactéria I9 ao longo de 5 reciclos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada reciclo

5.8 Teores de manitol

O manitol, como já foi mencionado, é um produto exclusivo do metabolismo das bactérias heterofermentativas, e dessa forma pôde ser observado apenas nos tratamentos contaminados com esse tipo de bactéria (Figuras 19 e 20). Os menores valores mostrados tanto nos tratamentos não contaminados de PE-2 e Mauri, quanto nos tratamentos contaminados com bactéria homo não diferem estatisticamente, e como são muito baixos, provavelmente correspondem a uma margem de erro de detecção própria do aparelho. Outro ponto que podemos observar no gráfico é a superioridade em termos de produção de manitol por parte da bactéria I9 quando se encontra em cocultivo com a levedura Mauri, comparativamente a esse tratamento da levedura PE-2, já que tradicionalmente essa levedura não se mostra muito competitiva frente à contaminação.

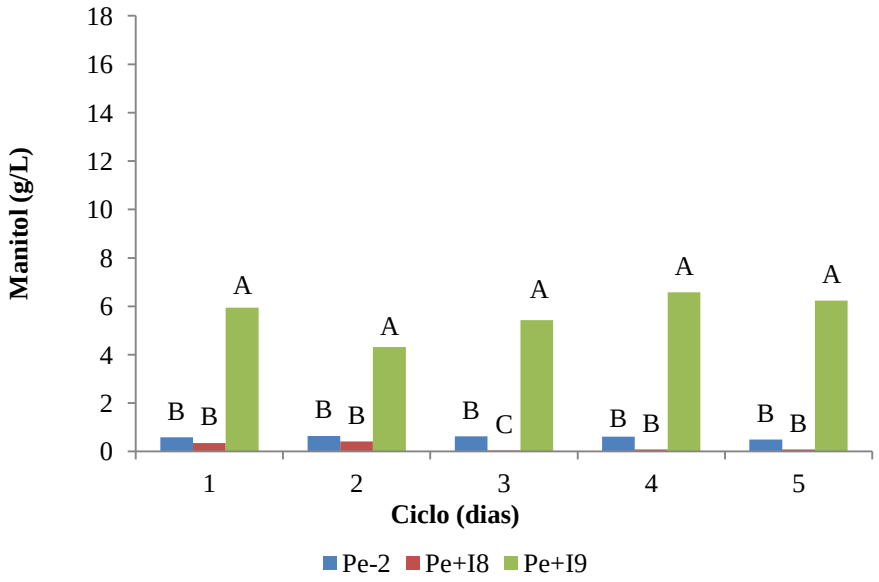

Figura 21 – Concentração de Manitol (g/L) nos vinhos para a levedura PE-2 sem contaminação bacteriana, em cultivo com a bactéria I8 e em cultivo com a bactéria I9 ao longo de 5 reciclos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada reciclo

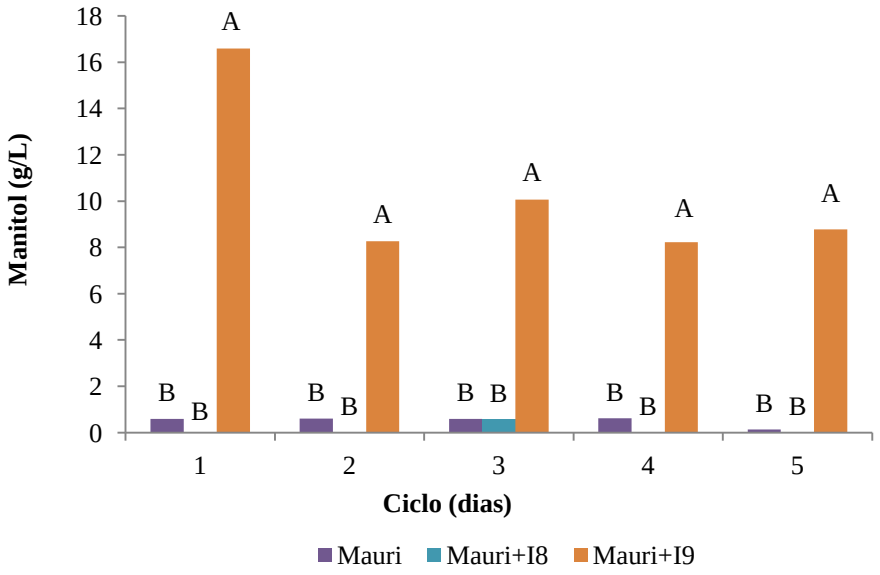

Figura 22 – Concentração de Manitol (g/L) nos vinhos para a levedura Mauri sem contaminação bacteriana, em cultivo com a bactéria I8 e em cultivo com a bactéria I9 ao longo de 5 reciclos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada reciclo

5.9 Açúcares residuais, etanol e rendimento alcoólico

Os açúcares residuais encontrados nos vinhos após cada reciclo estão exemplificados nas figuras 21 e 22. Podemos observar que nos testes realizados com a levedura PE-2 não houve diferença entre os teores de açúcares residuais nos vinhos dos diferentes tratamentos, e que os teores permaneceram abaixo de 0,1%.

Já nas amostras da levedura Mauri (Figura 22), o tratamento da levedura em cocultivo com a bactéria I9 apresentou diferença estatística em relação ao controle (sem contaminação) apenas no reciclo 1, sendo que nos demais reciclos não houve diferença entre o tratamento sem contaminação e tratamento contaminado com a levedura I9. Já as amostras em que a levedura Mauri foi cultivada em conjunto com a bactéria I8 se destacaram, pois em todos os reciclos apresentaram taxa de açúcar residual maior do que os outros tratamentos, com grande diferença entre eles e também quando comparada com o mesmo tratamento da levedura PE-2, o que mais uma vez evidencia a superioridade da PE frente às pressões da contaminação.

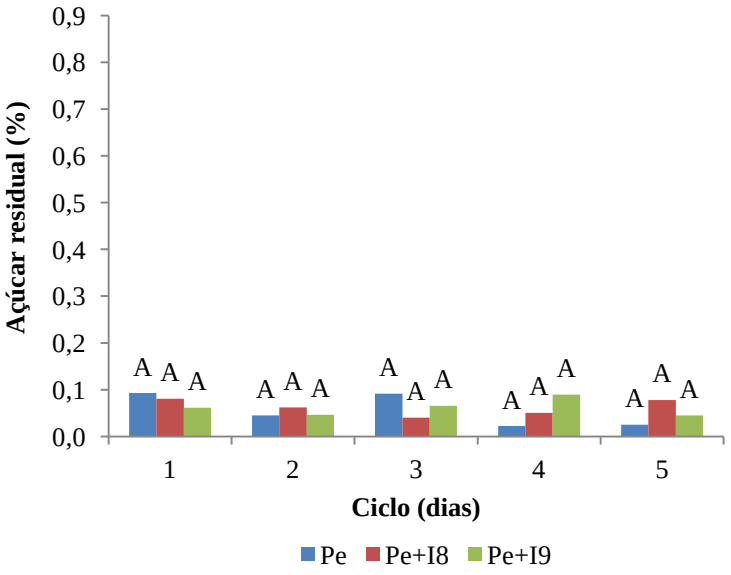

Figura 23 – Teores (%) de açucares residuais no vinho para a levedura PE-2 sem contaminação bacteriana, em cultivo com a bactéria I8 e em cultivo com a bactéria I9 durante os 5 reciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada reciclo

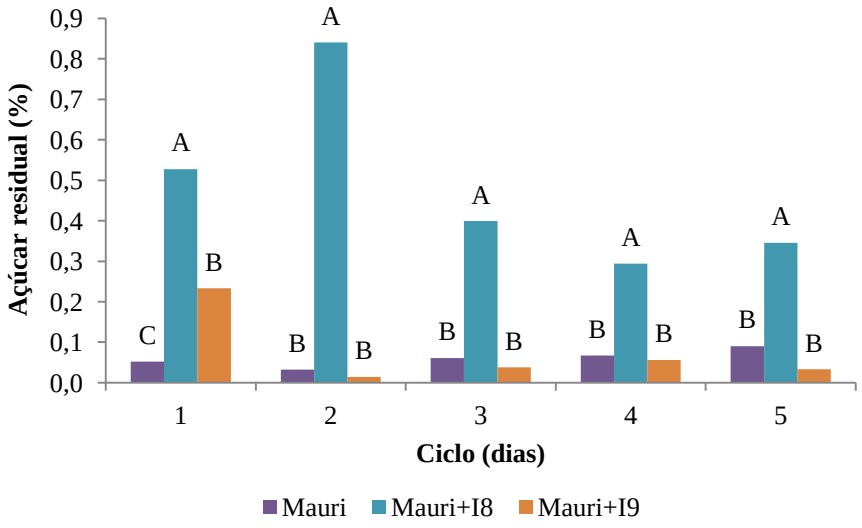

Figura 24 – Teores (%) de açucares residuais no vinho para a levedura Mauri sem contaminação bacteriana, em cultivo com a bactéria I8 e em cultivo com a bactéria I9 durante os 5 reciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada reciclo

Ao analisarmos cada açúcar separadamente, vemos que a frutose foi o principal açúcar a contribuir para o aumento do ART residual, sendo que a glicose, assim como a sacarose, apresentaram poucas diferenças entre seus valores dentro dos tratamentos e ao longo dos reciclos (Tabela 1). Já o consumo de frutose no tratamento da levedura Mauri+I8 permaneceu abaixo dos outros açúcares, bem como abaixo do consumo da própria frutose nos demais tratamentos, fazendo com que restasse esse açúcar no vinho. Esse acontecimento pode estar relacionado com o fato de a bactéria heterofermentativa ter preferência por metabolizar a frutose, levando a um maior consumo desse açúcar no tratamento da levedura Mauri+I9 (tratamento esse em que a bactéria teve desenvolvimento expressivo). Adicionalmente, a viabilidade celular da levedura Mauri mostrou-se muito baixa nas amostras contaminadas, podendo também ter contribuído para o menor consumo de frutose.

Tabela 1 – Estudo comparativo entre os tratamentos de PE-2 e Mauri sem bactéria, com bactéria homofermentativa (I8) e heterofermentativa (I9) sobre os teores de açúcares restantes nos vinhos após cada reciclo, no decorrer de cinco reciclos

		Ciclos (dias)				
		1	**2**	**3**	**4**	**5**
Glicose	**PE-2**	0,04	0,02	0,03	0,02	0,00
	PE-2+I8	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00
	PE2+I9	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00
	Mauri	0,03	0,00	0,01	0,02	0,02
	Mauri+I8	0,00	0,03	0,02	0,01	0,01
	Mauri+I9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Frutose	**PE-2**	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00
	PE-2+I8	0,02	0,00	0,01	0,00	0,00
	PE2+I9	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00
	Mauri	0,01	0,00	0,01	0,00	0,02
	Mauri+I8	0,51	0,79	0,36	0,25	0,19
	Mauri+I9	0,21	0,01	0,00	0,01	0,00
Sacarose	**PE-2**	0,05	0,02	0,02	0,00	0,03
	PE-2+I8	0,06	0,06	0,03	0,01	0,08
	PE2+I9	0,03	0,05	0,07	0,06	0,05
	Mauri	0,01	0,03	0,04	0,04	0,05
	Mauri+I8	0,01	0,02	0,02	0,03	0,15
	Mauri+I9	0,03	0,00	0,04	0,05	0,03

Já produção de etanol das amostras contaminadas apresentou redução com diferença significativa em todos os reciclos, tanto da levedura PE-2 quanto da Mauri. Ao observarmos os resultados referentes à PE-2 (Figura 25), podemos ver que em todos os reciclos as amostras contaminadas com a bactéria I9 apresentaram menor porcentagem de etanol no vinho do que as amostras contaminadas com a bactéria I8, ou seja, a bactéria hetero exerceu maior influência quando consideramos a produção de álcool da levedura PE-2, mesmo porque essa bactéria se desenvolveu melhor e se sobressaiu em número de bastonetes, podendo prejudicar mais intensamente a produção de álcool.

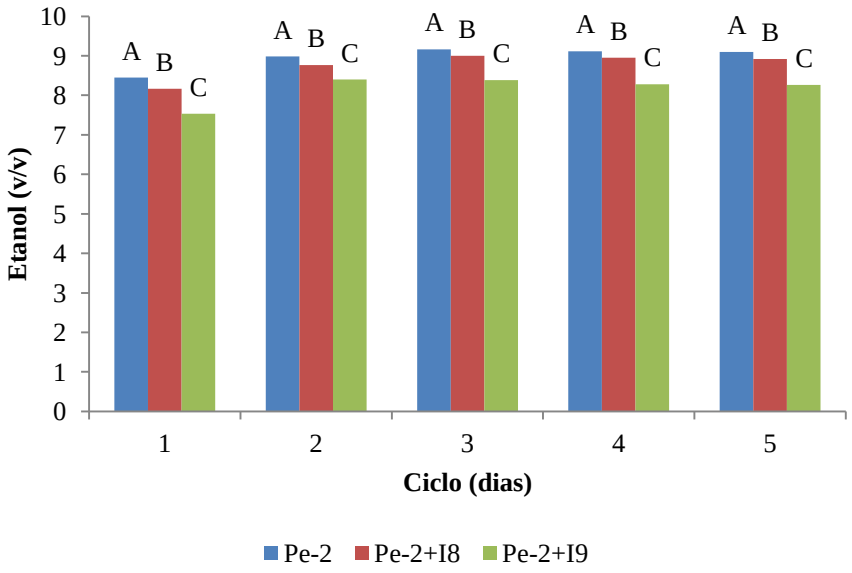

Figura 25 – Porcentagem de etanol dos vinhos para a levedura PE-2 sem contaminação bacteriana, em cultivo com a bactéria I8 e em cultivo com a bactéria I9 durante os 5 reciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada reciclo

A levedura Mauri apresentou as mesmas características quanto à produção de etanol, sendo que ocorreu queda nos tratamentos contaminados com bactéria, e apenas o reciclo 2 não apresentou diferença entre a quantidade de álcool produzida entre as amostras contaminadas com a bactéria I8 e a I9 (Figura 26). Já nos outros reciclos manteve-se um menor percentual de álcool no vinho nas amostras em conjunto com a bactéria I9, assim como nos tratamentos com a levedura PE-2, já citado anteriormente.

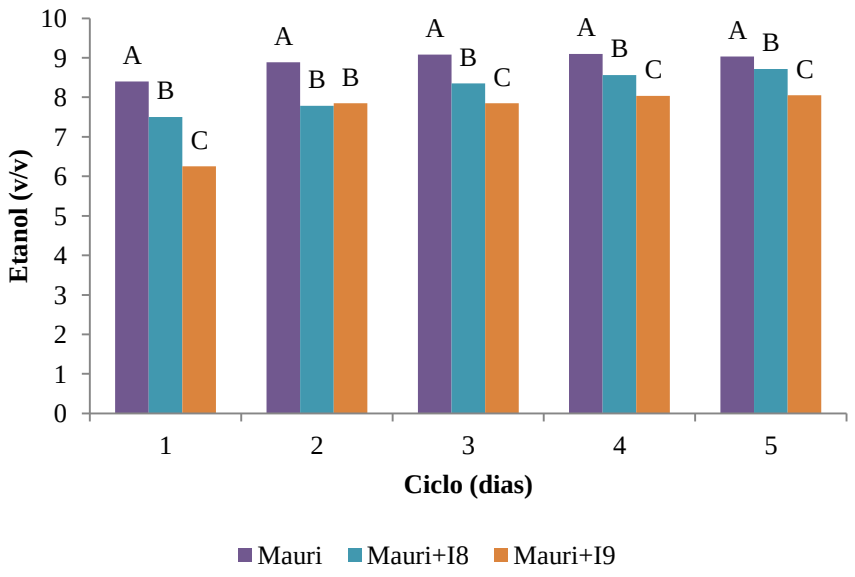

Figura 26 - Porcentagem de etanol dos vinhos para a levedura Mauri sem contaminação bacteriana, em cultivo com a bactéria I8 e em cultivo com a bactéria I9 durante os 5 reciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada reciclo

Essa redução, embora seja pequena em números, pode representar muito quando extrapolamos para o volume produzido em uma destilaria, ou seja, se observarmos os dados detalhados (Anexo J – Tabela 11) e calcularmos as médias dos teores alcoólicos de cada tratamento ao longo dos reciclos podemos observar uma queda no teor alcoólico de 0,2% quando comparamos o tratamento da levedura PE-2 sem contaminação com o tratamento contaminado com a bactéria I8 (homofermentativa), o que representaria um volume de 1.600 L de etanol que deixaria de ser produzido todos os dias, se tomarmos como exemplo uma destilaria que produza 800.000 L etanol/dia. Esse volume representaria um total de 288.000L ao final de uma safra de 180 dias. Já o tratamento contaminado com a bactéria I9 sofreu uma queda no teor alcoólico de 0,79% em relação à PE-2 sem contaminação, o que representaria um volume de 6.320 L de etanol que deixaria de ser produzido por dia na mesma destilaria tomada como exemplo. Esse volume somaria um total de 1.137.600 L ao final da safra.

Considerando que a levedura Mauri sofreu mais com os efeitos da contaminação, os números são mais alarmantes. O tratamento em conjunto com a bactéria I8 sofreu uma queda de 0,72% no teor alcoólico do vinho ao se efetuar a média dos reciclos. Esse valor representa um volume de 5.760 L que deixariam de ser produzidos todos os dias, considerando a mesma destilaria citada como exemplo, o que somaria um total de 1.036.800 L de etanol a menos ao final dos 180 dias da safra. Já o tratamento contaminado com a bactéria I9 sofreu uma queda

de 1,29% em relação ao controle, o que representa 10.320 L de etanol a menos no final de um dia de moagem e um total de 1.857.600 L ao final da safra.

Nas figuras 27 e 28 podemos observar, respectivamente, o rendimento alcoólico apresentado pelas leveduras PE-2 e Mauri, quando foi cultivada na presença de bactérias homo e hetero ao longo de 5 reciclos fermentativos. No gráfico que representa os tratamentos com a levedura PE-2 (Figura 27) podemos observar que apenas as amostras contaminadas com a bactéria I9 apresentaram diferença significativa em relação ao controle, e que o rendimento das amostras testadas em conjunto com a bactéria I8 não apresentaram redução do rendimento em relação às amostras não contaminadas, fato que também foi descrito por Gomes (2009).

Já no gráfico que representa os tratamentos com a levedura Mauri (Figura 28) vemos que ambas as bactérias levaram à redução no rendimento alcoólico. Observações semelhantes foram publicadas por Makanjuola (1992), que realizou experimento simulando a produção de whisky com contaminação proposital por *L. brevis*, *L plantarum* e *Leuconostoc* sp., e obteve resultados que demonstraram que uma contaminação de aproximadamente 4,5 x 10^8 UFC/mL, após 30 horas de cultivo, ocasionou a redução de 17% no rendimento alcoólico, e que menos de 1% de redução no rendimento para produção de etanol combustível já é muito significante. Além disso, isto que as duas bactérias, especialmente a I9, se desenvolveram bem em conjunto com a levedura Mauri, é possível que tenha havido uma redução dos nutrientes essenciais do meio, levando à redução do metabolismo da levedura e a consequente queda no rendimento alcoólico, conforme foi descrito por Narendranath et al. (1997).

Mais uma vez nos deparamos com reduções não tão grandes em números, mas que representam muito no ambiente de grandes volumes de uma destilaria, o que confirma a necessidade de se manter a contaminação em níveis aceitáveis, já que seria impossível eliminá-la.

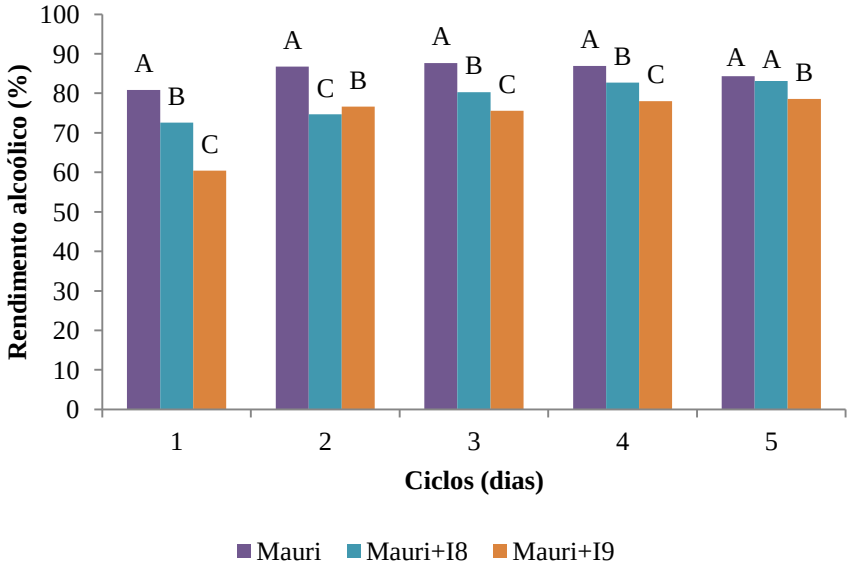

Figura 27 – Rendimento alcoólico dos vinhos para a levedura PE-2 sem contaminação bacteriana, em cultivo com a bactéria I8 e em cultivo com a bactéria I9 durante os 5 reciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada reciclo

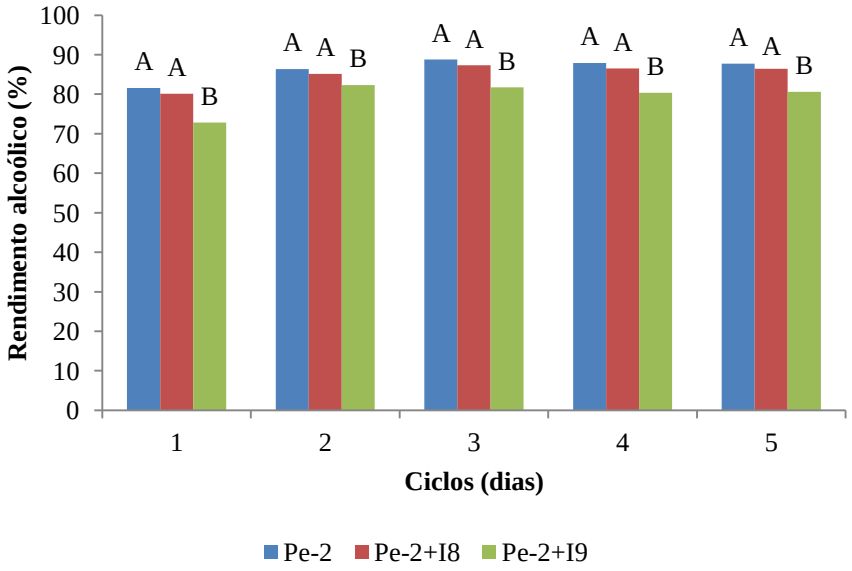

Figura 28 – Rendimento alcoólico dos vinhos para a levedura Mauri sem contaminação bacteriana, em cultivo com a bactéria I8 e em cultivo com a bactéria I9 durante os 5 reciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada reciclo

5.10 Acréscimo de biomassa

Ao observarmos os valores de acréscimo de biomassa, podemos perceber que em todos os tratamentos houve um aumento do peso do fermento (Figuras 29 e 30) em relação aos valore iniciais.

A Figura 29 mostra que apenas no reciclo 1 os tratamentos sem contaminação e contaminados com a I8 não se diferenciam estatisticamente, enquanto o tratamento contaminado com a I9 apresente menor ganho de biomassa em relação aos outros dois. Já os demais reciclos mantém o padrão de maior ganho de biomassa para o tratamento sem contaminação, seguido pelo tratamento contaminado com a I8 e depois o tratamento contaminado com a I9.

Já a Figura 30 traz os dados referentes à levedura Mauri, apresenta que nos dois primeiros reciclos não houve diferença significativa entre os tratamentos com bactérias, e nos três últimos reciclos manteve-se a proporcionalidade entre os valores, ou seja, Mauri sem contaminação obteve maiores ganhos em biomassa, seguido por Mauri em conjunto com I8 e depois Mauri em conjunto com I9. Esses valores demonstram que existe uma ação negativa das bactérias sobre o aumento da biomassa do fermento, e que a bactéria I9 (heterofermentativa) aparentemente exerce maior influência na maioria dos casos, provavelmente por colonizar mais eficientemente o ambiente e inibir a multiplicação da levedura.

Esses dados diferem em parte do que foi descrito por Gomes (2009), visto que a autora obteve valores superiores de biomassa nos tratamentos sem contaminação apenas para a levedura CAT-1, não havendo diferenças significativas entre os tratamentos com homo e hetero. Para as outras leveduras testadas (PE-2, BG-1 e Fleischmann), a autora não obteve redução da biomassa na presença da contaminação bacteriana, sendo que dentro dos cinco ciclos testados, a levedura BG-1 apresentou maior acréscimo de biomassa nos tratamentos com bactéria homo mesmo em comparação ao controle, assim como em alguns dos ciclos nos testes com a levedura PE-2, em que o ganho de biomassa foi superior quando a levedura fermentou em conjunto com a bactéria homo.

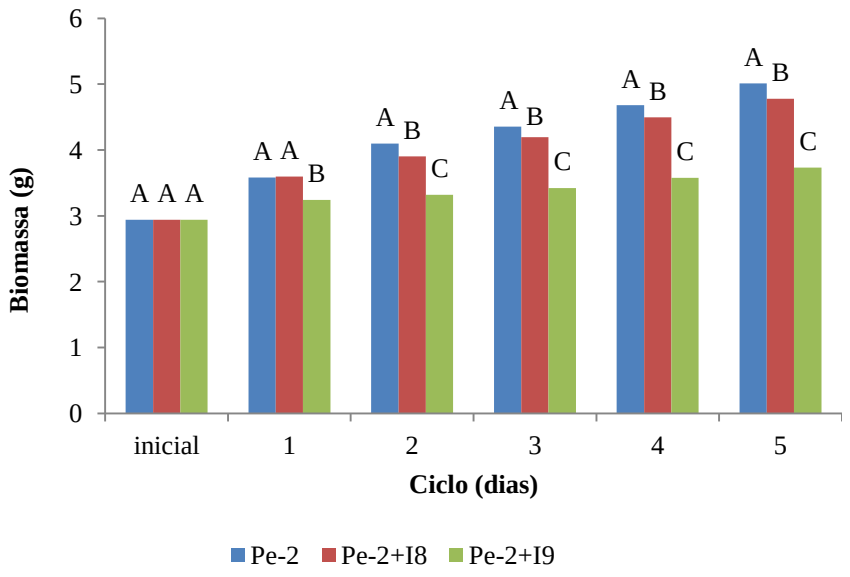

Figura 29 – Valores em gramas de biomassa para a levedura PE-2 sem contaminação bacteriana, em cultivo com a bactéria I8 e em cultivo com a bactéria I9 durante os 5 reciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada reciclo

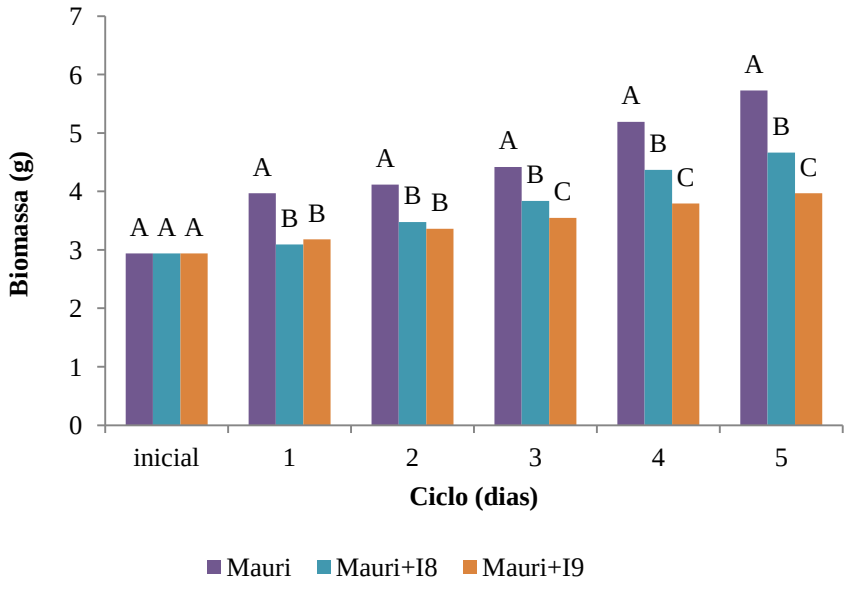

Figura 30 – Valores em gramas de biomassa para a levedura Mauri sem contaminação bacteriana, em cultivo com a bactéria I8 e em cultivo com a bactéria I9 durante os 5 reciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada reciclo

5.11 Velocidade de fermentação

A velocidade de fermentação, demonstrada nas figuras 31-40 representa o desprendimento de CO_2 ao longo das horas de cada reciclo. As figuras 31 e 32 representam a velocidade de fermentação durante o reciclo 1, em que a alimentação aconteceu em apenas uma porção e as pesagens foram realizadas ao final do ciclo.

Com relação aos resultados apresentados, pode-se perceber uma tendência a menor velocidade de fermentação nos tratamentos em cultivo conjunto entre PE-2 e I9, com exceção do reciclo 4, em que esse tratamento superou todos os outros nesse quesito. Já nos tratamentos com a levedura Mauri, no geral, as amostras sem contaminação apresentaram valores superiores, com exceção do reciclo 5, em que a amostra em conjunto com a bactéria I8 foi superior.

Dessa maneira, percebemos que a levedura PE-2 apresenta maior tolerância à contaminação bacteriana, quando consideramos contaminações com bactérias de ambos os tipos metabólicos, enquanto a levedura Mauri tem sua velocidade de fermentação reduzida frente à contaminação.

Esses dados são importantes, pois tanto uma levedura não selecionada (no caso a Mauri) ou mesmo uma situação de altas taxas de contaminação podem reduzir a velocidade de fermentação, o que pode representar um grande problema para a destilaria, já que levaria mais tempo para esgotar o açúcar da dorna, o que consequentemente influenciaria outros setores como a moagem (que precisaria ser reduzida), a recepção da cana (que ficaria parada no pátio e sujeita a deterioração) e assim sucessivamente.

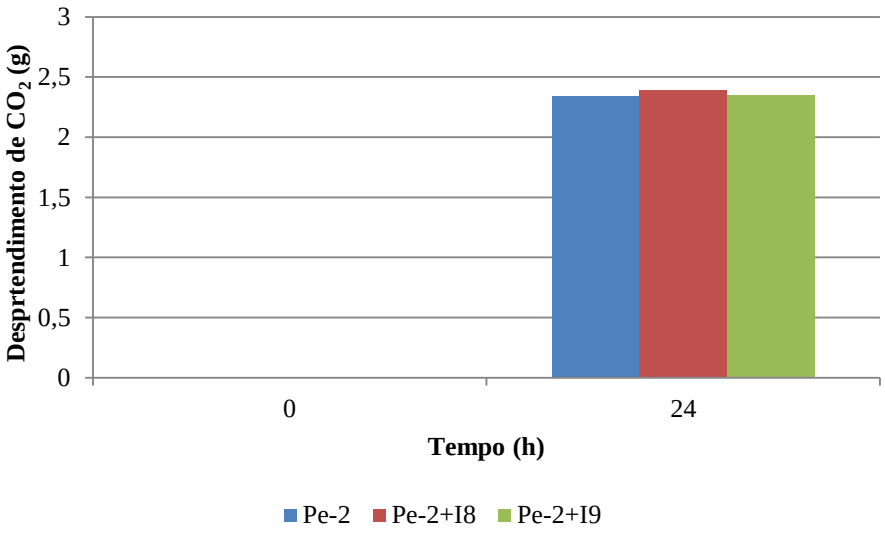

Figura 31 – Massa de CO_2 (em gramas) emitida pela levedura PE-2 sem contaminação, em conjunto com a bactéria I8 e em conjunto com a bactéria I9 durante o reciclo 1

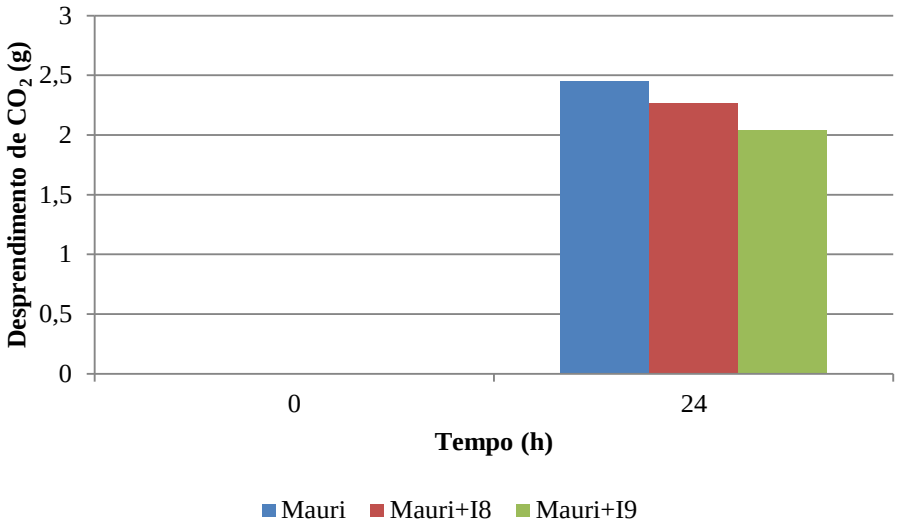

Figura 32 – Massa de CO_2 (em gramas) emitida pela levedura Mauri sem contaminação, em conjunto com a bactéria I8 e em conjunto com a bactéria I9 durante o reciclo 1

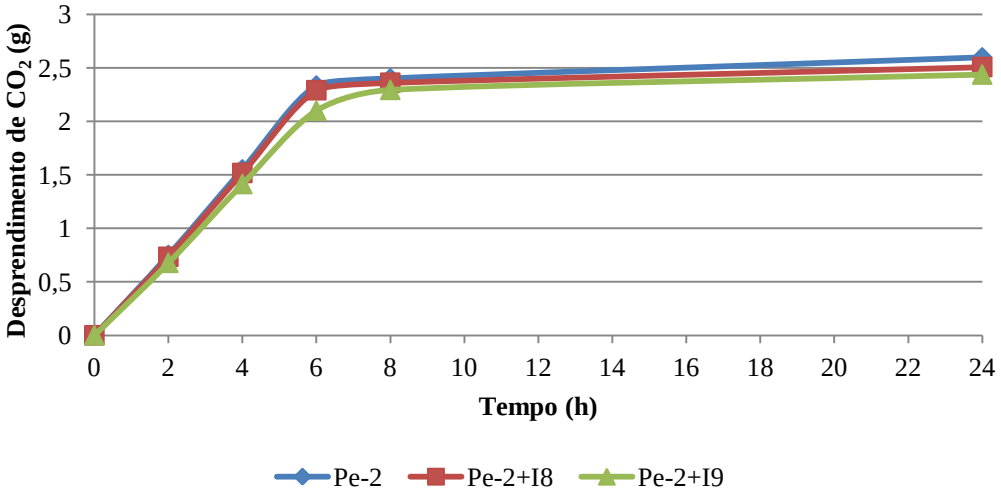

Figura 33 – Massa de CO_2 (em gramas) emitida pela levedura PE-2 sem contaminação, em conjunto com a bactéria I8 e em conjunto com a bactéria I9 durante o reciclo 2

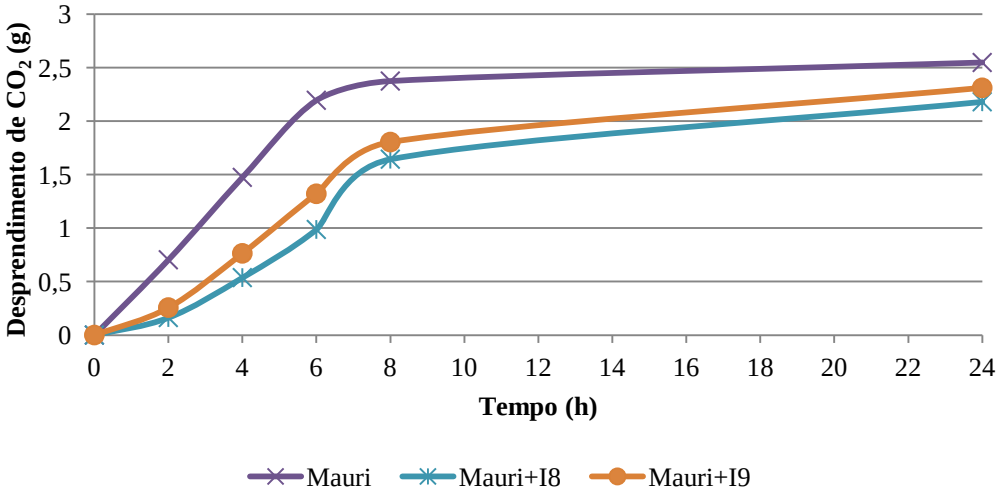

Figura 34 – Massa de CO_2 (em gramas) emitida pela levedura Mauri sem contaminação, em conjunto com a bactéria I8 e em conjunto com a bactéria I9 durante o reciclo 2

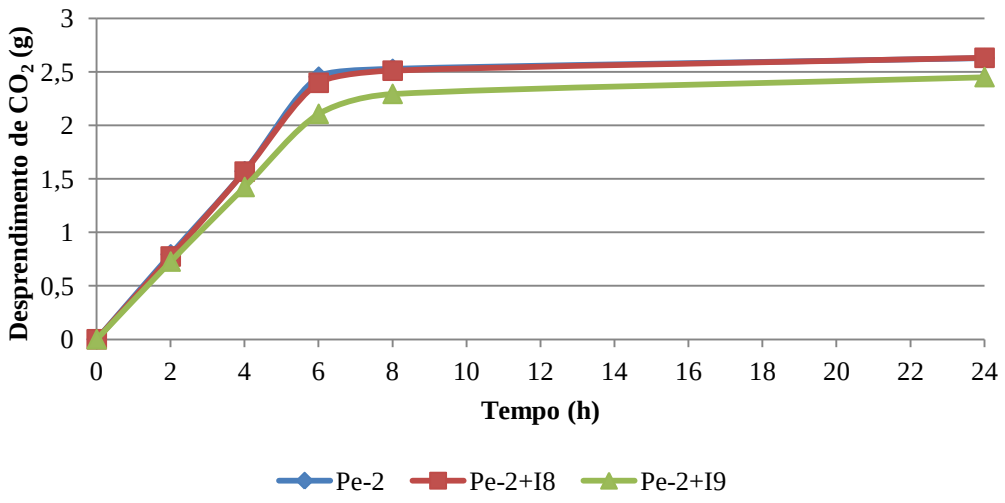

Figura 35 – Massa de CO_2 (em gramas) emitida pela levedura PE-2 sem contaminação, em conjunto com a bactéria I8 e em conjunto com a bactéria I9 durante o reciclo 3

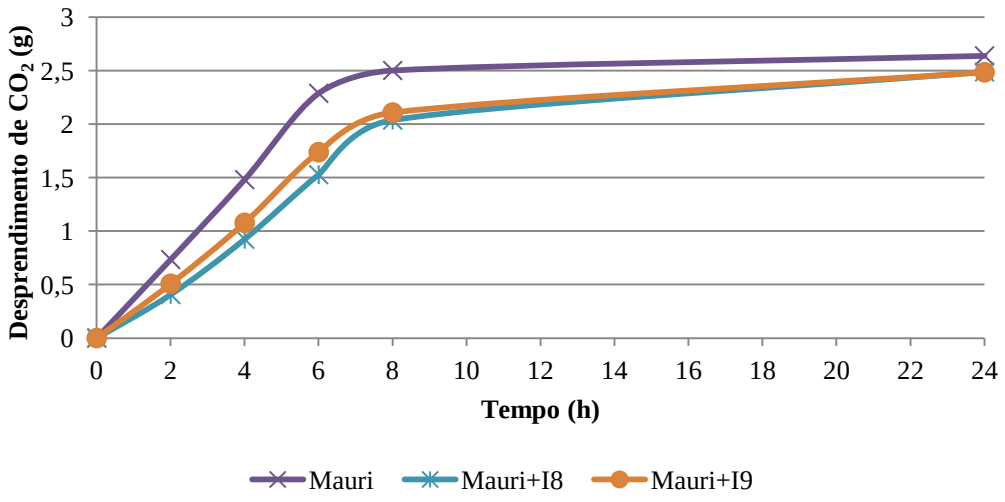

Figura 36 – Massa de CO_2 (em gramas) emitida pela levedura Mauri sem contaminação, em conjunto com a bactéria I8 e em conjunto com a bactéria I9 durante o reciclo 3

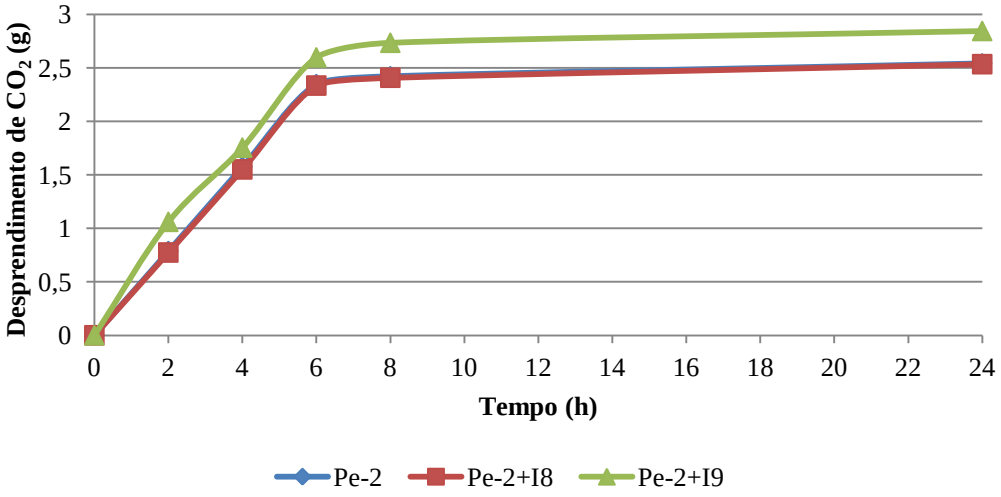

Figura 37 – Massa de CO_2 (em gramas) emitida pela levedura PE-2 sem contaminação, em conjunto com a bactéria I8 e em conjunto com a bactéria I9 durante o reciclo 4

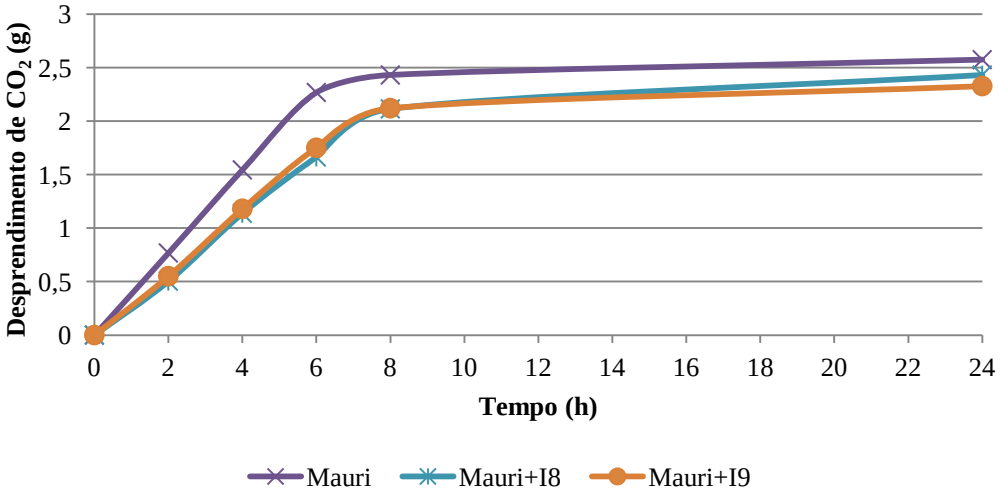

Figura 38 – Massa de CO_2 (em gramas) emitida pela levedura Mauri sem contaminação, em conjunto com a bactéria I8 e em conjunto com a bactéria I9 durante o reciclo 4

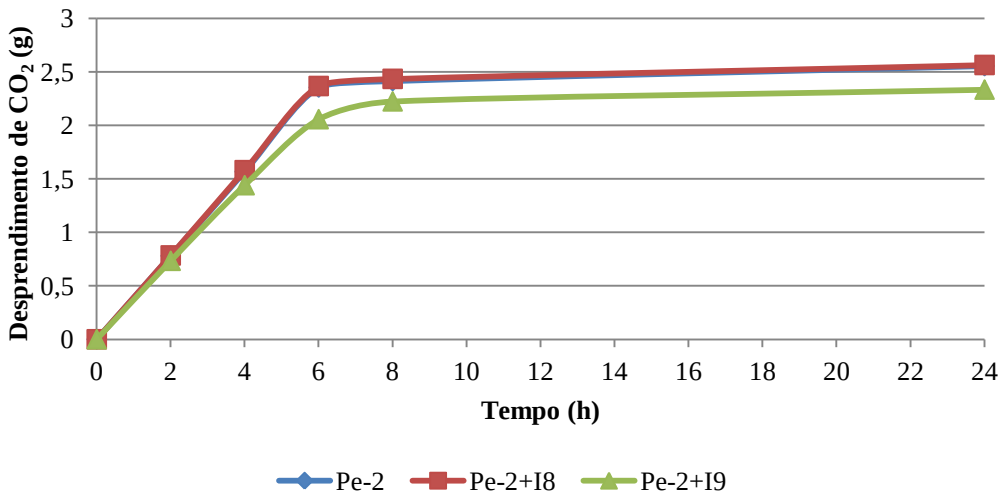

Figura 39 – Massa de CO_2 (em gramas) emitida pela levedura PE-2 sem contaminação, em conjunto com a bactéria I8 e em conjunto com a bactéria I9 durante o reciclo 5

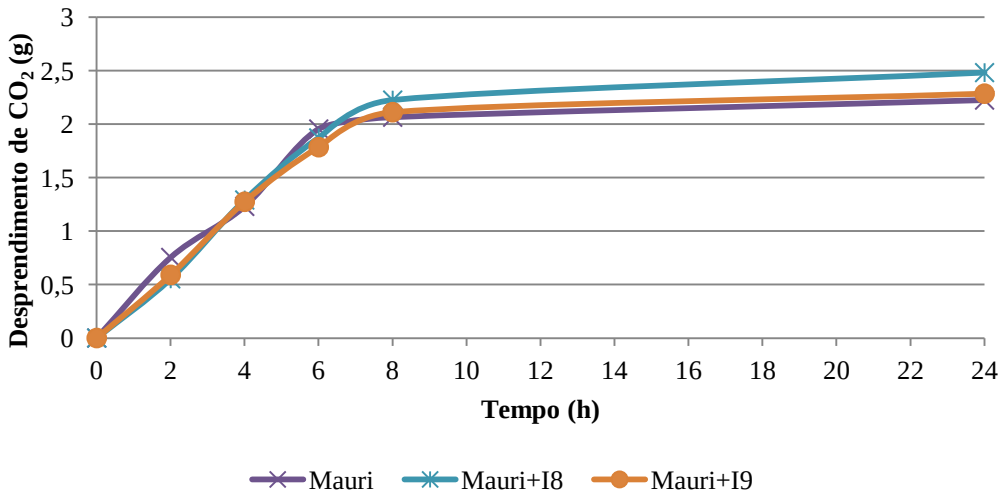

Figura 40 – Massa de CO_2 (em gramas) emitida pela levedura Mauri sem contaminação, em conjunto com a bactéria I8 e em conjunto com a bactéria I9 durante o reciclo 5

6 CONCLUSÕES

- Contaminações por bactérias láticas de qualquer tipo metabólico afetam diretamente a fermentação tanto de leveduras selecionadas quanto de leveduras de panificação. Esse fato reforça a necessidade de se manter níveis aceitáveis de contaminação no processo de produção do etanol.

- Leveduras selecionadas são menos afetadas pela contaminação quando comparadas às leveduras de panificação, assim, a levedura Mauri se mostrou menos resistente às pressões da contaminação em comparação à PE-2, apresentando piores parâmetros de fermentação, como: desenvolvimento mais expressivo das bactérias, maior produção de ácido lático por parte das homofermentativas; diminuição do rendimento alcoólico; diminuição da taxa de viabilidade da levedura; redução da velocidade de fermentação, dentre outros aspectos prejudicados. Esse fato evidencia a necessidade de se usar linhagens selecionadas para a produção de etanol.

- A levedura Mauri apresentou maior velocidade de hidrólise da sacarose e leve preferência pela glicose, o que disponibilizou maior quantidade de frutose no meio e contribuiu para o desenvolvimento massivo da bactéria I9 (heterofermentativa) em comparação com a I8.

- A bactéria I9 influenciou negativamente maior número de parâmetros da fermentação.

- Quando as condições da fermentação alcoólica industrial foram simuladas em laboratório ocorreu o favorecimento dos lactobacilos heterofermentativos. No entanto, quando levantamos os tipos metabólicos dentro das destilarias brasileiras encontramos a mesma proporção entre lactobacilos homo e heterofermentativos. Esse fato nos leva a concluir que no ambiente industrial as bactérias hetero não sejam favorecidas por metabolizarem preferencialmente a frutose ou serem mais resistentes ao etanol, visto que a suposta vantagem certamente é pequena frente a grande pressão imposta por esse complexo ambiente, em que estão sujeitas não só a competição por açúcares, mas também por outros nutrientes essenciais a todas as bactérias láticas.

- Todos os isolados homofermentativos estudados pertenciam à espécie *Lactobacillus plantarum*, enquanto todos os heterofermentativos pertenciam à espécie *Lactabacillus fermentum*, o que somado a outras observações descritas na literatura sugerem que exista uma divisão de tipos metabólicos por espécie.

- Como já era esperado, a produção de glicerol por parte das leveduras foi menor quando estiveram em conjunto com bactérias homofermentativa, mesmo em comparação ao controle.

REFERÊNCIAS

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

ALTHERTUM, 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**, Piracicaba, 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**. 1994. 251 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.

_____. **Respostas fisiológicas de duas linhagens de Saccharomyces cerevisiae frente ao potássio durante a fermentação alcoólica**. 2000. 118 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2000.

AMORIM, H.V. de. **Fermentação alcoólica**: ciência e tecnologia. Piracicaba: FERMENTEC, 2005. 1 v.

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

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., 1981, Rio de Janeiro. **Anais**... Piracicaba: STAB, 1981. p. 158-168.

ANDRÉ, L.; HEMMING, A.; ADLER, L. Osmoregulation in *Saccharomyces cerevisiae*: studies on the osmotic induction of glycerol production and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD+). **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 286, p. 13-17, 1991.

ANSELL, R.; GRANATH, K.; HOHMANN, S.; THEVELEIN, J.M.; ADLER, L. The two isoenzymes for yeast NAD+ - dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 16, n. 9, p. 2179-2187, 1997.

AUSUBEL, F.M., BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. Enzymatic Manipulation of DNA and RNA. In: AUSUBEL, F.M. (Ed.). **Short protocols in molecular biology:** a compendium of methods from current protocols in molecular biology. 5th ed. Michigan: John Wiley, 2002. Section 2.1, p.51-86.

BAI, F.W.; ANDERSON, W.A; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, New York, v.26, n.1, p.89-105, 2008.

BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G.; AMORIM, H.V. Fermentação alcoólica e alguns fatores que afetam o desempenho fermentativo. In: AMORIM, H.V. (Ed). **Processo de produção de álcool:** controle e monitoramento. 2. ed. Piracicaba: FERMENTEC; FEALQ; ESALQ, 1996. cap. 4, p. 38-85.

_____. The antibacterial action of succinic acid produced by yeast during fermentation. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 28, p. 77-88, 1997.

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

BEVAN, D.; BOND, J. Microorganism in field and mill: a preliminary survey. In: CONFERENCE OF THE QUEENSLAND SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 38., 1971, Cairns. **Proceedings…** Brisbane: Watson Ferguson, 1971. p. 137-143.

BORAM, F.; FAID, M.; LARPEND, J.P.; BRETON, A. Lactic of membranes and yeast associated with traditional Moroccan sour-dough bread fermentation. **Sciences des Aliments**, Paris, v. 13, n. 3, p. 509, 1993.

BRASIL. Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Culturas/cana-de-Açúcar**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>. Acesso em: 08 jan. 2013.

BULL, A.T.; SLATER, J.H. **Microbial interactions and community structure.** London: Academic Press, 1982. v. 1, 567 p.

CARR, F.J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002.

CHALLINOR, S.W.; ROSE, A.H. Interrelationships between a yeast and a bacterium when growing together in defined medium. **Nature,** London, v. 174, n. 4436, p. 877-878, 1954.

CHANG, I.S.; KIM, B.H.; SHIN, P.K.; LEE, W.K. Bacterial contamination and its effects on ethanol fermentation. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 5, p. 309–314, 1995.

CHERUBIN, R.A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 2003. 124 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola)– Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **3º Levantamento de cana-de-açúcar 2012/13.** Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 04 jan. 2013.

CONNOLLY, C. Bacterial contaminants and their effects on alcohol production. In: JACQUES, K.A.; LYONS, T.P.; KELSALL, D.R. (Ed.). **The alcohol textbook:** a reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries. 3rd ed. Nottingham: Nottingham University Press, 1999. p. 317-334.

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**, Oxford, v. 31, p. 125-128, 1989.

ESSIA-NGAND, T.J.E.; WOLNIEWICZ, E.; LETOURNEAU, F.; VILLA, P. Stimulation of lactobacilli during alcoholic fermentation: action of sucrose hydrolysis by yeast. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 14, p. 741-746, 1992.

EUSTACE, R.; THORNTON, R. J. Selective hybridization of wine yeast for higher yields of glycerol. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 33, n. 2 p. 112–117, 1987.

FAO. **Bioenergy**. 2005. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/meeting/009/j4313e.htm>. Acesso em: 07 dez. 2013.

FERGUGLIA, R.M.O. **Viabilidade celular de *Sacharomyces cerevisiae* em cultura mista com *Lactobacillus fermentum* envolvidos na floculação de leveduras**. 1997. 104 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 1997.

GALLO, C.R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica.** 1990. 338 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1990.

GALLO, C.R.; CANHOS, V.P. Contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica: revisão. **STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 9, p. 15-40, 1991.

GOMES, F.S. **Antagonismo entre leveduras e bactérias láticas na fermentação alcoólica**. 2009. 171 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

GUTIERREZ, L.E. Produção de glicerol por linhagens de *Saccharomyces* durante a fermentação alcoólica. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, Piracicaba, v. 48, p. 55-69, 1991.

HOFVENDAHL, K.; HAHN-HAGERDAL, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. **Enzyme and Microbial Technology**, Philadelphia, v. 26, p. 87-107, 2000.

HOUGH, J.S.; BRIGGS, D.E.; STEVENS, R.; YOUNG, T.W. Microbial contamination in breweries. In: Dennis Edward Briggs (Ed) **Malting and brewing science:** hopped wart and beer. London: Chapman and Hall, 1982. v. 2, p. 741–775.

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.

_____. Alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast primer. In: JACQUES, K.; LYONS, T.P.; KELSALL, D.R. (Ed.). **The alcohol textbook**. 3rd ed. Nottingham: Nottingham University Press, 1999. p. 49–87.

KANDLER, O. Carbohydrate metabolism in lact acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**. Amsterdam, v. 29, p. 209-224, 1983.

KANDLER, O.; WEISS, N. Lactobacillus. In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Willians and Wilkins, 1986. v. 2, p. 103-121.

KENNES, C.; VEIGA, M.C.; DUBOURGUIER, H.C.; TOUZEL, J.P.; ALBAGNAC, G.; NAVEAU, H.; NYNS, E.J. Trophic relationships between Saccharomyces cerevisiae and Lactobacillus plantarum and their metabolism of glucose and citrate. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.54n.4, p.1046-1051, 1991.

KING, S.W.; BEELMAN, R.B. Metabolic interaction between *Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc oenos* in a model grape juice/wine system. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 37, p. 53-69, 1986.

KUNATH, P.; KANDLER, O. Die Microbiologie des Kefirs. **Dutsche Milchwirtsch**, Leipzig, v. 32, p. 1908-1911, 1981.

LARSSON, N.K.; ANSELL, R.; ERIKSSON, P.; ADLER L. A gene encoding sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) complements an osmosensitive mutant of Saccharomyces cerevisiae. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 10, p. 1101-1111, 1993.

LUDWIG, K.M.; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS, D.F. de. Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, p. 63-68, 2001.

MAGER, W.H.; SIDERIUS, M. Novel insights into the osmotic stress response of yeast. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 2, n. 3, p. 251-257, 2002.

MAIORELLA, B.; BLANCH, H.W.; WILKE, C.R. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 25, p. 103-121, 1983.

MAKANJUOLA, D.B.; TYMON, A.; SPRINGHAM, D.G. Some effects of lactic acid on bacteria on laboratory-scale yeast fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 14, p. 350-357, 1992.

NARENDRANATH, N.V; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. Acetic acid and lactic acid inhibition of growth of *Saccharomyces cerevisiae* by different mechanisms. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, New York, v. 59, p. 187-194, 2001.

NARENDRANATH, N.V.; HYNES, S.H.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. Effects of lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentations. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, p. 4158–4163, 1997.

NASS, L.L.; PEREIRA, P.A.A.; ELLIS, D. Biofuels in Brazil: an overview. **Crop Science**, Madison, v. 47, p. 2228-2237, 2007.

NISSEN, T.L.; KIELLAND-BRANDT, M. C.; NIELSEN, J.; VILLADSEN, J. Optimization of ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering of the ammonium assimilation. **Metabolic Engineering**, New York, v. 2, n. 1, p. 69-77, 2000.

NISSEN, T.L.; SCHULZE, U.; NIELSEN, J.; VILLADSEN, J. Flux distributions in anaerobic, glucose-limited continuous cultivations of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, New York, v. 143, p. 203-218, 1997.

NOBRE, T.P. **Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com baterias contaminantes da fermentação alcoólica**. 2005. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 2005.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Evaluation of bacterial contamination in fed-batch alcoholic fermentation process. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 10, p. 697-699, 1994.

_____. Effect of nutritional factors on growth of *Lactobacillus fermentum* mixed with *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 28, 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, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 1996. 89 p.

OURA E. Reaction products of yeast fermentations. **Process Biochemistry,** London, v. 12, p. 644-651, 1977.

PAGLIARDINI, J.; HUBMANN, G.; BIDEAUX, C.; ALFENORE, S.; NEVOIGT, E.; GUILLOUET, S.E. Quantitative evaluation of yeast's requirement for glycerol formation in very high ethanol performance fed-batch process. **Microbial Cell Factories**, London, v. 9, n. 35, p. 1-13, 2010.

PAMPULHA, M.E.F.S. **Efeito do ácido acético na fermentação e nos parâmetros de crescimento em *Saccharomyces cerevisiae***. 1989. 222 p. Tese (Doutorado em Química Agrícola e Ambiental) - Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 1989.

PAMPULHA, M.E.F.S.; LOUREIRO-DIAS, M.C. Activity of glycolitic enzymes of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of acetic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 31, p. 547-550, 1989.

QADRI, L.E.N. Regulation of antimicrobial peptide production by autoinducer-mediated quorum sensing in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**. Dordrecht, v. 82, n. 1/4, p. 133-145, 2002

RADLER, F.; SCHUTZ, H. Glycerol production of various strains of *Saccharomyces.* **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 33, p. 36-40, 1982.

RAINBOW, C. Spoilage organisms in breweries. **Process Biochemistry**, London, v. 6, p. 15–17, 1971.

SACHS, I. Os biocombustíveis estão chegando à maturidade. **Democracia Viva**, Rio de Janeiro, n. 29, p. 26-31, 2005.

SCARDOVI, V. The genus *Bifidobacterium.* In: STARR, M.P.; STOLP, H.; TRFIPER, H.G.; BALOWS, A.; SCHLEGEL, H.G. (Ed.). **The prokaryotes**. Berlin: Springer, 1982. p. 1951-1961.

SELBY SMITH, J.; HILLIER, A.J.; LEE, G.J. The nature of the stimulation of the growth of *Streptococcus lactis* by yeast extract. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 42, p. 123-138, 1975.

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

THOMAS, K.C.; HYNES, S.H.; INGLEDEW, W.M. Effect of Lactobacilli on yeast growth, viability and batch and semi-continuous alcoholic fermentation of corn mash. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 90, n. 5, p. 819-828, 2001.

_____. Influence of medium buffering capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic and lactic acids. **Applyed Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 68, p. 1616–1623, 2002.

THOMSSOM, E.; LARSSON, C. The effect of lactic acid on anaerobic carbon or nitrogen limited chemostad cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology**, Berlin, v. 71, n. 4, p. 533-542, 2006.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Produção de etanol brasileiro é referência entre os programas de energias renováveis**. Disponível em: <http://www.unica.com.br/noticia/32545139920331483908/producao-de-etanol-brasileiro-e-referencia-entre-os-programas-de-energias-renovaveis/>. Acesso em: 13 jun. 2013.

VAN DIJKEN, J.P.; SCHEFFERS, W.A. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 32, p. 199-224, 1986.

WEYMARN, N.; HUJANEN, M.; LEISOLA, M. Production of D-manitol by heterofermentative lactic acid bacteria. **Process Biochemistry,** London, v. 37, p. 1207-1213, 2002.

YOKOYA, F. Problemas com contaminantes na fermentação alcoólica. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 9, n. 6, p. 38-39, 1991.

YOKOYA, F.; MANFIO, G.P.; VARIANE, S.F. **Curso de treinamento:** bactérias láticas na fermentação alcoólica. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “Andre Tosello”, 1997. 167 p.

ZAGO, A.E.; SILVA, L.F.F.; BERNARDINO, C.D.; AMORIM, H.V. Métodos analíticos para o controle da produção de álcool e açúcar. Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ, ESALQ, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. 1996. 194p.

ANEXOS

ANEXO A

Tabela 2 – Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (I8) e com bactéria heterofermentativa (I9), sobre a contaminação bacteriana observada ao microscópio óptico (10^8 cél x ml-1) ao longo de 5 reciclos fermentativos, empregando-se as leveduras PE-2 e Mauri. Os valores dos tratamentos em que não houve a inoculação de bactéria não estão expressos na tabela, pois permaneceram $<10^5$ ao longo dos reciclos, visto que também não foi observada contaminação acidental dessas amostras

Tratamento	**Contaminação (células/ml)X10^8**					
	Inicial	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
	3,51	0,73	1,28	0,67	0,84	0,59
Pe-2+I8	3,51	0,53	0,65	0,71	0,49	0,29
	3,51	0,67	1,25	0,84	0,66	0,47
Média	3,51	0,64	1,06	0,74	0,66	0,45
Desvio	0,00	0,10	0,36	0,09	0,17	0,15
	4,04	1,71	1,85	2,04	1,87	0,77
Pe-2+I9	4,04	1,62	1,96	1,98	1,72	1,00
	4,04	1,47	1,89	2,17	1,62	1,12
Média	4,04	1,60	1,90	2,06	1,74	0,96
Desvio	0,00	0,12	0,06	0,10	0,13	0,18
	3,02	1,93	2,20	1,51	2,02	1,21
Mauri+I8	3,02	1,90	2,42	1,56	1,80	1,04
	3,02	1,51	2,14	1,64	1,92	0,91
Média	3,02	1,78	2,25	1,57	1,91	1,05
Desvio	0,00	0,23	0,15	0,07	0,11	0,15
	5,10	1,60	2,75	2,52	2,70	1,47
Mauri+I9	5,10	1,64	2,60	2,28	2,64	1,71
	5,10	1,55	2,53	2,67	2,92	1,79
Média	5,10	1,60	2,63	2,49	2,75	1,66
Desvio	0,00	0,05	0,11	0,20	0,15	0,17

ANEXO B

Tabela 3 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (I8) e com bactéria heterofermentativa (I9), sobre a viabilidade da levedura (%) ao longo de 5 reciclos fermentativos, empregando-se as leveduras PE-2 e Mauri

Tratamento	**Viabilidade celular (%)**					
	inicial	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
Pe-2	96,70	95,40	98,10	97,50	94,10	97,20
	96,70	97,90	97,30	97,60	97,80	96,20
	96,70	95,40	95,30	98,70	96,10	95,10
Média	96,70	96,23	96,90	97,93	96,00	96,17
Desvio	0,00	1,44	1,44	0,67	1,85	1,05
Pe-2+I8	91,20	84,50	88,60	86,50	83,20	88,00
	91,20	81,00	88,40	85,80	89,00	82,40
	91,20	88,40	90,40	88,90	85,90	88,60
Média	91,20	84,63	89,13	87,07	86,03	86,33
Desvio	0,00	3,70	1,10	1,63	2,90	3,42
Pe-2+I9	94,80	86,70	89,40	93,30	91,80	90,00
	94,80	92,40	92,70	90,40	87,70	85,50
	94,80	94,80	89,40	91,20	90,50	87,20
Média	94,80	91,30	90,50	91,63	90,00	87,57
Desvio	0,00	4,16	1,91	1,50	2,10	2,27
Mauri	83,30	82,70	79,10	86,80	81,00	67,50
	83,30	79,60	81,80	78,50	82,70	71,80
	83,30	78,80	80,50	77,80	74,00	79,00
Média	83,30	80,37	80,47	81,03	79,23	72,77
Desvio	0,00	2,06	1,35	5,01	4,61	5,81
Mauri+I8	47,20	31,90	33,80	35,20	39,80	38,10
	47,20	23,50	42,60	43,30	39,20	48,60
	47,20	29,00	31,50	36,20	37,70	39,90
Média	47,20	28,13	35,97	38,23	38,90	42,20
Desvio	0,00	4,27	5,86	4,42	1,08	5,62
Mauri+I9	66,30	39,50	46,70	55,80	39,90	35,90
	66,30	36,80	44,10	48,90	51,40	42,90
	66,30	36,90	45,60	59,90	45,70	38,90
Média	66,30	37,73	45,47	54,87	45,67	39,23
Desvio	0,00	1,53	1,31	5,56	5,75	3,51

ANEXO C

Tabela 4 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (I8) e com bactéria heterofermentativa (I9), sobre a taxa de brotamento (%) ao longo de 5 reciclos fermentativos, empregando-se as leveduras PE-2 e Mauri

Tratamento	**Brotamento (%)**					
	inicial	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
Pe-2	2,30	49,00	27,60	14,80	24,30	31,70
	2,30	51,25	26,40	24,10	36,30	35,00
	2,30	41,70	45,50	14,40	34,70	33,00
Média	2,30	47,32	33,17	17,77	31,77	33,23
Desvio	0,00	4,99	10,70	5,49	6,52	1,66
Pe-2+I8	3,20	28,98	28,80	28,10	24,30	40,00
	3,20	24,50	26,70	19,20	25,70	42,20
	3,20	27,70	22,10	17,10	29,00	38,00
Média	3,20	27,06	25,87	21,47	26,33	40,07
Desvio	0,00	2,31	3,43	5,84	2,41	2,10
Pe-2+I9	5,50	7,20	8,30	13,20	22,00	36,30
	5,50	3,03	7,20	10,60	22,00	19,20
	5,50	8,15	6,60	11,40	14,40	20,50
Média	5,50	6,13	7,37	11,73	19,47	25,33
Desvio	0,00	2,72	0,86	1,33	4,39	9,52
Mauri	8,10	31,80	17,90	5,70	28,90	24,80
	8,10	32,50	12,30	4,30	23,90	24,10
	8,10	47,90	14,10	1,30	14,80	30,80
Média	8,10	37,40	14,77	3,77	22,53	26,57
Desvio	0,00	9,10	2,86	2,25	7,15	3,68
Mauri+I8	5,30	15,90	2,20	11,30	23,70	22,20
	5,30	33,30	9,30	12,80	19,20	5,90
	5,30	16,60	10,90	11,90	21,80	12,60
Média	5,30	21,93	7,47	12,00	21,57	17,40
Desvio	0,00	9,85	4,63	0,75	2,26	6,79
Mauri+I9	5,50	14,90	21,80	17,40	14,50	11,90
	5,50	26,50	25,00	12,30	28,90	14,30
	5,50	18,40	6,40	10,60	34,20	1,73
Média	5,50	19,93	17,73	13,43	25,87	13,10
Desvio	0,00	5,95	9,94	3,54	10,19	1,70

ANEXO D

Tabela 5 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (I8) e com bactéria heterofermentativa (I9), sobre o pH ao longo de 5 reciclos fermentativos, empregando-se as leveduras PE-2 e Mauri

Tratamento	**pH**				
	1	**2**	**3**	**4**	**5**
Pe-2	5,06	5,16	5,23	5,23	5,17
	5,05	5,16	5,24	5,22	5,17
	5,07	5,16	5,23	5,24	5,19
Média	5,06	5,16	5,23	5,23	5,18
Desvio	0,01	0	0,006	0,01	0,012
Pe-2+I8	4,28	4,55	4,58	4,61	4,62
	4,29	4,63	4,69	4,66	4,66
	4,27	4,59	4,64	4,64	4,64
Média	4,28	4,59	4,64	4,64	4,64
Desvio	0,01	0,04	0,055	0,025166	0,020
Pe-2+I9	4,35	4,60	4,50	4,47	4,46
	4,35	4,59	4,52	4,45	4,46
	4,33	4,52	4,45	4,44	4,46
Média	4,34	4,57	4,49	4,45	4,46
Desvio	0,012	0,044	0,036	0,015	0,000
Mauri	4,93	4,94	4,05	5,12	4,98
	4,90	4,93	4,03	5,13	4,98
	4,91	4,94	4,05	5,12	4,97
Média	4,91	4,94	4,04	5,12	4,98
Desvio	0,015	0,006	0,012	0,006	0,006
Mauri+I8	3,87	3,98	4,06	4,15	4,24
	3,88	4,00	4,09	4,18	4,26
	3,90	4,02	4,11	4,16	4,26
Média	3,88	4,00	4,09	4,16	4,25
Desvio	0,015	0,020	0,025	0,015	0,012
Mauri+I9	4,04	4,32	4,31	4,35	4,35
	4,04	4,31	4,27	4,37	4,34
	4,03	4,36	4,33	4,36	4,35
Média	4,04	4,33	4,30	4,36	4,35
Desvio	0,006	0,026	0,031	0,010	0,006

ANEXO E

Tabela 6 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (I8) e com bactéria heterofermentativa (I9), sobre a formação de lactato (g/L) ao longo de 5 reciclos fermentativos, empregando-se as leveduras PE-2 e Mauri

Tratamento	**Lactato (g/L)**				
	1	**2**	**3**	**4**	**5**
Pe-2	0,00	0,19	0,24	0,70	1,59
	0,00	0,26	0,31	0,65	1,53
	0,00	0,27	0,22	0,63	1,38
Média	0,00	0,24	0,26	0,66	1,50
Desvio	0,00	0,04	0,05	0,03	0,11
Pe+I8	7,43	5,78	5,49	5,56	5,15
	7,29	4,97	4,63	5,47	4,86
	7,38	5,47	4,90	5,43	5,00
Média	7,37	5,40	5,01	5,49	4,93
Desvio	0,07	0,41	0,44	0,07	0,15
Pe+I9	4,64	3,83	4,15	4,67	4,63
	4,69	4,04	4,28	4,70	4,52
	4,59	4,32	4,62	5,48	4,55
Média	4,64	4,06	4,35	4,95	4,57
Desvio	0,05	0,25	0,24	0,46	0,06
Mauri	0,27	0,31	0,27	0,71	2,50
	0,28	0,32	0,27	0,75	2,57
	0,27	0,29	0,24	0,72	2,39
Média	0,28	0,30	0,26	0,72	2,49
Desvio	0,00	0,02	0,02	0,02	0,09
Mauri+I8	15,28	12,35	12,26	9,56	8,36
	15,35	12,87	11,55	9,50	8,31
	15,02	11,87	11,32	9,98	8,43
Média	15,22	12,36	11,71	9,68	8,36
Desvio	0,17	0,50	0,49	0,26	0,06
Mauri+I9	8,31	5,22	5,59	4,97	5,29
	8,26	5,43	6,05	4,85	5,14
	8,25	4,67	5,41	4,85	4,96
Média	8,28	5,10	5,68	4,89	5,13
Desvio	0,03	0,39	0,33	0,07	0,16

ANEXO F

Tabela 7 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (I8) e com bactéria heterofermentativa (I9), sobre a formação de acetato (g/L) ao longo de 5 reciclos fermentativos, empregando-se as leveduras PE-2 e Mauri

Tratamento	**Acetato (g/L)**				
	1	**2**	**3**	**4**	**5**
Pe-2	0,51	0,50	0,40	0,44	0,39
	0,53	0,49		0,40	0,33
	0,53	0,47	0,39	0,42	0,31
Média	0,52	0,49	0,39	0,42	0,34
Desvio	0,01	0,02	0,01	0,02	0,04
Pe+I8	0,78	0,71	0,73	0,72	0,69
	0,79	0,72	0,69	0,81	0,78
	0,81	0,73	0,66	0,73	0,69
Média	0,79	0,72	0,69	0,72	0,73
Desvio	0,01	0,01	0,03	0,05	0,05
Pe+I9	2,46	1,86	1,94	2,19	2,18
	2,55	1,98	2,03	2,25	2,18
	2,48	2,11	2,23	2,61	2,20
Média	2,50	1,98	2,06	2,35	2,19
Desvio	0,05	0,13	0,15	0,22	0,01
Mauri	0,93	0,80	0,53	0,43	0,31
	0,91	0,78	0,45	0,44	0,36
	0,93	0,81	0,54	0,47	0,34
Média	0,93	0,80	0,51	0,45	0,34
Desvio	0,01	0,01	0,05	0,02	0,03
Mauri+I8	1,14	0,78	0,63	0,47	0,46
	1,17	0,83	0,54	0,44	0,49
	1,13	0,75	0,50	0,53	0,50
Média	1,15	0,79	0,56	0,48	0,48
Desvio	0,02	0,04	0,06	0,04	0,02
Mauri+I9	4,77	2,83	2,77	2,43	2,58
	4,79	2,99	3,05	2,38	2,53
	4,75	2,54	2,60	2,37	2,42
Média	4,77	2,79	2,80	2,39	2,51
Desvio	0,02	0,23	0,23	0,03	0,08

ANEXO G

Tabela 8 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (I8) e com bactéria heterofermentativa (I9), sobre a formação de succinato (g/L) ao longo de 5 reciclos fermentativos, empregando-se as leveduras PE-2 e Mauri

Tratamento	**Succinato (g/L)**				
	1	**2**	**3**	**4**	**5**
Pe-2	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
Média	0	0	0	0	0
Desvio	0	0	0	0	0
Pe+I8	0,482	0,538	0,336	0,417	0,737
	0,469	0,526	0,318	0,735	0,438
	0,459	0,525	0,302	0,378	0,392
Média	0,470	0,530	0,319	0,397	0,415
Desvio	0	0	0	0	0
Pe+I9	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
Média	0	0	0	0	0
Desvio	0	0	0	0	0
Mauri	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0,159
	0	0	0	0	0
Média	0	0	0	0	0,053
Desvio	0	0	0	0	0,092
Mauri+I8	0,456	0,356	0,370	0,357	0,276
	0,499	0,381	0,373	0,236	0,344
	0,446	0,357	0,383	0,404	0,323
Média	0,467	0,365	0,375	0,332	0,314
Desvio	0,029	0,014	0,007	0,087	0,035
Mauri+I9	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
Média	0	0	0	0	0
Desvio	0	0	0	0	0

ANEXO H

Tabela 9 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (I8) e com bactéria heterofermentativa (I9), sobre a formação de glicerol (g/L) ao longo de 5 reciclos fermentativos, empregando-se as leveduras PE-2 e Mauri

	Glicerol (g/L)				
Tratamento	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
	3,63	3,70	3,24	3,67	3,71
Pe-2	3,84	3,67	3,19	3,60	3,53
	3,81	3,53	3,12	3,53	3,36
Média	3,76	3,63	3,18	3,60	3,54
Desvio	0,11	0,09	0,06	0,07	0,17
	3,39	3,25	3,16	3,30	3,31
Pe+I8	3,16	3,12	2,97	3,56	3,29
	3,28	3,31	3,02	3,37	3,30
Média	3,28	3,23	3,05	3,33	3,30
Desvio	0,11	0,10	0,10	0,14	0,01
	4,29	4,07	3,80	4,00	3,85
Pe+I9	4,36	4,20	3,80	3,95	3,76
	4,27	4,15	3,81	4,45	3,77
Média	4,31	4,14	3,80	4,13	3,79
Desvio	0,05	0,06	0,01	0,27	0,05
	4,63	4,24	3,51	3,77	4,04
Mauri	4,62	4,13	3,51	3,88	4,06
	4,56	4,11	3,74	3,79	3,92
Média	4,60	4,16	3,59	3,81	4,01
Desvio	0,04	0,07	0,13	0,06	0,08
	4,00	4,30	4,11	3,56	3,39
Mauri+I8	4,00	4,43	4,07	3,73	3,33
	3,96	4,18	4,09	3,61	3,45
Média	3,98	4,30	4,09	3,64	3,39
Desvio	0,02	0,12	0,02	0,09	0,06
	4,15	4,67	4,14	3,89	3,86
Mauri+I9	4,20	4,60	4,13	4,03	3,65
	4,23	4,47	4,15	3,84	3,63
Média	4,19	4,58	4,14	3,92	3,71
Desvio	0,04	0,10	0,01	0,10	0,13

ANEXO I

Tabela 10 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (I8) e com bactéria heterofermentativa (I9), sobre a formação de manitol (g/L) ao longo de 5 reciclos fermentativos, empregando-se as leveduras PE-2 e Mauri

Tratamento	**Manitol (g/l)**				
	1	**2**	**3**	**4**	**5**
Pe-2	0,56	0,66	0,63	0,65	0,51
	0,60	0,65	0,63	0,57	0,49
	0,61	0,63	0,61	0,62	0,49
Média	0,59	0,65	0,62	0,61	0,50
Desvio	0,02	0,02	0,01	0,04	0,01
Pe+I8	0,37	0,42	0,04	0,09	0,36
	0,34	0,39	0,06	0,41	0,08
	0,35	0,45	0,05	0,09	0,08
Média	0,35	0,42	0,05	0,09	0,08
Desvio	0,01	0,03	0,01	0,18	0,16
Pe+I9	5,98	4,00	4,99	6,05	6,26
	5,99	4,20	5,25	6,22	6,12
	5,85	4,75	6,05	7,45	6,33
Média	5,94	4,32	5,43	6,57	6,24
Desvio	0,08	0,39	0,55	0,76	0,11
Mauri	0,60	0,62	0,56	0,61	0,39
	0,59	0,60	0,56	0,63	0,00
	0,59	0,58	0,66	0,61	0,00
Média	0,59	0,60	0,60	0,61	0,13
Desvio	0,00	0,02	0,06	0,01	0,23
Mauri+I8	0,00	0,00	0,57	0,00	0,00
	0,00	0,00	0,58	0,00	0,00
	0,00	0,00	0,57	0,00	0,00
Média	0,00	0,00	0,57	0,00	0,00
Desvio	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Mauri+I9	16,73	8,48	9,83	8,43	9,04
	16,51	8,99	11,06	8,12	8,89
	16,54	7,32	9,28	8,11	8,39
Média	16,59	8,26	10,06	8,22	8,77
Desvio	0,12	0,85	0,91	0,18	0,34

ANXO J

Tabela 11 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (I8) e com bactéria heterofermentativa (I9), sobre a produção de etanol (%) ao longo de 5 reciclos fermentativos, empregando-se as leveduras PE-2 e Mauri

Tratamento	**Etanol (%)**				
	1	**2**	**3**	**4**	**5**
Pe-2	8,45	9,00	9,15	9,10	9,05
	8,45	8,95	9,15	9,10	9,10
	8,45	9,00	9,20	9,15	9,15
Média	8,45	8,98	9,17	9,12	9,10
Desvio	0,00	0,03	0,03	0,03	0,05
Pe-2+I8	8,20	8,75	9,00	8,95	8,95
	8,15	8,75	9,00	8,95	8,85
	8,15	8,80	9,00	8,95	8,95
Média	8,17	8,77	9,00	8,95	8,92
Desvio	0,03	0,03	0,00	0,00	0,06
Pe-2+I9	7,50	8,40	8,40	8,35	8,35
	7,50	8,50	8,45	8,25	8,20
	7,60	8,30	8,30	8,25	8,25
Média	7,53	8,40	8,38	8,28	8,27
Desvio	0,06	0,10	0,08	0,06	0,08
Mauri	8,40	8,90	9,15	9,15	9,05
	8,40	8,85	9,00	9,05	9,00
	8,40	8,90	9,10	9,10	9,05
Média	8,40	8,88	9,08	9,10	9,03
Desvio	0,00	0,03	0,08	0,05	0,03
Mauri+I8	7,55	7,80	8,30	8,50	8,65
	7,50	7,80	8,35	8,60	8,75
	7,45	7,75	8,40	8,60	8,75
Média	7,50	7,78	8,35	8,57	8,72
Desvio	0,05	0,03	0,05	0,06	0,06
Mauri+I9	6,25	7,85	7,85	8,05	8,10
	6,20	7,75	7,75	8,05	8,00
	6,30	7,95	7,95	8,00	8,05
Média	6,25	7,85	7,85	8,03	8,05
Desvio	0,05	0,10	0,10	0,03	0,05

ANEXO K

Tabela 12 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (I8) e com bactéria heterofermentativa (I9), sobre a sobre o rendimento fermentativo (%) ao longo de 5 reciclos fermentativos, empregando-se as leveduras PE-2 e Mauri

Tratamento	**Rendimento fermentativo (%)**				
	Ciclo 1	**Ciclo 2**	**Ciclo 3**	**Ciclo 4**	**Ciclo 5**
Pe-2	81,40	86,08	88,24	87,35	87,10
	81,79	86,11	88,62	87,92	87,40
	81,63	86,92	89,45	88,49	88,78
Média	81,61	86,37	88,77	87,92	87,76
Desvio	0,20	0,48	0,62	0,57	0,89
Pe-2+I8	79,02	84,71	87,31	86,23	86,72
	81,60	85,13	87,42	86,62	86,23
	79,74	85,54	87,18	86,62	86,44
Média	80,12	85,13	87,30	86,49	86,46
Desvio	1,33	0,42	0,12	0,22	0,24
Pe-2+I9	71,76	82,36	81,93	79,97	83,67
	73,32	83,34	82,63	80,50	77,64
	73,41	81,31	80,70	80,62	80,57
Média	72,83	82,34	81,75	80,36	80,63
Desvio	0,93	1,02	0,98	0,35	3,02
Mauri	80,66	86,82	88,58	87,51	84,59
	80,13	86,54	87,00	86,28	85,12
	81,68	86,95	87,48	86,97	83,28
Média	80,82	86,77	87,68	86,92	84,33
Desvio	0,79	0,21	0,81	0,62	0,95
Mauri+I8	72,46	75,83	79,89	81,99	82,20
	72,09	74,67	78,93	83,07	83,36
	73,17	73,47	82,10	83,18	83,84
Média	72,57	74,65	80,31	82,75	83,13
Desvio	0,55	1,18	1,62	0,66	0,84
Mauri+I9	59,79	76,19	75,79	78,45	79,02
	59,55	76,05	74,28	78,22	78,08
	61,94	77,56	76,63	77,38	78,53
Média	60,43	76,60	75,57	78,02	78,55
Desvio	1,32	0,83	1,19	0,56	0,47

ANEXO L

Tabela 13 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (I8) e com bactéria heterofermentativa (I9), sobre o crescimento do fermento (g) ao longo de 5 reciclos fermentativos, empregando-se as leveduras PE-2 e Mauri

Tratamento	**Biomassa (g)**					
	inicial	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
Pe-2	2,94	3,58	4,06	4,32	4,66	5,00
	2,94	3,61	4,15	4,41	4,75	5,09
	2,94	3,56	4,08	4,33	4,63	4,94
Média	2,94	3,58	4,10	4,35	4,68	5,01
Desvio	0,00	0,03	0,05	0,05	0,06	0,08
Pe-2+I8	2,94	3,51	3,85	4,12	4,47	4,73
	2,94	3,76	4,01	4,27	4,61	4,87
	2,94	3,52	3,85	4,20	4,41	4,73
Média	2,94	3,60	3,90	4,20	4,50	4,78
Desvio	0,00	0,14	0,09	0,08	0,10	0,08
Pe-2+I9	2,94	3,23	3,31	3,42	3,60	3,77
	2,94	3,25	3,32	3,42	3,58	3,73
	2,94	3,25	3,33	3,43	3,55	3,70
Média	2,94	3,24	3,32	3,42	3,58	3,73
Desvio	0,00	0,01	0,01	0,01	0,03	0,04
Mauri	2,94	3,92	4,10	4,32	5,11	5,68
	2,94	3,94	4,12	4,48	5,24	5,68
	2,94	4,04	4,13	4,46	5,22	5,83
Média	2,94	3,97	4,12	4,42	5,19	5,73
Desvio	0,00	0,06	0,02	0,09	0,07	0,09
Mauri+I8	2,94	3,07	3,46	3,72	4,30	4,57
	2,94	3,08	3,44	3,83	4,39	4,67
	2,94	3,12	3,53	3,97	4,41	4,76
Média	2,94	3,09	3,48	3,84	4,37	4,67
Desvio	0,00	0,03	0,05	0,13	0,06	0,10
Mauri+I9	2,94	3,16	3,35	3,53	3,75	3,96
	2,94	3,19	3,36	3,45	3,75	3,92
	2,94	3,19	3,38	3,66	3,88	4,03
Média	2,94	3,18	3,36	3,55	3,79	3,97
Desvio	0,00	0,02	0,02	0,11	0,08	0,06

ANEXO M

Tabela 14 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (I8) e com bactéria heterofermentativa (I9), sobre a velocidade de fermentação (g de CO_2) ao longo de 5 reciclos fermentativos, empregando-se as leveduras PE-2 e Mauri

Tratamento	**Desprendimento de CO_2**					
	Ciclo	**2h**	**4h**	**6h**	**8h**	**21-23h**
Pe-2	**1**	*	*	*	*	2,34
	2	0,75	1,55	2,33	2,40	2,60
	3	0,79	1,57	2,45	2,53	2,63
	4	0,79	1,57	2,35	2,42	2,54
	5	0,78	1,57	2,35	2,41	2,55
Pe-2+I8	**1**	*	*	*	*	2,39
	2	0,73	1,52	2,29	2,36	2,51
	3	0,77	1,57	2,40	2,51	2,63
	4	0,77	1,55	2,33	2,41	2,53
	5	0,78	1,58	2,37	2,43	2,56
Pe-2+I9	**1**	*	*	*	*	2,34
	2	0,68	1,41	2,10	2,29	2,44
	3	0,73	1,42	2,11	2,29	2,45
	4	1,06	1,75	2,60	2,73	2,84
	5	0,73	1,44	2,06	2,22	2,33
Mauri	**1**	*	*	*	*	2,45
	2	0,70	1,47	2,19	2,37	2,55
	3	0,73	1,48	2,29	2,50	2,64
	4	0,77	1,54	2,27	2,43	2,57
	5	0,75	1,23	1,95	2,06	2,22
Mauri+I8	**1**	*	*	*	*	2,27
	2	0,16	0,54	0,99	1,64	2,18
	3	0,41	0,92	1,53	2,04	2,49
	4	0,50	1,14	1,66	2,11	2,43
	5	0,55	1,29	1,87	2,22	2,48
Mauri+I9	**1**	*	*	*	*	2,04
	2	0,26	0,76	1,32	1,80	2,31
	3	0,51	1,08	1,74	2,11	2,48
	4	0,55	1,18	1,75	2,12	2,33
	5	0,59	1,27	1,78	2,11	2,28