

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

**Antagonismo entre leveduras e bactérias lácticas na fermentação  
alcoólica**

**Fernanda Sgarbosa Gomes**

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

**PIRACICABA  
2009**

**Fernanda Sgarbosa Gomes**  
**Bióloga**

**Antagonismo entre leveduras e bactérias lácticas na fermentação alcoólica**

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

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

Piracicaba  
2009

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Gomes, Fernanda Sgarbosa

Antagonismo entre leveduras e bactérias lácticas na fermentação alcoólica / Fernanda Sgarbosa Gomes. - - Piracicaba, 2009.

171 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2009.  
Bibliografia.

1. Antagonistas 2. Bactérias lácticas - Contaminação 3. Etanol 4. Fermentação alcoólica  
5. Lactobacillus 6. Leveduras I. Título

CDD 661.82  
G633a

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

*A DEUS...*

**Agradeço.**

*Aos meus irmãos Flávia e Eduardo, pelo carinho, companheirismo e incentivo de sempre...*

**Ofereço.**

*Aos meus pais Ruy e Rosana, pela oportunidade de estudo, pela confiança depositada em mim e pelos ensinamentos e valores transmitidos durante toda minha vida...*

**Dedico.**



## AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Basso pela excelente oportunidade de realização deste trabalho, pela orientação, confiança e pelo exemplo profissional.
- Ao Prof. Dr. Cláudio Rosa Gallo pela colaboração desde meu ingresso no curso de pós-graduação.
- Ao amigo e companheiro de laboratório Thiago Ollita Basso por toda a ajuda, dedicação e por sempre compartilhar seu conhecimento e experiência.
- À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pela oportunidade de realização deste curso;
- À FERMENTEC S/C Ltda, Assistência Técnica em Fermentação Alcoólica, pelo apoio financeiro às pesquisas;
- Ao técnico e grande amigo Luís Lucatti (Cometa) pelo incentivo e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.
- Aos amigos e companheiros de laboratório Flavia Salvatto, Renata Cristofoleti, Luís Henrique Angeloni e Mayara Quatrini pela amizade e colaboração nos experimentos.
- Aos queridos amigos que fiz durante esses anos vividos em Piracicaba, em especial à Luana Salinet, Luciana Biscaro (Dieta), Elisa Lucatti, Gabriella Rezende, Nara Bortolazo e aos integrantes de República Copacabana por todos os momentos de alegria, diversão e companheirismo.
- À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste sonho.



*A alegria que se tem em pensar e aprender  
faz-nos pensar e aprender  
ainda mais.*

**Aristóteles**





## SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE FIGURAS .....	15
LISTA DE TABELAS .....	27
1 INTRODUÇÃO.....	33
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	35
2.1 Os problemas da contaminação bacteriana .....	36
2.2 O controle da contaminação .....	37
2.3 Interações entre leveduras e bactérias na fermentação.....	40
2.4 As bactérias lácticas .....	43
2.5 Objetivos.....	46
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	49
3.1 Microrganismos .....	49
3.2 Cultivo dos microrganismos .....	50
3.3 Análises químicas e microbiológicas .....	51
3.3.1 Análises microbiológicas .....	51
3.3.2 Análises de açúcares, glicerol e manitol mediante HPAEC .....	53
3.3.3 Análises de ácidos orgânicos e etanol mediante HPLC.....	53
3.3.4 Análises de pH, biomassa, velocidade da fermentação e trealose .....	54
3.3.5 Análises de etanol e cálculo da eficiência fermentativa .....	54
3.4 Análise estatística .....	55
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	57
4.1 Experimento I (condições de laboratório) .....	57
4.1.1 Experimento principal.....	57
4.1.2 Experimentos suporte .....	66
4.2 Experimento II (simulando condições industriais) .....	73
5 CONCLUSÕES.....	117
REFERÊNCIAS.....	119
ANEXO .....	133



## RESUMO

### **Antagonismo entre leveduras e bactérias lácticas na fermentação alcoólica**

Com o objetivo de avaliar o antagonismo entre leveduras e bactérias contaminantes do processo de produção de etanol com metabolismos distintos (homo e heterofermentativo) em diferentes condições, foi analisado o desempenho fermentativo de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* empregadas na fermentação industrial (BG-1, CAT-1, PE-2 e Fleischmann) em co-cultivo com linhagens de *Lactobacillus* com diferentes metabolismos, sendo uma delas homofermentativa (*L. plantarum* - FT025B) e duas linhagens heterofermentativas (*L. fermentum* - FT230B e *L. fructosus* - FT432B). Foram avaliados o crescimento dos dois grupos de microrganismos com relação à densidade de células no meio e sua viabilidade e também através de suas atividades metabólicas, acessadas pela formação de metabólitos específicos (ácidos láctico, succínico e acético, manitol e etanol). Os experimentos foram conduzidos em duas modalidades: I) em condições de laboratório, inoculando-se uma linhagem bacteriana com uma única linhagem de levedura na mesma proporção em meio sintético e sendo incubadas a 32°C por 24h e II) simulando as condições industriais de fermentação, com alimentação utilizando-se mosto misto durante 5 ciclos fermentativos. No Experimento I, a viabilidade da linhagem FT025B mostrou-se reduzida em relação à linhagem FT230. Observou-se também que no meio contendo a bactéria FT025B a viabilidade das 4 linhagens de levedura foi menor do que no meio controle e no meio inoculado com a bactéria FT230B. Os níveis de ácido láctico foram mais elevados na presença da bactéria FT025B, enquanto os teores de ácido acético e de glicerol foram maiores nos meios com a linhagem FT230B. A produção de etanol foi reduzida na presença de ambas as bactérias. No Experimento II a presença das bactérias praticamente não afetou a viabilidade das leveduras industriais durante os ciclos. No entanto, ao contrário do que foi observado no Experimento I, as linhagens bacterianas heterofermentativas apresentaram melhor crescimento e maior viabilidade em co-cultivo com as leveduras do que a homofermentativa. Também na presença de ambas as linhagens heterofermentativas observou-se uma significativa redução no rendimento alcoólico. A produção de lactato por tais linhagens foi muito próxima e em alguns ciclos até maior que a produção pela linhagem homofermentativa. No entanto, como no Experimento I, nos tratamentos com a bactéria FT025B a produção de glicerol foi menor até mesmo que no tratamento controle, tratando-se do primeiro registro de menor produção de glicerol por leveduras que se encontram na presença de contaminação bacteriana. Sugere-se que o ácido láctico e o acético, juntamente com o etanol, podem ter agido sinergisticamente no metabolismo e crescimento das leveduras, resultando principalmente em uma diminuição do rendimento alcoólico. É também provável que as linhagens bacterianas heterofermentativas foram capazes de resistir melhor aos elevados teores de etanol excretados pelas leveduras e encontrados no processo industrial, uma vez que também são capazes de produzir tal composto.

Palavras chave: Fermentação alcoólica; *Saccharomyces cerevisiae*; Contaminação bacteriana; *Lactobacillus*; Metabolismo homo- e heterofermentativo.



## ABSTRACT

### **Antagonism between yeasts and lactic acid bacteria in alcoholic fermentation**

This study aimed to evaluate the antagonism between yeasts and contaminating bacteria of the ethanol production process with different metabolisms (homo- and heterofermentative) in different conditions. Thus, the fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* strains used in industrial fermentation (BG-1, CAT-1, PE-2 and Fleischmann) was analyzed in co-cultivation with *Lactobacillus* strains with different metabolisms, one of them homofermentative (*L. plantarum* - FT025B) and two heterofermentatives strains (*L. fermentum* - FT230B and *L. fructosus* - FT432B). It was evaluated the growth of two microorganisms groups with respect to the cells density in the medium and their viability and also through their metabolic activities, accessed by specific metabolites production (lactic, acetic and succinic acid, mannitol and ethanol). The experiments were conducted in two ways: I) in laboratory conditions, inoculating a bacterial strain with a single yeast strain in the same synthetic medium incubated at 32°C for 24h and II) simulating the industrial fermentation conditions, with fed by using mixed must for 5 fermentative recycle. In Experiment I, the viability of FT025B strain proved to be small in relation to FT230 strain. It was also observed that in the medium containing the bacteria FT025B the viability of the 4 yeast strains was lower than the control and the treatment with FT230B strain. The levels of lactic acid were higher in the presence of bacteria FT025B, while the levels of acetic acid and glycerol were higher in treatments with FT230B strain. The production of ethanol was reduced in the presence of both bacteria. In Experiment II, the presence of bacteria did not affect the viability of industrial yeasts during recycling. However, contrary to what was observed in Experiment I, the heterofermentatives bacterial strains showed higher growth and higher viability in co-cultivation with the yeasts than homofermentative. Also in the presence of both strains heterofermentatives there was a significant reduction in the alcoholic yield. The lactate production by these strains was very close and, in some cycles, higher than the production by the homofermentative strain. However, as in Experiment I, in the treatments with FT025B strain the production of glycerol was lower even than in the control treatment, this is the first record of lower production of glycerol by yeasts that are in the presence of bacterial contamination. It is suggested that the lactic acid and acetic acid along with ethanol, may have acted synergistically in yeasts metabolism and growth, resulting in reduced alcoholic yields. It is also likely that the bacterial strains heterofermentatives were better able to resist the high ethanol levels excreted by yeasts and found in industrial process, since they are also able to produce this compound.

**Keywords:** Alcoholic fermentation; *Saccharomyces cerevisiae*; Bacterial contamination, *Lactobacillus*; Homo- and heterofermentative metabolisms.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação esquemática simplificada das vias do metabolismo homofermentativo e heterofermentativo em bactérias lácticas do gênero *Lactobacillus* (Adaptado de Kandler, 1983).....44
- Figura 2 - Microplaqueamento em Gotas contendo 3 repetições de cada diluição seriada para uma única amostra ( $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$ ).....53
- Figura 3 - Concentração (mM) de ácido succínico no meio de crescimento após 24 horas de cultivo conjunto entre as leveduras industriais (BG-1, CAT-1 e PE-2) e a de panificação (Fleischmann) com a bactéria FT025B.....59
- Figura 4 - Concentração (mM) de ácido succínico no meio de crescimento após 24 horas de cultivo conjunto entre as leveduras industriais (BG-1, CAT-1 e PE-2) e a de panificação (Fleischmann) com a bactéria FT230B.....60
- Figura 5 - Concentração (mM) de ácido láctico no meio de crescimento após 24 horas de cultivo conjunto entre as leveduras industriais (BG-1, CAT-1 e PE-2) e a de panificação (Fleischmann) com a bactéria FT025B.....61
- Figura 6 - Concentração (mM) de ácido láctico no meio de crescimento após 24 horas de cultivo conjunto entre as leveduras industriais (BG-1, CAT-1 e PE-2) e a de panificação (Fleischmann) com a bactéria FT230B.....61
- Figura 7 - Concentração (mM) de ácido acético no meio de crescimento após 24 horas de cultivo conjunto entre as leveduras industriais (BG-1, CAT-1 e PE-2) e a de panificação (Fleischmann) com a bactéria FT025B.....63
- Figura 8 - Concentração (mM) de ácido acético no meio de crescimento após 24 horas de cultivo conjunto entre as leveduras industriais (BG-1, CAT-1 e PE-2) e a de panificação (Fleischmann) com a bactéria FT230B.....63
- Figura 9 - Concentração (mM) de glicerol no meio de crescimento após 24 horas de cultivo conjunto entre as leveduras industriais (BG-1, CAT-1 e PE-2) e a de panificação (Fleischmann) com a bactéria FT025B.....64
- Figura 10 - Concentração (mM) de glicerol no meio de crescimento após 24 horas de cultivo conjunto entre as leveduras industriais (BG-1, CAT-1 e PE-2) e a de panificação (Fleischmann) com a bactéria FT230B.....65



- Figura 11 - Concentração (mM) de etanol no meio de crescimento após 24 horas de cultivo conjunto entre as leveduras industriais (BG-1, CAT-1 e PE-2) e a de panificação (Fleischmann) com a bactéria FT025B ..... 66
- Figura 12 - Concentração (mM) de etanol no meio de crescimento após 24 horas de cultivo conjunto entre as leveduras industriais (BG-1, CAT-1 e PE-2) e a de panificação (Fleischmann) com a bactéria FT230B ..... 66
- Figura 13 - Concentrações (mM) de manitol, succinato, glicerol, lactato e acetato no meio de crescimento após 24 horas de cultivo conjunto entre a levedura BG-1 e as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230) ..... 69
- Figura 14 - Concentrações (mM) de manitol, succinato, glicerol, lactato e acetato no meio de crescimento após 24 horas de cultivo conjunto entre a levedura CAT-1 e as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230) ..... 70
- Figura 15 - Concentrações (mM) de manitol, succinato, glicerol, lactato e acetato no meio de crescimento após 24 horas de cultivo conjunto entre a levedura PE-2 e as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230) ..... 70
- Figura 16 - Concentrações (mM) de manitol, succinato, glicerol, lactato e acetato no meio de crescimento após 24 horas de cultivo conjunto entre a levedura de panificação Fleischmann e as bactérias lácticas ..... 71
- Figura 17 - Concentrações (mM) de etanol no meio de crescimento após 24 horas de cultivo conjunto entre a levedura BG-1 e as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230)..... 71
- Figura 18 - Concentrações (mM) de etanol no meio de crescimento após 24 horas de cultivo conjunto entre a levedura CAT-1 e as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230)..... 72
- Figura 19 - Concentrações (mM) de etanol no meio de crescimento após 24 horas de cultivo conjunto entre a levedura PE-2 e as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230)..... 72
- Figura 20 - Concentrações (mM) de etanol no meio de crescimento após 24 horas de cultivo conjunto entre a levedura de panificação Fleischmann e as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230)..... 73

- Figura 21 - Valores percentuais de viabilidade para a levedura CAT-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo.....75
- Figura 22 - Valores percentuais de viabilidade para a levedura BG-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de significância, dentro de cada ciclo .....75
- Figura 23 - Valores percentuais de viabilidade para a levedura PE-2 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de significância, dentro de cada ciclo .....76
- Figura 24 - Valores percentuais de viabilidade para a levedura de panificação Fleischmann em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo .....76
- Figura 25 - Valores percentuais de brotamento para a levedura CAT-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo.....77
- Figura 26 - Valores percentuais de brotamento para a levedura BG-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo .....77

- Figura 27 - Valores percentuais de brotamento para a levedura PE-2 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo..... 78
- Figura 28 - Valores percentuais de brotamento para a levedura de panificação Fleischmann em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo ..... 78
- Figura 29 - População de células bacterianas ( $\log \text{ células.mL}^{-1}$  de vinho) para a levedura CAT-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo..... 80
- Figura 30 - População de células bacterianas ( $\log \text{ células.mL}^{-1}$  de vinho) para a levedura BG-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo ..... 80
- Figura 31 - População de células bacterianas ( $\log \text{ células.mL}^{-1}$  de vinho) para a levedura PE-2 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo ..... 81
- Figura 32 - População de células bacterianas ( $\log \text{ células.mL}^{-1}$  de vinho) para a levedura de panificação Fleischmann em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo..... 81

- Figura 33 - População de células bacterianas (UFC.mL<sup>-1</sup>) para a levedura CAT-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230) do segundo ao quinto ciclo fermentativo. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo 82
- Figura 34 - População de células bacterianas (UFC.mL<sup>-1</sup>) para a levedura BG-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo .....82
- Figura 35 - População de células bacterianas (UFC.mL<sup>-1</sup>) para a levedura PE-2 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo .....83
- Figura 36 - População de células bacterianas (UFC.mL<sup>-1</sup>) para a levedura de panificação Fleischmann em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo .....83
- Figura 37 - Valores percentuais de viabilidade das bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230) em cultivo conjunto com a levedura CAT-1 durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo .....84
- Figura 38 - Valores percentuais de viabilidade das bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) em cultivo conjunto com a levedura BG-1 durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo 85
- Figura 39 - Valores percentuais de viabilidade das bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) em cultivo conjunto com a levedura PE-2 durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo 85

- Figura 40 - Valores percentuais de viabilidade das bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) em cultivo conjunto com a levedura de panificação Fleischmann durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo ..... 86
- Figura 41 - Valores (em gramas) de biomassa para a levedura CAT-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo ..... 87
- Figura 42 - Valores (em gramas) de biomassa para a levedura BG-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo 87
- Figura 43 - Valores (em gramas) de biomassa para a levedura PE-2 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo 88
- Figura 44 - Valores (em gramas) de biomassa para a levedura de panificação Fleischmann em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo ..... 88
- Figura 45 - Rendimento alcoólico (%) da levedura CAT-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo ..... 90
- Figura 46 - Rendimento alcoólico (%) da levedura BG-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo ..... 90

- Figura 47 - Rendimento alcoólico (%) da levedura PE-2 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo.....91
- Figura 48 - Rendimento alcoólico (%) da levedura de panificação Fleischmann em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo .....91
- Figura 49 - Teores (%) de açúcares residuais no vinho para a levedura CAT-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo92
- Figura 50 - Teores (%) de açúcares residuais no vinho para a levedura BG-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo .....93
- Figura 51 - Teores (%) de açúcares residuais no vinho para a levedura PE-2 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo .....93
- Figura 52 - Teores (%) de açúcares residuais no vinho para a levedura de panificação Fleischmann em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo .....94

- Figura 53 - Concentrações (mM) de succinato no vinho para a levedura CAT-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo 95
- Figura 54 - Concentrações (mM) de succinato no vinho para a levedura BG-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo..... 95
- Figura 55 - Concentrações (mM) de succinato no vinho para a levedura PE-2 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo..... 96
- Figura 56 - Concentrações (mM) de succinato no vinho para a levedura de panificação Fleischmann em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo ..... 96
- Figura 57 - Concentrações (mM) de lactato no vinho para a levedura CAT-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo ..... 97
- Figura 58 - Concentrações (mM) de lactato no vinho para a levedura BG-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo..... 98

- Figura 59 - Concentrações (mM) de lactato no vinho para a levedura PE-2 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo .....98
- Figura 60 - Concentrações (mM) de lactato no vinho para a levedura de panificação Fleischmann em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo .....99
- Figura 61 - Concentrações (mM) de acetato no vinho para a levedura CAT-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo..... 100
- Figura 62 - Concentrações (mM) de acetato no vinho para a levedura BG-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo ..... 100
- Figura 63 - Concentrações (mM) de acetato no vinho para a levedura PE-2 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo ..... 101
- Figura 64 - Concentrações (mM) de acetato no vinho para a levedura de panificação Fleischmann em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo ..... 101



- Figura 65 - Valores de pH dos vinhos para a levedura CAT-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo..... 104
- Figura 66 - Valores de pH dos vinhos para a levedura BG-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo ..... 104
- Figura 67 - Valores de pH dos vinhos para a levedura PE-2 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo ..... 105
- Figura 68 - Valores de pH dos vinhos para a levedura de panificação Fleischmann em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo..... 105
- Figura 69 - Concentrações (%) de glicerol no vinho para a levedura CAT-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo ..... 106
- Figura 70 - Concentrações (%) de glicerol no vinho para a levedura BG-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo..... 107
- Figura 71 - Concentrações (%) de glicerol no vinho para a levedura PE-2 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo..... 107

- Figura 72 - Concentrações (%) de glicerol no vinho para a levedura de panificação Fleischmann em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo ..... 108
- Figura 73 - Concentrações (%) de manitol no vinho para a levedura CAT-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo..... 109
- Figura 74 - Concentrações (%) de manitol no vinho para a levedura BG-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo ..... 110
- Figura 75 - Concentrações (%) de manitol no vinho para a levedura PE-2 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo ..... 110
- Figura 76 - Concentrações (%) de manitol no vinho para a levedura de panificação Fleischmann em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo ..... 111
- Figura 77 - Teores (%) de trealose nos vinhos inicial e final para a levedura CAT-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância ..... 112

- Figura 78 - Teores (%) de trealose nos vinhos inicial e final para a levedura BG-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância..... 113
- Figura 79 - Teores (%) de trealose nos vinhos inicial e final para a levedura PE-2 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância..... 113
- Figura 80 - Teores (%) de trealose nos vinhos inicial e final para a levedura de panificação Fleischmann em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância..... 114
- Figura 81 - Teores de CO<sub>2</sub> (em gramas) emitidos pela levedura CAT-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230) durante 21 horas de fermentação (média dos cinco ciclos fermentativos)..... 114
- Figura 82 - Teores de CO<sub>2</sub> (em gramas) emitidos pela levedura BG-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante 21 horas de fermentação (média dos cinco ciclos fermentativos) ..... 115
- Figura 83 - Teores de CO<sub>2</sub> (em gramas) emitidos pela levedura PE-2 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante 21 horas de fermentação (média dos cinco ciclos fermentativos) ..... 115
- Figura 84 - Teores de CO<sub>2</sub> (em gramas) emitidos pela levedura de panificação Fleischmann em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante 21 horas de fermentação (média dos cinco ciclos fermentativos) ..... 116

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Populações iniciais e finais (24 horas) de leveduras e bactérias, bem como suas respectivas viabilidades e valores de pH do meio MBL após 24 horas de crescimento .....58
- Tabela 2 - Populações iniciais e finais (24 horas) de leveduras e bactérias, bem como suas respectivas viabilidades e valores de pH do meio MBL após 24 horas de crescimento .....58
- Tabela 3 - Populações iniciais e finais (24 horas) de leveduras e bactérias, bem como suas respectivas viabilidades e valores de pH do meio MBL após 24 horas de crescimento ..... 68
- Tabela 4 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria e com bactéria homofermentativa (025) sobre os teores de succinato (mM), lactato (mM), acetato (mM), glicerol (mM), manitol (mM) e etanol (mM) após 24h de crescimento empregando-se as leveduras BG-1, CAT-1, ..... 135
- Tabela 5 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria e com bactéria heterofermentativa (230) sobre os teores de succinato (mM), lactato (mM), acetato (mM), glicerol (mM), manitol (mM) e etanol (mM) após 24h de crescimento empregando-se as leveduras BG, CAT-1, ..... 137
- Tabela 6 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre os teores de succinato (mM), lactato (mM), acetato (mM), glicerol (mM), manitol (mM) e etanol (mM) após 24h de crescimento empregando-se a levedura BG-1 ..... 138
- Tabela 7 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre os teores de succinato (mM), lactato (mM), acetato (mM), glicerol (mM), manitol (mM) e etanol (mM) após 24h de crescimento empregando-se a levedura CAT-1 ..... 138

- Tabela 8 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre os teores de succinato (mM), lactato (mM), acetato (mM), glicerol (mM), manitol (mM) e etanol (mM) após 24h de crescimento empregando-se a levedura Fleischmann..... 139
- Tabela 9 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre os teores de succinato (mM), lactato (mM), acetato (mM), glicerol (mM), manitol (mM) e etanol (mM) após 24h de crescimento empregando-se a levedura PE-2..... 139
- Tabela 10 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre o rendimento fermentativo (%), crescimento do fermento (g) e pH no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura CAT-1140
- Tabela 11 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a viabilidade da levedura (%), taxa de brotamento (%) e os teores de trealose (%) no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura CAT-1..... 141
- Tabela 12 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a contaminação bacteriana observada por contagem ao microscópio ótico ( $10^7$  células.mL<sup>-1</sup>), pelo método do Microplaquemento em Gotas ( $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>) e sobre a viabilidade bacteriana % no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura CAT-1..... 142
- Tabela 13 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre os teores residuais de açúcares (%), expressos como ART e sacarose no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura CAT-1143

- Tabela 14 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre os teores residuais de açúcares (%), expressos como glicose e frutose no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura CAT-1144
- Tabela 15 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a formação de succinato (mM), lactato (mM) e acetado (mM) no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura CAT-1 ..... 145
- Tabela 16 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a formação de glicerol (mM) e manitol (mM) no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura CAT-1 ..... 146
- Tabela 17 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a velocidade de fermentação (g de CO<sub>2</sub>) no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura CAT-1 ..... 147
- Tabela 18 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre o rendimento fermentativo (%), crescimento do fermento (g) e pH no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura BG-1. 148
- Tabela 19 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a viabilidade da levedura (%), taxa de brotamento (%) e os teores de trealose (%) no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se ..... 149
- Tabela 20 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a contaminação bacteriana observada por contagem ao microscópio ótico ( $10^7$  células.mL<sup>-1</sup>), pelo método do Microplaquemento em Gotas ( $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>) e sobre a viabilidade bacteriana % no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura BG-1 ..... 150

- Tabela 21 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre os teores residuais de açúcares (%), expressos como ART e sacarose no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura BG-1 151
- Tabela 22 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre os teores residuais de açúcares (%), expressos como glicose e frutose no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura BG-1 152
- Tabela 23 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a formação de succinato (mM), lactato (mM) e acetado (mM) no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura BG-1 ..... 153
- Tabela 24 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a formação de glicerol (mM) e manitol (mM) no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura BG-1 ..... 154
- Tabela 25 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a velocidade de fermentação (g de CO<sub>2</sub>) no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura BG-1 ..... 155
- Tabela 26 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre o rendimento fermentativo (%), crescimento do fermento (g) e pH no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura PE-2. 156
- Tabela 27 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a viabilidade da levedura (%), taxa de brotamento (%) e os teores de trealose (%) no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a..... 157

- Tabela 28 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a contaminação bacteriana observada por contagem ao microscópio ótico ( $10^7$  células.mL<sup>-1</sup>), pelo método do Microplaquemento em Gotas ( $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>) e sobre a viabilidade bacteriana % no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura PE-2..... 158
- Tabela 29 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre os teores residuais de açúcares (%), expressos como ART e sacarose no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura PE-2 . 159
- Tabela 30 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre os teores residuais de açúcares (%), expressos como glicose e frutose no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura PE-2 . 160
- Tabela 31 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a formação de succinato (mM), lactato (mM) e acetado (mM) no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura PE-2 ..... 161
- Tabela 32 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a formação de glicerol (mM) e manitol (mM) no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura PE-2 ..... 162
- Tabela 33 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a velocidade de fermentação (g de CO<sub>2</sub>) no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura PE-2 ..... 163
- Tabela 34 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre o rendimento fermentativo (%), crescimento do fermento (g) e pH no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura ..... 164



- Tabela 35 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a viabilidade da levedura (%), taxa de brotamento (%) e os teores de trealose (%) no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura Fleischmann..... 165
- Tabela 36 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a contaminação bacteriana observada por contagem ao microscópio ótico ( $10^7$  células.mL<sup>-1</sup>), pelo método do Microplaqueamento em Gotas ( $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>) e sobre a viabilidade bacteriana % no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura Fleischmann..... 166
- Tabela 37 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre os teores residuais de açúcares (%), expressos como ART e sacarose no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura ..... 167
- Tabela 38 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre os teores residuais de açúcares (%), expressos como glicose e frutose no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura ..... 168
- Tabela 39 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a formação de succinato (mM), lactato (mM) e acetado (mM) no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura Fleischmann..... 169
- Tabela 40 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a formação de glicerol (mM) e manitol (mM) no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura Fleischmann ..... 170
- Tabela 41 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a velocidade de fermentação (g de CO<sub>2</sub>) no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura Fleischman ..... 171

## 1 INTRODUÇÃO

Os preços flutuantes do petróleo e os efeitos adversos da utilização de recursos não-renováveis são as principais razões para o crescente interesse por fontes de energia renováveis. A produção de petróleo é controlada por relativamente poucos países e a economia global depende fortemente dos preços controlados por eles. Além das considerações econômicas, outros fatores como a segurança energética, a emissão de gases poluentes e a mudança climática global estão ajudando a guiar a revolução bioenergética (NASS et al., 2007).

A crise energética e os problemas ambientais atuais têm colocado o bioetanol como uma fonte de energia renovável altamente atrativa. O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de etanol do mundo, e sua produção vem gradativamente aumentando nas últimas décadas. No entanto, recentemente, os Estados Unidos ultrapassaram o Brasil em termos de volume de produção de bioetanol (VALDES, 2007), atingindo 21 bilhões de litros durante a safra 2007/2008 (OLIVEIRA et al., 2007).

Nos Estados Unidos, a maior parte do etanol é produzida a partir do milho, com um balanço energético estimado de 1,3 (unidades de energia obtida a partir do etanol produzido por unidade de energia utilizada na sua produção). O Brasil, por sua vez, produz etanol da cana-de-açúcar, com um balanço energético de 8,0 (LEITE, 2005). Os avanços científicos e tecnológicos, como por exemplo, os relacionados às variedades da cana-de-açúcar e o gerenciamento do processo de fermentação e agrícola têm levado a um aumento na eficiência nas destilarias brasileiras (BASSO et al., 2008).

O Brasil tem desenvolvido com sucesso iniciativas em fontes renováveis de energia há mais de 75 anos. A produção e o uso do etanol da cana-de-açúcar (*Saccharum ssp. L.*) tornou-se um modelo global para a produção, distribuição e utilização do etanol combustível; por esta razão, a indústria de etanol brasileira tem atraído o interesse de cientistas, produtores e governantes tanto de países desenvolvidos como daqueles em desenvolvimento (NASS et al. 2007).

A produção de etanol do milho utiliza grande quantidade de combustíveis fósseis, o qual gera dúvidas se o seu uso trará algum benefício econômico e ambiental. Por outro lado, o biodiesel, devido à sua produção mais simples e eficiente, mostra mais

claramente seus benefícios ambientais, mas sua sustentabilidade em uma escala significativa não está clara devido à sua baixa produtividade. Por outro lado, a indústria de etanol brasileira tem mostrado que é possível ser eficiente, tanto ambiental como economicamente, na implementação da infraestrutura para a produção de um biocombustível (GRANDA et al., 2007).

No entanto, vários aspectos da indústria de bioetanol brasileira ainda devem ser melhorados. O processo de produção atualmente praticado no Brasil envolve o reciclo das leveduras, e com isso ocorre o reciclo de contaminantes causando diversos distúrbios no processo (ALTERTHUM et al., 1984). Diferentemente da produção de bebidas alcoólicas, a fermentação de etanol combustível não é projetada para manter condições de culturas puras de microrganismos. Além disso, a limpeza e a sanitização são bem menos rigorosas e o mosto é submetido a um menor aquecimento, não sendo esterilizado. Infecções crônicas acabam então sendo esperadas e toleradas, apesar de muitas vezes trazerem impactos negativos para a produção de etanol (AMORIM; OLIVEIRA, 1982; KAJI; CANHOS, 1989).

Na indústria de etanol combustível, *Lactobacillus* sp, os contaminantes bacterianos mais comuns, constituem um problema contínuo e persistente. Devido ao seu rápido crescimento, tolerância aos altos teores de etanol e valores baixos de pH, essas bactérias podem proliferar rapidamente nas dornas de fermentação. Alguns de seus metabólitos, tais como o ácido lático e o ácido acético, podem inibir o crescimento e o metabolismo das leveduras. Além disso, esses contaminantes podem competir com a levedura por nutrientes do meio (NARENDRANATH et al., 2001; THOMAS et al., 2002).

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve com principal objetivo um melhor entendimento sobre as interações existentes entre leveduras e diferentes contaminantes do processo industrial de fermentação de etanol, especificamente por bactérias do gênero *Lactobacillus*, por se tratar de um dos maiores causadores de prejuízos para tal processo.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Toda a produção de álcool e aguardente no Brasil ocorre por via fermentativa, sendo que devido às dificuldades de assepsia, leveduras e bactérias lácticas convivem no ambiente de fermentação. Por sua vez, a contaminação bacteriana é um sério problema na fermentação alcoólica, podendo causar inúmeros prejuízos ao processo industrial de produção de etanol.

A fermentação alcoólica industrial envolve o reciclo de células de leveduras, o que acaba por ocasionar o reciclo de células de microrganismos contaminantes. Este continua sendo um sério problema no processo de produção de etanol, correlacionando-se negativamente com a eficiência fermentativa e podendo acarretar sérios prejuízos ao processo como um todo (AMORIM et al., 1981; ALTERTHUM et al., 1984). Além das condições inadequadas de assepsia, a má qualidade da matéria-prima pode contribuir para a origem de infecções microbianas indesejáveis na indústria. Más condições de armazenamento de melaço, limpeza inadequada das dornas e canalizações, e resfriamento insuficiente das dornas de fermentação são também fatores que propiciam o aparecimento de contaminações na fermentação alcoólica de caldo-de-cana e/ou de melaço (AMORIM; OLIVEIRA, 1982).

As condições peculiares das etapas do processo de cada indústria selecionam determinadas espécies ou linhagens de microrganismos que são favorecidos por tais condições e que não são problemas em outras destilarias (CHERUBIN, 2003). Resultados de um estudo de caracterização da microbiota contaminante da produção de álcool combustível utilizando o milho como matéria-prima, demonstraram que prevalecem bactérias lácticas, particularmente *Lactobacillus* sp., representando cerca de 40% dos contaminantes totais isolados. Outros isolados presentes com menos frequência incluem os gêneros *Clostridium*, *Eubacterium*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Weisella* (SKINNER; LEATHERS, 2004).

Os maiores prejuízos no processo de fermentação alcoólica são, de fato, causados pelas chamadas bactérias lácticas (BLs), sendo que no ambiente industrial de produção de etanol, cerca de 60% dos isolados bacterianos são representados pelo gênero *Lactobacillus* (GALLO, 1990). De acordo com este autor, os gêneros mais

freqüentes são *Bacillus* e *Lactobacillus*, cujas espécies predominantes na população investigada foram: *B.coagulans*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *B. stearothermophilus*, *L. plantarum*, *L. animalis* e *L. buchneri*. Um estudo sobre a ocorrência natural de bactérias em fermentação de milho para produção de etanol combustível também revelou que os *Lactobacillus* representam a maior parte dos contaminantes, tanto para a moagem úmida (44-66% do total de isolados identificados) como para a moagem seca (37-39% dos isolados). Linhagens de *L. delbruekii*, foram as mais comumente identificadas no processo (SKINNER; LEATHERS, 2004).

## 2.1 Os problemas da contaminação bacteriana

Quando a contaminação bacteriana atinge níveis superiores a  $1,0 \times 10^7$  células/mL de meio fermentativo, pode ocorrer uma significativa diminuição no rendimento alcoólico (AMORIM et al., 1981). Vários fatores são atribuídos a essa queda no rendimento, tais como: i) a floculação das leveduras, o que diminui a velocidade de fermentação, acarreta perda de células de levedura pelo fundo da dorna e dificulta a operação das centrífugas (AMORIM; OLIVEIRA, 1982; OLIVA-NETO; YOKOYA, 1997); ii) o desvio de muitos nutrientes para a multiplicação das bactérias (NARENDRANATH et al., 1997), sendo que cada molécula de açúcar direcionada para a produção de ácido láctico resulta na perda de duas moléculas de etanol que poderiam ser produzidas (INGLEDEW, 1995); e iii) a diminuição da viabilidade das leveduras causada pelo microrganismo contaminante (YOKOYA, 1989), devido à produção de metabólitos (principalmente os ácidos láctico e acético) (BEVAN; BOND, 1971) e à competição por nutrientes do meio (NOBRE, 2005).

A floculação é a formação de agrupamentos compostos de células de leveduras e bactérias. Esse fenômeno ocorre porque bactérias (como *Lactobacillus* e *Bacillus*) possuem uma capa protéica (constituída majoritariamente de proteínas denominadas floculinas), de natureza gelatinosa, que possibilita a fixação mecânica das células de leveduras (GALLO; CANHOS, 1991). Além dos problemas operacionais, a floculação das células provoca um grande aumento no tempo de fermentação, tanto pela

deposição de leveduras no fundo das dornas, como devido à redução na área de contato entre células de leveduras e mosto.

Em indústrias de produção de uísque escocês, onde o mosto não é fervido para reter a atividade de enzimas solúveis do malte, a contaminação bacteriana pode comprometer a qualidade do destilado e minimizar o rendimento final desse produto de alto valor (MAKANJUOLA et al., 1992). Alterthum et al. (1984), estudando fermentações com reciclagem células, citaram que a elevada porcentagem de células mortas e o aumento da acidez do mosto são devido à liberação no meio de cultura de substâncias tóxicas produzidas pelas células bacterianas, promovendo a morte da levedura ou dificultando o seu crescimento.

Segundo Yokoya e Oliva-Neto (1991), a presença de bactérias lácticas na fermentação causa aumento da acidez do vinho pela produção de ácidos láctico e acético, e induzem queda na porcentagem de células vivas das leveduras. Freguglia (1997), estudando a viabilidade celular de *S. cerevisiae* em cultura mista com *L. fermentum* observou que a presença da bactéria e/ou de seus produtos metabólicos reduziram a viabilidade celular da levedura em 97% e 55%, respectivamente, após 12 horas de cultivo associado.

## **2.2 O controle da contaminação**

O controle microbiológico é de importância fundamental se o objetivo é produzir álcool com altos rendimentos (AMORIM; OLIVEIRA, 1982) e devido à presença de contaminantes durante o processo fermentativo, é importante o conhecimento de fatores que possibilitem a redução dos problemas causados pela contaminação bacteriana, além das práticas usuais de tratamento ácido do creme de levedura e de aplicação de antibióticos (CHERUBIN, 2003). Segundo Oliva-Neto (1995), o controle bacteriano na produção de etanol é imprescindível, pois eleva o custo do produto. Portanto, justifica-se a necessidade de conhecer os fatores que estimulam a multiplicação bacteriana durante o processo fermentativo, além de buscar novas tecnologias menos onerosas para o controle do contaminante na fermentação alcoólica.

A intensidade da contaminação bacteriana pode reduzir significativamente pela limpeza e sanitização dos equipamentos, pela pasteurização ou esterilização química dos substratos e pela adição de antibióticos (AMORIM; OLIVEIRA, 1982). Apesar dessas precauções, a contaminação ainda persiste em muitas indústrias produtoras de etanol.

Na tentativa de controle dos contaminantes da fermentação alcoólica, diversas práticas envolvendo a utilização de agentes antimicrobianos são utilizadas, sendo que a aplicação de ácido sulfúrico no preparo do pé-de-cuba (creme de leveduras diluída no vinho fermentado) é a prática mais utilizada e possibilita reduções de até 45% na população de bactérias contaminantes (GALLO, 1990). O ácido sulfúrico é largamente utilizado, pois, além de custo relativamente baixo, também diminui a floculação, melhorando a concentração do creme de levedura nas centrífugas.

Têm-se registro de que o peróxido de hidrogênio, metabissulfato de potássio, 3,4,4'-trichlorocarbanilide e antibióticos inibem efetivamente o crescimento de bactérias lácticas (AQUARONE, 1960; BAYROCK et al., 2003; CHANG et al., 1997; NARENDRANATH et al., 2000; OLIVA-NETO; YOKOKA, 1998). De fato, antibióticos como a penicilina e virginiamicina são usados na produção comercial de bioetanol atualmente (BAYROCK et al., 2003; HYNES et al., 1997). Alves (1994), trabalhando com mosto contaminado com uma mistura de microrganismos, observou que a eficácia da fermentação pode ser restabelecida com a aplicação dos antimicrobianos virginiamicina, penicilina e cloranfenicol.

O modo como é feita a adição do antibiótico também pode ter efeito na redução da contaminação. Segundo Bayrock et al. (2003), mudando-se a adição de contínua para pulsada, encontrou-se um número menor de células viáveis de *L. paracasei* em cultivo conjunto com *S. cerevisiae*, além de uma recuperação da concentração de etanol. Porém, a adição de antibióticos pode não ser preferível pelo ponto de vista ecológico, uma vez que os resíduos gerados durante a produção podem ser reciclados e utilizados como fertilizantes, por exemplo. Além disso, antibióticos são caros e o uso de tais produtos fica restrito ao fator custo-benefício, além de requererem aplicação constante (BEVAN; BOND, 1971).

De acordo com Skinner-Nemec et al. (2007), bactérias contaminantes da produção de etanol combustível podem formar biofilmes sob condições de laboratório. Os resultados deste estudo podem explicar porque a contaminação é persistente e de difícil controle em plantas de produção comercial. Biofilmes são geralmente considerados resistentes à limpeza e aos antibióticos e, além da superfície imediata do tanque fermentador, há muitos outros locais para sua formação, incluindo tubulações e trocadores de calor. Adicionalmente, *Lactobacillus* têm mostrado reduzida suscetibilidade a antimicrobianos em biofilmes (STEWART et al., 2004).

Segundo Watanabe et al. (2008), o próprio ácido láctico pode ser utilizado como um potencial agente de controle da contaminação bacteriana. Apesar de produzirem estequiometricamente ácido láctico a partir de açúcares, elevados níveis deste ácido orgânico podem inibir o crescimento e viabilidade de bactérias lácticas. Porém, a adição de altas concentrações de lactato pode também diminuir a habilidade fermentativa de *S. cerevisiae*. Para solucionar este conflito, tais autores testaram linhagens de leveduras (*Candida glabrata*) lactato-tolerantes com elevada capacidade de produção de etanol e de crescimento sob condições anaeróbias. Guchte et al. (2002) relata que o efeito do ácido láctico sobre a própria bactéria não é conhecido em detalhes, mas é aceito que ocorre a difusão passiva e que o acúmulo intracelular diminui o pH interno da célula afetando a permeabilidade da membrana.

As indústrias de etanol têm considerado aceitável uma população bacteriana no mosto de cerca de  $10^5$  UFC/mL, não sendo economicamente viável diminuir este nível (ALCARDE et al., 2003). Considerando o crescente conceito de que as bactérias desenvolveram resistência aos antibióticos, segundo Narendranath e Power (2004), a estratégia de inocular uma alta taxa de leveduras é uma forma de minimizar os efeitos causados pela contaminação bacteriana.

O uso da radiação ionizante também pode ser uma alternativa de descontaminação do mosto de cana-de-açúcar. A irradiação pode mudar o DNA celular, afetando as funções celulares e induzindo à morte das células (URBAIN, 1986). Em um estudo comparativo de inativação de *L. plantarum*, os resultados indicaram que a irradiação por microondas mostrou-se mais efetiva no controle da bactéria do que o método convencional de tratamento a calor (50°C por 30 minutos) (SHIN; PYUN, 1997).



### 2.3 Interações entre leveduras e bactérias na fermentação

Leveduras e bactérias lácticas são muitas vezes encontradas nos mesmos ecossistemas naturais e podem competir pelos mesmos nutrientes. Neste caso, o comportamento dos microrganismos torna-se de difícil compreensão, considerando-se que os parâmetros físico-químicos do meio exercem uma pressão seletiva, permitindo mudanças constantes na sua complexa composição química e microbiológica (KENNES et al., 1991). Segundo Boram et al. (1993), a coexistência entre leveduras e bactérias lácticas deve-se à habilidade das leveduras sobreviverem no ambiente ácido causado pelos ácidos acético e láctico, bem como pela resistência aos antibióticos produzidos pelas bactérias lácticas. As relações antagônicas, segundo Walksman (1945) ocorrem pela produção de uma ampla gama de substâncias tóxicas, compreendendo desde compostos simples como ácidos orgânicos, álcoois e até compostos mais complexos como polipeptídeos e derivados do metabolismo secundário.

Quando ambos os microrganismos estão crescendo juntos em um meio definido, onde o crescimento da levedura é restrito por concentrações sub-ótimas de vitaminas, uma substância em falta (como ácido nicotínico, adenina, guanina, ácido aspártico, triptofano, glicina, alanina ou lisina) essencial para o crescimento de *Lactobacillus* spp. é sintetizada no meio pela célula de levedura. Diversas inter-relações entre leveduras e *Lactobacillus* foram anteriormente observadas, e em cada uma delas a levedura parece ser o organismo ativo, ou seja, aquele que sintetiza a substância ausente essencial para o crescimento da bactéria (CHALLINOR; ROSE, 1954).

No ambiente fermentativo, relações antagônicas são travadas entre leveduras e bactérias e a produção de ácidos orgânicos por estes dois grupos de microrganismos desempenha papel relevante: enquanto a levedura, produzindo ácido succínico exerce uma repressão sobre o crescimento bacteriano (BASSO et. al., 1997), as bactérias por sua vez, produzindo ácido láctico e acético igualmente afetam o desempenho da levedura (OLIVA-NETO; YOKOYA, 1994; MAIORELLA et. al., 1983). De acordo com Thomsson e Larsson (2006), o ácido láctico, adicionado a culturas em quimiostatos, produz um efeito no *status* energético das células de leveduras, provocando uma diminuição nos níveis intracelulares de adenosina trifosfato (ATP). Esse aumento no

consumo de ATP pode estar relacionado à elevada quantidade de energia requerida para manter a homeostase celular, bombeando prótons e ânions do ácido láctico dissociado para fora da célula.

Thomas et al. (2001) pesquisaram o efeito da cultura mista de leveduras com *Lactobacillus fermentum* durante 6 ciclos de fermentação em batelada de mosto à base de milho e relataram que a presença da bactéria ocasionou decréscimo de 22% na produção de etanol, aumento do desvio de carboidratos para a produção de glicerol e ácido láctico, queda de 55% da viabilidade da levedura e redução na formação de massa celular de levedura. Os autores concluíram ainda que a inibição exercida pela levedura sobre o *L. fermentum* ocasionou diminuição na formação de ácido láctico e acético pela bactéria e que a levedura foi capaz de exercer antibiose suficiente sobre a bactéria para reduzir a população contaminante.

Este efeito repressor sobre o crescimento bacteriano pode ser, em parte, atribuído à produção de ácido succínico pela levedura e tal ação antibacteriana deve-se não apenas ao efeito da acidez, mas principalmente ao ânion em um efeito sinérgico com o etanol. Como não há evidências de qualquer função fisiológica para a grande quantidade de ácido succínico excretada, pode-se atribuir uma função ecológica pela qual sua produção torna a levedura mais competitiva em um ambiente de fermentação industrial (BASSO et. al, 1997).

Bayrock; Ingledew (2004) sugerem que, em adição ao estresse químico que a levedura pode encontrar durante a fermentação devido à presença de contaminantes, o estresse nutricional, devido à competição com as bactérias contaminantes pelos nutrientes do meio, pode prejudicar o desempenho das leveduras. Tais autores registraram uma diminuição no número de células viáveis de leveduras, uma maior concentração de glicose no meio após a fermentação e ainda uma diminuição na produção de etanol com o aumento da concentração de ácido láctico não dissociado no meio.

No entanto, de acordo com Nobre (2005) a presença isolada dos metabólitos celulares de todas as bactérias testadas não foi suficiente para diminuir as porcentagens de células vivas de *S. cerevisiae*. Com excessão da bactéria *B. subtilis* inativada por radiação, as demais bactérias (*B. coagulans*, *B. stearothermophilus*, *L.*

*fermentum* e *L. plantarum*) tratadas pelos diferentes processos (calor, radiação e antimicrobiano) não causaram diminuição da viabilidade celular e da população das leveduras, indicando que a presença isolada dos metabólitos celulares dessas bactérias não foi suficiente para reduzir a porcentagem de células vivas e a densidade populacional da levedura. A acidez do meio juntamente com a presença das bactérias foram os principais fatores relacionados à diminuição da viabilidade celular de *S. cerevisiae*.

Muitas espécies de bactérias são capazes de secretar inibidores, em especial o *Streptomyces* spp, que pode produzir ciclohexamina, cloranfenicol e nistatina, entre outros compostos e que são utilizados como medicamentos para inibir o crescimento de leveduras (WALKER, 1998). Quadri (2002) relatou que bactérias lácticas produzem peptídeos com a função de executar a comunicação célula-célula e exercer atividade antimicrobiana. Esta forma de inibição torna evidente que ainda são muitos os aspectos da interação existente entre leveduras e bactérias lácticas a serem conhecidos.

Em algumas situações a presença da levedura favorece o desenvolvimento bacteriano, em outros casos a fermentação é considerada um ótimo inibidor da multiplicação bacteriana, seja pela presença do etanol, de ácidos orgânicos ou pela rápida assimilação do substrato (BASSO et al., 1997; THOMAS et al., 2001; ALVES, 2000). O desenvolvimento de *Lactobacillus* sp quando em cultura mista com leveduras pode ser devido à excreção de nutrientes, da levedura para o meio, como adenina, guanina, ácido aspártico e nicotínico, triptofano, glicina, alanina, e lisina (NARENDRANATH et al., 1997; CHIN; INGLEDEW, 1994). O estímulo ao desenvolvimento bacteriano também é causado pela liberação de aminoácidos, cuja presença no meio fermentativo pode ser causada pela autólise das células de leveduras (OLIVA-NETO; YOKOYA, 1997; OLIVA-NETO, 1995).

Em ensaios de laboratório com contaminação bacteriana deliberada (ALVES, 1994), foi possível demonstrar que o ácido láctico, produzido exclusivamente pela bactéria, serve como indicador da contaminação bacteriana, enquanto que o ácido succínico seria produto majoritariamente formado pela levedura. No mesmo trabalho observou-se que o ácido acético seria produzido por ambos os microrganismos. Mais recentemente foi possível verificar que o manitol, formado exclusivamente pelas

bactérias lácticas durante a fermentação, igualmente se presta como indicador bioquímico da intensidade da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica (EGGLESTON et al., 2007). Sugere-se que os indicadores bioquímicos (ácido láctico e/ou manitol), possam refletir mais fielmente a atividade metabólica das bactérias contaminantes do que a população bacteriana *per se*. Por outro lado a formação do ácido succínico correlaciona-se com o crescimento da levedura (BASSO et al., 1997).

Tais trabalhos forneceram os fundamentos para se acessar as atividades metabólicas de leveduras e bactérias lácticas coexistindo num ambiente fermentativo, permitindo uma avaliação do antagonismo entre estes dois grupos de microrganismos mediante a formação de metabólitos (lactato, succinato, acetato, manitol e etanol).

## 2.4 As bactérias lácticas

Bactérias produtoras de ácido láctico, freqüentemente denominadas “Bactérias Lácticas” (BLs), são representadas pelos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus*. Em geral, são caracterizadas como microrganismos Gram-positivos, não esporogênicos, catalase negativos, citocromo ausente, aerotolerantes, não redutores de nitrato a nitrito, exigentes quanto a fatores nutricionais, tolerantes a ácido e estritamente fermentativos com a formação de ácido láctico como principal produto da degradação de açúcar. (YOKOYA et al., 1997; KANDLER, 1983, CARR et al., 2002).

Constituem-se um diversificado grupo de microrganismos associados à plantas, carnes e produtos derivados do leite. São microrganismos amplamente conhecidos e comercialmente importantes por participarem do processamento de bebidas alcoólicas, carnes, vegetais e produtos lácteos, como iogurtes, queijos e leites fermentados. Seus efeitos benéficos na indústria de alimentos ainda incluem a habilidade de produzir compostos aromáticos e realçadores de sabor (CARR et al., 2002).

Apesar de sua importância na indústria de alimentos, as BLs constituem um sério problema nos processos fermentativos de produção de combustível ou de bebidas alcoólicas fermento-destiladas. Isso porque esses contaminantes são tolerantes às

temperaturas elevadas, ao baixo pH e apresentam habilidade de crescimento extremamente rápido (NARENDRANATH et al., 1997).

O gênero *Lactobacillus*, principal contaminante na produção de etanol combustível, pode ser enquadrado em três grupos distintos quanto ao modo como realiza a degradação dos carboidratos (KANDLER, 1983; KANDLER; WEISS, 1986). Os três grupos assemelham-se pelo fato de degradarem apenas hexoses, mas diferem pelo modo como a cadeia de carbono de tais compostos é metabolizada. No grupo formado por homofermentativos obrigatórios, as hexoses são convertidas quase que exclusivamente em ácido láctico pela via Embden-Meyerhof. Nesse grupo, 1 mol de hexose leva a formação de 2 moles de ácido láctico e 2 moles de ATP. Tal metabolismo é caracterizado pela quebra de frutose 1,6-bifosfato em duas trioses fosfato (3C), as quais são posteriormente convertidas a lactato (Figura 1).

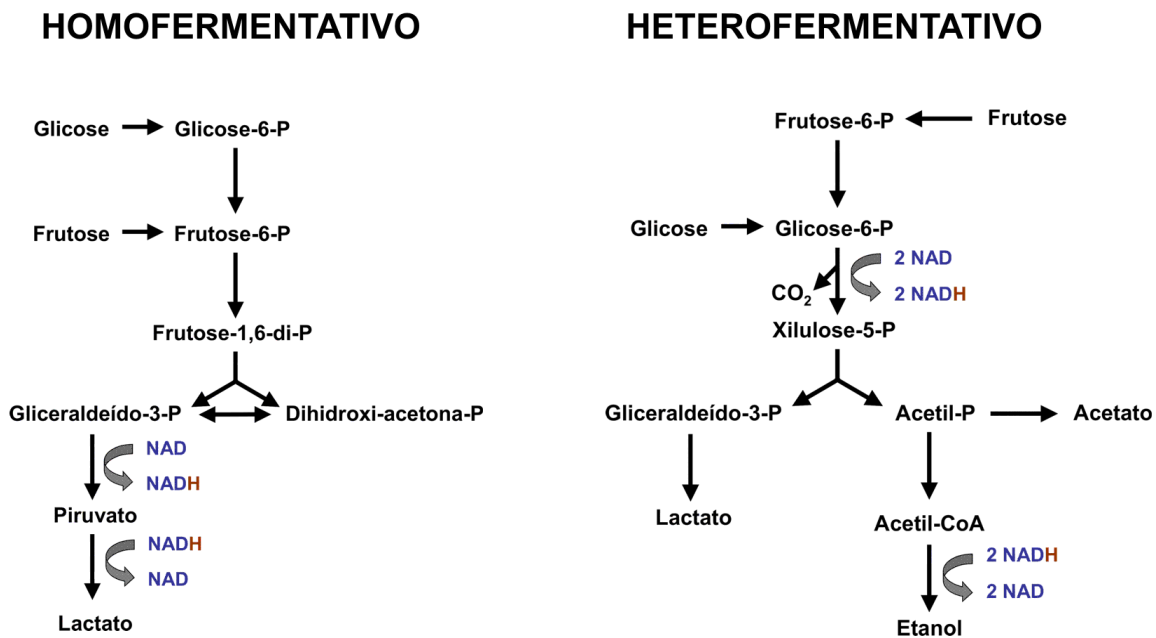


Figura 1 - Representação esquemática simplificada das vias do metabolismo homofermentativo e heterofermentativo em bactérias lácticas do gênero *Lactobacillus* (Adaptado de Kandler, 1983)

No grupo formado por lactobacilos heterofermentativos obrigatórios, as bactérias utilizam a via 6-fosfogluconato/fosfocetolase para a fermentação de hexoses. Em condições de anaerobiose, hexoses são convertidas em quantidades equimolares de

ácido láctico, etanol e/ou ácido acético, gás carbônico e ATP. Tais bactérias realizam a oxidação de glicose-6-fosfato a gluconato-6-fosfato, o qual sofre descarboxilação (perda de uma molécula de gás carbônico) e posterior desdobramento da pentose resultante (xilulose-5-fosfato) em duas moléculas, sendo uma de três (gliceraldeído-3-fosfato) e outra de dois átomos de carbono (acetil-fosfato). O gliceraldeído-3-fosfato dá origem ao lactato, enquanto o acetil-fosfato pode seguir dois caminhos distintos, transformando-se em acetato ou em etanol. Quando acetil-fosfato é convertido a acetato ao invés de etanol, 1 mol adicional de ATP pode ser produzido (Figura 1) (KANDLER, 1983; KANDLER; WEISS, 1986).

O último grupo é composto pelos lactobacilos heterofermentativos facultativos. Tais organismos são capazes de fermentar hexoses de forma semelhante ao grupo homofermentativo. No entanto, sob condições de limitação de glicose, algumas espécies podem converter as hexoses em ácido láctico, ácido acético e/ou etanol (KANDLER, 1983; KANDLER; WEISS, 1986).

De acordo com tais mecanismos, os três tipos de metabolismo podem ser determinados com base nos produtos finais da fermentação láctica (KANDLER, 1983), dentre os quais encontram-se os ácidos láctico e acético, etanol e gás carbônico. De um modo geral, fermentações que resultam na formação de ácido láctico como produto majoritário são conduzidas por lactobacilos do tipo homofermentativo. Por outro lado, fermentações que apresentam, além do ácido láctico, etanol e/ou ácido acético como produtos principais, são realizadas por lactobacilos com biotipo heterofermentativo.

Estudos recentes vêm demonstrando que a produção e excreção de manitol, característica exclusiva das bactérias lácticas heterofermentativas, é superada apenas pelo lactato, sendo, portanto, o segundo metabólito bacteriano mais abundante, responsável por desvio significativo do açúcar do meio (BASSO, 2006).

Sabe-se ainda que as diferentes bactérias lácticas produzem uma mistura dos estereoisômeros D(-)-lactato e L(+)-lactato, em diferentes proporções, dependendo da presença e atividade da enzima desidrogenase láctica (nLDH) específica, a qual é dependente da NAD<sup>+</sup>. A quantidade equimolar dos ácidos D e L-láctico deve-se a presença de quantidades iguais das enzimas D-nLDH e L-nLDH (KANDLER, 1983; MANOME et al., 1998). Além disso, pode-se verificar em alguns casos, a produção da

enzima racemase, com a função de converter o ácido L-lático em D-lático e vice-versa (GARVIE, 1980).

Além da finalidade taxonômica, as proporções dos isômeros óticos do ácido lático, D(+) e L(-), também encontram aplicações tecnológicas. Assim, a produção microbiológica de tal ácido se constitui na matéria-prima para a fabricação do ácido polilático, um plástico versátil e biodegradável, cujas características tecnológicas são condicionadas pelas proporções dos isômeros do ácido lático (HOFVENDAHL; HAHN-HAGERDAL, 2000; ZHOU et al., 2003). Sabe-se também que o isômero ótico D(-)-lactato não é metabolizado pelos tecidos animais e de plantas superiores, sendo considerado um composto não fisiológico (antinatural) na alimentação humana, razão pela qual se recomenda a restrição de seu consumo, bem como um incremento no conteúdo da forma L(+)-lactato nos alimentos fermentados (KANDLER, 1983).

De acordo com Costa et al. (2008), os contaminantes do gênero *Lactobacillus* encontrados em processos fermentativos industriais de produção de etanol podem se apresentar nos 3 biotipos fermentativos (homofermentativo obrigatório e heterofermentativos facultativo e obrigatório), produzindo as mais variadas proporções dos isômeros óticos (D e L) do ácido lático.

Em decorrência destas considerações, se propõe neste trabalho avaliar as relações antagônicas entre leveduras e bactérias lácticas apresentando metabolismos distintos (homo e heterofermentativo) em diferentes condições, buscando não apenas um melhor entendimento das relações tróficas entre os dois grupos de microrganismos, como também identificar linhagens que exerçam maior antagonismo em relação às bactérias, com impacto positivo na eficiência do processo industrial.

## 2.5 Objetivos

O presente estudo teve como objetivo avaliar o antagonismo entre leveduras e bactérias contaminantes do processo industrial de produção de etanol. Para tal foram avaliados o crescimento dos dois microrganismos, não apenas com relação à densidade de células no meio e sua viabilidade, como também através de suas atividades metabólicas, acessadas pela formação de metabólitos específicos (ácidos

lático, succínico e acético, manitol e etanol). Tais experimentos também permitiram avaliar os efeitos antibacterianos de cada linhagem de levedura e foram conduzidos nas seguintes modalidades:

I) Antagonismos entre diferentes leveduras industriais e bactérias lácticas com metabolismos homo e heterofermentativo em condições de laboratório.

**Experimento principal:**

1. Efeito das bactérias homofermentativas sobre leveduras (BG-1, CAT-1, PE-2 e Fleischmann)
2. Efeito das bactérias heterofermentativas sobre leveduras (BG-1, CAT-1, PE-2 e Fleischmann)

**Experimentos suporte:**

3. Efeito das bactérias homo e heterofermentativas sobre a linhagem BG-1
4. Efeito das bactérias homo e heterofermentativas sobre a linhagem CAT-1
5. Efeito das bactérias homo e heterofermentativas sobre a linhagem PE-2
6. Efeito das bactérias homo e heterofermentativas sobre a linhagem Fleischmann

II) Antagonismos entre diferentes leveduras industriais e bactérias lácticas com metabolismos homo e heterofermentativo simulando as condições industriais de produção de etanol.

1. Efeito das bactérias homo e heterofermentativas sobre a linhagem BG-1
2. Efeito das bactérias homo e heterofermentativas sobre a linhagem CAT-1
3. Efeito das bactérias homo e heterofermentativas sobre a linhagem PE-2
4. Efeito das bactérias homo e heterofermentativas sobre a linhagem Fleischmann





### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Ciências Biológicas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP, Piracicaba – São Paulo.

#### 3.1 Microrganismos

Foram avaliadas quatro linhagens de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, sendo uma de panificação (Fleischmann) e três linhagens amplamente empregadas no processo industrial de produção de etanol (BG-1, CAT-1 e PE-2). O resgate foi feito da coleção do laboratório, onde estas leveduras permanecem em meio YPD sólido (extrato de levedura - 1%, peptona - 1%, dextrose - 2%, água destilada, ágar - 1,5%) sendo reativadas em 5 mL de meio YPD líquido (mesma composição, sem ágar), onde permaneceram incubadas a  $32 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 horas.

Para ambos os Experimentos (I e II), foram utilizadas as linhagens de *Lactobacillus* FT025B (*L. plantarum*), do tipo homofermentativo e FT230B (*L. fermentum*), do tipo heterofermentativo. Além destas, a linhagem FT432B (*L. fructosus*), uma bactéria indutora de floculação em leveduras e também do tipo heterofermentativo, foi testada frente a três das linhagens de leveduras avaliadas (BG-1, PE-2 e Fleischmann) apenas no Experimento II. Tais bactérias foram adquiridas da coleção de *Lactobacillus* da empresa Fermentec Ltda., microrganismos estes isolados de ambiente industrial de produção de etanol.

As bactérias, mantidas congeladas em leite desnatado (CHERUBIN, 2003), foram reativadas em 5 mL de meio MRS líquido (1,0%, dextrose - 2,0%, TWEEN 80 - 0,1%, fosfato dibásico de potássio - 0,2%, acetato de sódio - 0,5%, citrato de amônio dibásico - 0,2%, sulfato de magnésio - 0,01%, sulfato de manganês - 0,005%) e incubados a  $32^\circ\text{C}$  por 24 horas.

### 3.2 Cultivo dos microrganismos

No Experimento I, após a ativação das culturas bacterianas e das leveduras, foi inoculado um volume contendo aproximadamente  $10^6$  células por mL (de cada microrganismo) em 8 mL de meio MBL estéril [extrato de levedura (0.5%); peptona (0.5%); frutose (1%); glicose (1%);  $K_2HPO_4$  (0,2%);  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,02%);  $MnSO_4 \cdot H_2O$  (0,001%)] e incubados a 32°C por 24 horas. Contagens prévias do número de células/mL determinaram o volume de cada inóculo a ser inserido no co-cultivo, a fim de se garantir a mesma proporção (1:1) de células de leveduras e de células bacterianas em todos os cultivos. Alíquotas de 1 mL foram coletadas após 24 horas de cultivo e centrifugadas para análise dos ácidos orgânicos e outros metabólitos. Concomitantemente, duas alíquotas de 0,2 mL foram coletadas para determinação da viabilidade e do número de células de leveduras e bactérias ao microscópio óptico. Um tratamento controle foi feito inoculando-se apenas a levedura, a fim de se acompanhar o crescimento de cada linhagem na ausência de bactérias e compará-lo com os cultivos conjuntos de leveduras e bactérias.

O antagonismo entre leveduras e bactérias com metabolismos homo- e heterofermentativos foi também avaliado mediante fermentações com reciclo de células, simulando o processo industrial de produção de etanol (Experimento II). Para isso, foi avaliado o perfil fermentativo das quatro linhagens de leveduras testadas em cultivo conjunto com bactérias homofermentativas, heterofermentativas e ainda na ausência de bactérias (tratamento controle). Apenas para a levedura CAT-1 foram realizados três diferentes tratamentos, pois esta foi testada em cultivo conjunto com somente uma linhagem de bactéria homofermentativa e uma heterofermentativa (FT025B e FT230B), além do tratamento controle. Para as demais linhagens, uma outra bactéria heterofermentativa também foi avaliada (FT432B), no intuito de se comprovar os resultados para a linhagem igualmente heterofermentativa FT230B. Tais experimentos apresentaram, portanto, quatro diferentes tratamentos.

As diferentes linhagens de leveduras foram inicialmente propagadas em anaerobiose a 32-33°C em meio de melaço contendo 10% de ART, duplicando-se o volume da suspensão a cada 24 horas até que fosse atingida biomassa celular

suficiente para o ensaio, a qual foi coleta por centrifugação (800 x g por 20 minutos). Paralelamente, as culturas de bactérias foram propagadas em meio MRS a 32°C, até volume de suspensão de 100 mL com densidade de células suficiente.

Para cada experimento, o inóculo inicial foi de aproximadamente 10% (m/v) de fermento e um volume da cultura de bactérias contendo cerca de  $10^8$  células/mL, o qual corresponde à um nível de contaminação considerado elevado no processo industrial. Os ensaios de fermentação foram conduzidos a 32-33°C em tubos de centrífuga de 150 mL de capacidade (três repetições para cada tratamento), contendo inicialmente 7,0 - 7,5 g de biomassa úmida de levedura. As amostras foram alimentadas com três porções de 20 mL de mosto à base de caldo de cana e melaço (cada matéria-prima contribuindo em 50% do ART final). Ao final da fermentação (que foi monitorada por pesagens antes e depois de cada alimentação) a levedura foi separada do vinho mediante centrifugação a 800 x g por 20 minutos, pesada e ressuspensa em 20 mL de água destilada esterilizada, sendo em seguida novamente alimentada com mosto, perfazendo-se assim 5 ciclos fermentativos. Em cada ciclo, além das análises anteriormente descritas para os outros experimentos, foram estimados o rendimento fermentativo, o crescimento da biomassa, o pH dos vinhos e os teores de glicerol e açúcares residuais nos vinhos (sacarose, glicose e frutose). A viabilidade celular de leveduras e bactérias, como nos demais ensaios, foi feita mediante contagem ao microscópio óptico. Adicionalmente, a população bacteriana foi ainda estimada (em  $\text{UFC.mL}^{-1}$ ) pelo método do Microplaqueamento em Gotas, conforme a metodologia proposta por Silva et al. (1996), a fim de se comparar as duas metodologias.

### **3.3 Análises químicas e microbiológicas**

#### **3.3.1 Análises microbiológicas**

No Experimento I, a viabilidade celular e a população de células de leveduras e de bactérias foram determinadas no momento do inóculo e no final do experimento (após 24h). Para o Experimento II, essas determinações foram realizadas ao final de

cada ciclo fermentativo. Tal análise foi feita mediante coloração diferencial das células pela solução de eritrosina em tampão fosfato e posterior contagem das células viáveis, que permanecem incolores, e não viáveis, as quais adquirem uma coloração rósea intensa na presença do corante. As mesmas análises foram feitas para as bactérias, sendo que neste caso o corante utilizado foi uma solução de Azul de Metileno (0,2%) e Sulfato Azul de Nilo (2,0%), segundo Oliveira et al. (1996).

A população bacteriana foi também estimada por meio do método do Microplaqueamento em Gotas (SILVA et al., 1996) no Experimento II. Placas de petri contendo meio de cultivo MRS ágar com solução de actidiona (10 ppm) foram preparadas 72 horas antes do plaqueamento das amostras e incubadas a 32°C, de modo a permitir a desidratação parcial do meio, possibilitando melhor absorção das gotas de amostra. Após a diluição seriada das amostras em água peptonada (1 g de peptona.L<sup>-1</sup> água destilada esterilizada), foram aplicadas 10 µL das amostras diluídas sobre a superfície do meio. Para cada amostra, foram utilizadas três diferentes diluições seriadas (geralmente de 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup>) em uma única placa, sendo feitas três repetições para cada diluição (Figura 2). As placas foram mantidas em repouso durante 40 a 50 minutos para a absorção das gotas e em seguida incubadas a 32°C durante 48 horas. Passado o período de incubação, foram realizadas as leituras do número de colônias nas diluições que apresentaram entre 4 a 40 colônias para cada gota depositada. De acordo com Cherubin (2003) a metodologia de microplaqueamento em gotas foi equivalente ao plaqueamento em profundidade para determinar a população de *L. fermentum* CCT 1407 tanto em cultura isolada quanto em cultivo misto com *S. cerevisiae*.

No Experimento II também determinou-se as taxas de brotamento para cada linhagem de levedura, por meio da contagem de brotos vivos em relação ao número de células viáveis.



Figura 2 - Microplaqueamento em Gotas contendo 3 repetições de cada diluição seriada para uma única amostra ( $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$ )

### 3.3.2 Análises de açúcares, glicerol e manitol mediante HPAEC

A quantificação de glicose, frutose, sacarose, glicerol e manitol no meio de crescimento foram estimadas mediante cromatografia de troca aniônica (HPAEC) empregando-se o 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  $0.9\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

### 3.3.3 Análises de ácidos orgânicos e etanol mediante HPLC

A formação de ácidos orgânicos (ácidos succínico, lático e acético) e de etanol foram estimados mediante cromatografia líquida (HPLC) empregando-se para tanto coluna de exclusão iônica Aminex HPX-87H BioRad (Hercules, CA, USA) a  $65^\circ\text{C}$ , utilizando-se  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5mM como fase móvel a uma vazão de  $0,6\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e detector de

índice de refração CG 410 (Instrumentos Científicos C.G. LTDA, São Paulo, Brasil), conforme descrito por Alves (1994).

### **3.3.4 Análises de pH, biomassa, velocidade da fermentação e trealose**

Os teores de biomassa foram determinados através da pesagem do fermento após a centrifugação ao final de cada ciclo. A velocidade de fermentação de cada linhagem de levedura foi determinada por meio da emissão de CO<sub>2</sub> acessada pela diferença de peso dos tubos a cada uma hora e meia durante a fermentação. O pH dos vinhos delevurados foi também determinado ao final de cada ciclo fermentativo. Os conteúdos de trealose na levedura foram estimados mediante extração com ácido tricloroacético 0,2M em banho de gelo durante 20 minutos (50 mg de matéria seca de levedura para 2 mL de extrator), seguido de quantificação no sobrenadante (3.000rpm por 10 minutos) mediante cromatografia iônica (HPAEC, Dionex DX 300) com padronização externa e nas mesmas condições operacionais empregadas para a dosagem dos açúcares (BASSO et. al., 2008).

### **3.3.5 Análises de etanol e cálculo da eficiência fermentativa**

Para o Experimento II (simulando condições industriais), os teores de etanol foram determinados mediante destilação por arraste de vapor (por um microdestilador Kjeldhal, Piracicaba, Brasil) seguido por densimetria, utilizando-se o densímetro digital (Anton-Paar DMA-48, Graz – Austria). O cálculo da eficiência fermentativa (rendimento alcoólico) foi baseado na equação estequiométrica da fermentação alcoólica, considerando-se que 100g de glicose (ou ART) resultariam em 51,11 g de etanol (para eficiência de 100% de conversão).

### 3.4 Análise estatística

Foram comparadas a viabilidade celular de leveduras e bactérias bem como a população de células entre os tratamentos com bactérias de metabolismo homo- e heterofermentativo e com o tratamento controle (sem inoculação de bactérias) para as 4 linhagens de leveduras analisadas. Além disso, foram feitas comparações entre a produção de ácidos orgânicos e de outros metabólitos de bactérias e leveduras em todos os tratamentos (ácido succínico, ácido láctico, ácido acético, glicerol, manitol e etanol).

No Experimento II foram ainda comparados o rendimento fermentativo, a formação de biomassa, o pH dos vinhos e os teores de glicerol e açúcares residuais nos vinhos (sacarose, glicose e frutose) para todos os tratamentos dentro de cada ciclo fermentativo.

As comparações de médias foram feitas pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, ao nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ). Para a execução das análises foi utilizado o pacote estatístico SAS – Statistical Analysis System (SAS INSTITUTE, 1990).





## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Experimento I (condições de laboratório)

#### 4.1.1 Experimento principal

Analisando-se o crescimento de bactérias homo- e heterofermentativas em co-cultivos com leveduras industriais, pode-se notar que não houve diferença estatística neste parâmetro em ambas as linhagens de bactérias (homo e heterofermentativa) na presença de nenhuma das linhagens de leveduras (Tabelas 1 e 2). O mesmo ocorreu com a viabilidade das bactérias, com exceção do co-cultivo entre as linhagens CAT-1 e FT025B, onde a viabilidade bacteriana foi menor em relação ao cultivo com as demais linhagens de leveduras.

A presença da bactéria homofermentativa (FT025B) não afetou o crescimento de nenhuma das linhagens de leveduras. Por outro lado, a viabilidade de todas as leveduras diminuiu consideravelmente na presença de tal linhagem de bactéria, assim como o pH do meio após 24 horas de crescimento (Tabela 1). No experimento com a linhagem heterofermentativa (FT230B), o crescimento das linhagens BG-1 e CAT-1 foi estatisticamente menor na presença das bactérias e, com exceção da linhagem Fleischmann, a viabilidade das leveduras não foi afetada quando houve a inoculação de bactérias, ao contrário do que ocorreu com a linhagem homofermentativa. Com relação ao pH do meio, também se observou menores valores na presença da linhagem bacteriana heterofermentativa (Tabela 2). Tais dados sugerem um efeito específico da linhagem de levedura sobre o crescimento e viabilidade das bactérias, bem como um efeito do tipo metabólico bacteriano (homo ou heterofermentativo) sobre os mesmos parâmetros das leveduras.

De acordo com Cherubin (2003), diferentes linhagens, tanto de leveduras quanto de bactérias, podem afetar de maneira distinta o crescimento ou a viabilidade do outro microrganismo presente no cultivo. Tal autor demonstrou que, em experimentos com ciclos fermentativos, a linhagem M-26 de *S. cerevisiae*, por exemplo, exerceu maior inibição à multiplicação do *L. fermentum* CCT 1407 que a linhagem PE-2. Além disso, a linhagem Fleischmann exerceu maior estímulo à multiplicação da bactéria que a

linhagem PE-2, sendo esse estímulo inversamente proporcional à viabilidade celular apresentada pela levedura.

Tabela 1 - Populações iniciais e finais (24 horas) de leveduras e bactérias, bem como suas respectivas viabilidades e valores de pH do meio MBL após 24 horas de crescimento

TRATAMENTO	Bactérias (10 <sup>7</sup> cél.mL <sup>-1</sup> )		Viab. (%)		Leveduras (10 <sup>7</sup> cél.mL <sup>-1</sup> )				Viab. (%)	pH	
					0h		24h				
BG-1	-	-	-	-	1,3	±0,06	9,8 AB	±0,16	99 A	±0,7	5,0 B
BG-1/025	83,4 A	±23,2	22 AB	±5,1	1,3	±0,06	8,2 AB	±0,58	75 CD	±5,2	3,6 CD
CAT-1	-	-	-	-	1,3	±0,06	12,7 A	±3,48	98 A	±1,4	5,0 B
CAT-1/025	82,7 A	±10,6	15 B	±3,3	1,3	±0,06	7,8 AB	±1,24	84 BC	±4,5	3,6 C
PE-2	-	-	-	-	1,2	±0,06	9,0 AB	±0,97	99 A	±0,8	5,2 A
PE-2/025	89,4 A	±32,5	24 AB	±5,5	1,2	±0,06	10,3 AB	±2,68	67 D	±6,4	3,5 E
FL	-	-	-	-	0,8	±0,02	5,5 B	±0,72	95 AB	±0,9	5,1 A
FL/025	79,6 A	±7,56	27 A	±2,3	0,8	±0,02	5,9 B	±2,30	32 E	±3,8	3,5 DE

<sup>a</sup>Inóculo bacteriano: 1,49 (±0,2) (10<sup>7</sup> células.mL<sup>-1</sup>).

Tabela 2 - Populações iniciais e finais (24 horas) de leveduras e bactérias, bem como suas respectivas viabilidades e valores de pH do meio MBL após 24 horas de crescimento

TRATAMENTO	Bactérias (10 <sup>7</sup> cél.mL <sup>-1</sup> )		Viab. (%)		Leveduras (10 <sup>7</sup> cél.mL <sup>-1</sup> )				Viab. (%)	pH	
					0h		24h				
BG-1	-	-	-	-	1,4	±0,08	12,7 A	±0,60	100 A	±0,0	4,9 AB
BG-1/230	26,5 A	±3,14	52 A	±11	1,4	±0,08	10,7 BC	±0,63	99 A	±0,0	4,3 C
CAT-1	-	-	-	-	1,7	±0,06	12 AB	±0,54	100 A	±0,5	4,9 AB
CAT-1/230	30,7 A	±8,00	42 A	±32	1,7	±0,06	9,6 C	±0,75	99 A	±0,5	4,3 C
PE-2	-	-	-	-	1	±0,05	10,2 C	±0,37	98 AB	±1,0	4,9 B
PE-2/230	37,6 A	±8,50	38 A	±11	1	±0,05	9,4 C	±0,44	97 B	±1,0	4,2 C
FL	-	-	-	-	0,8	±0,11	5,5 D	±0,40	94 C	±0,5	5,1 A
FL/230	37,7 A	±2,97	25 A	±7	0,8	±0,11	5,3 D	±0,62	91 D	±2,0	4,0 D

<sup>a</sup>Inóculo bacteriano: 0,97 (±0,09) (10<sup>7</sup> células.mL<sup>-1</sup>).

Com relação aos principais ácidos orgânicos presentes no meio de crescimento, pode-se notar que a produção de ácido succínico não diferiu entre os tratamentos com

e sem bactéria para a maioria das linhagens de leveduras, tanto para a linhagem de bactéria homo como para a heterofermentativa (Figuras 3 e 4). Para a linhagem CAT-1, houve uma maior produção deste ácido na presença da linhagem homofermentativa, o que pode explicar a menor viabilidade da bactéria na presença desta linhagem de levedura, proveniente entre um efeito sinérgico entre o ácido succínico e o etanol, conforme sugerido anteriormente (BASSO et al., 1997). Recentemente, foi demonstrado que tal efeito ocorre entre o ácido láctico e o etanol (DORTA et. al, 2006).

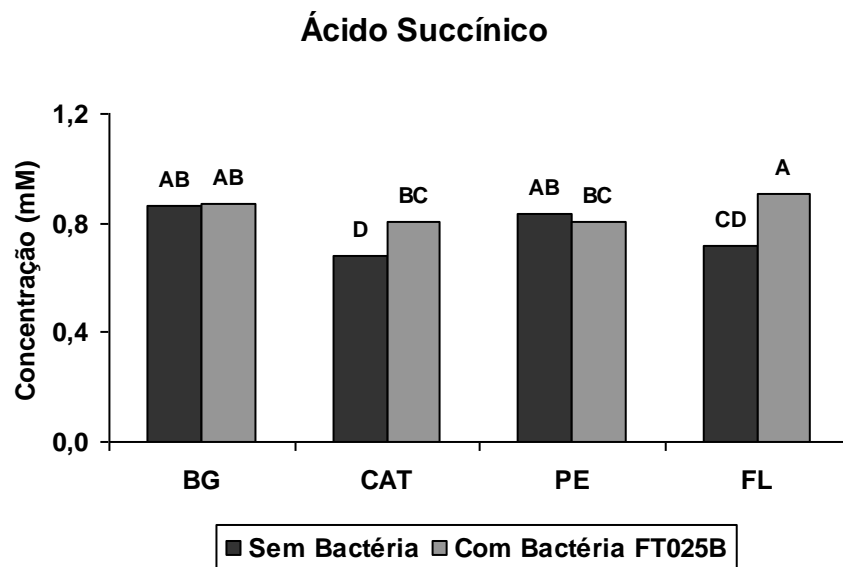


Figura 3 - Concentração (mM) de ácido succínico no meio de crescimento após 24 horas de cultivo conjunto entre as leveduras industriais (BG-1, CAT-1 e PE-2) e a de panificação (Fleischmann) com a bactéria FT025B

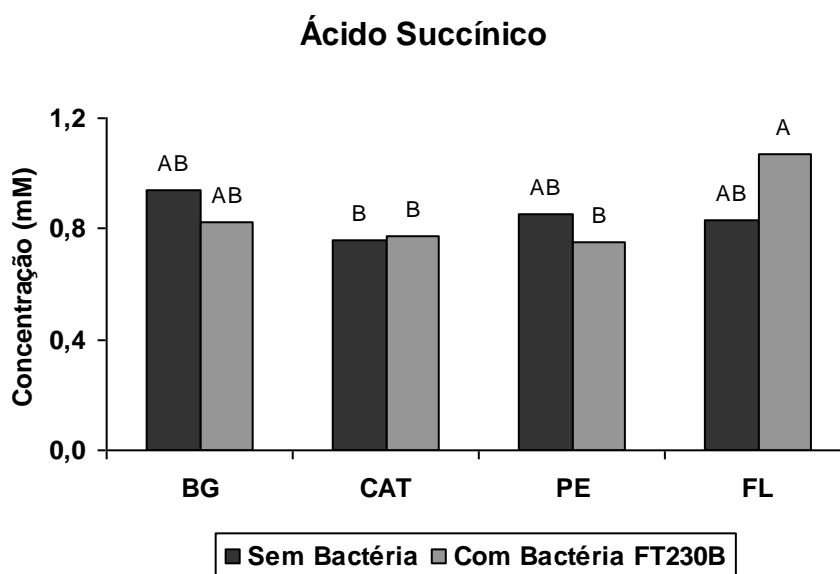


Figura 4 - Concentração (mM) de ácido succínico no meio de crescimento após 24 horas de cultivo conjunto entre as leveduras industriais (BG-1, CAT-1 e PE-2) e a de panificação (Fleischmann) com a bactéria FT230B

A presença de ácido láctico, principal subproduto do metabolismo das bactérias lácticas, foi detectada tanto nos cultivos com a bactéria homofermentativa, como nos meios inoculados com a heterofermentativa. No entanto, fica evidente que os teores de ácido láctico são significativamente superiores quando houve um inóculo de bactéria homofermentativa (Figuras 4 e 5), uma vez que neste tipo metabólico, a metabolização de hexoses leva a formação quase que exclusiva deste ácido, ao passo que bactérias heterofermentativas dissimilam as hexoses para outros produtos além do ácido láctico, tais como ácido acético, etanol e manitol (KANDLER, 1983; VAN WEYMARN, 2002; EGGLESTON et al., 2007; COSTA et al., 2008). Cabe ressaltar que o meio contendo a linhagem CAT-1 em co-cultivo com a bactéria homofermentativa apresentou menor teor deste ácido quando comparado com as demais linhagens de leveduras (Figura 5). Tal resultado pode estar correlacionado com a menor viabilidade desta bactéria na presença da linhagem CAT-1, confirmando-se a maior antibiose exercida por esta linhagem quando comparada com as demais leveduras. Além disso, no meio onde houve o crescimento das linhagens Fleischmann e FT230B, pôde-se notar maior produção de ácido láctico pela bactéria (Figura 6).

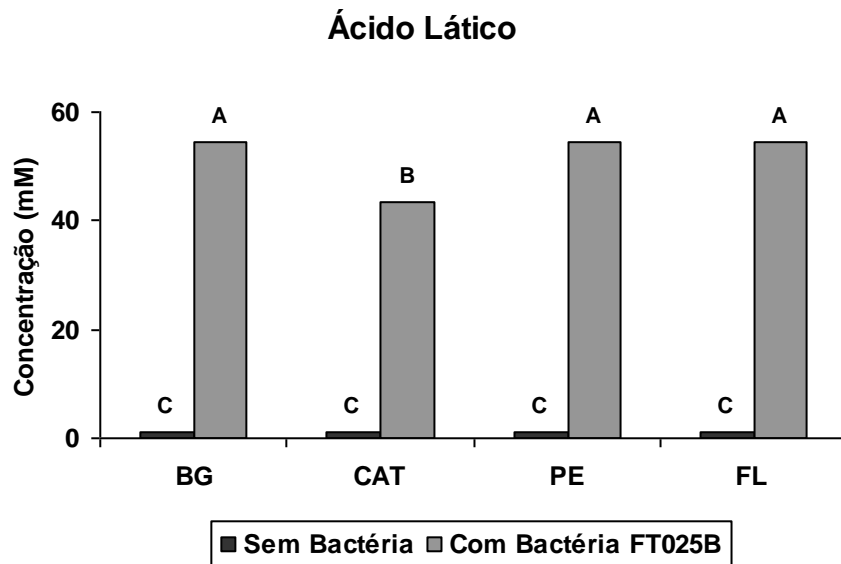


Figura 5 - Concentração (mM) de ácido lático no meio de crescimento após 24 horas de cultivo conjunto entre as leveduras industriais (BG-1, CAT-1 e PE-2) e a de panificação (Fleischmann) com a bactéria FT025B

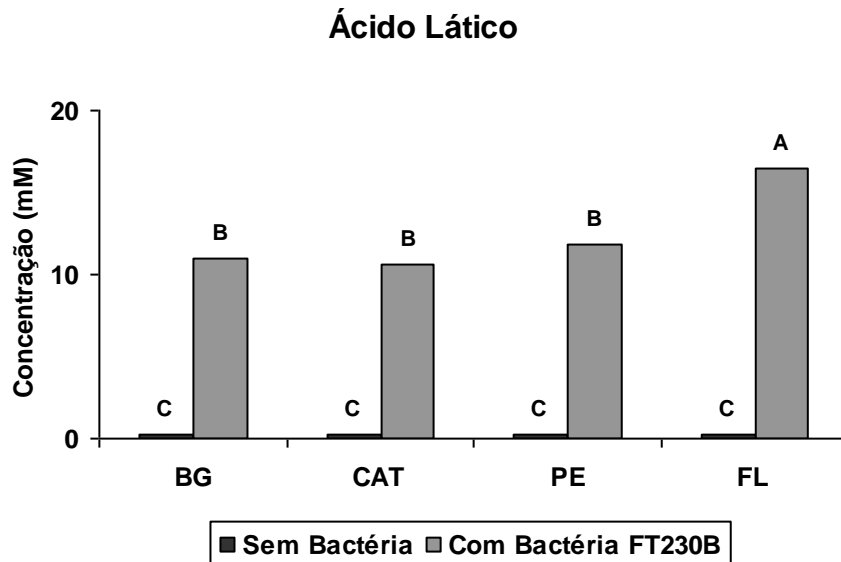


Figura 6 - Concentração (mM) de ácido lático no meio de crescimento após 24 horas de cultivo conjunto entre as leveduras industriais (BG-1, CAT-1 e PE-2) e a de panificação (Fleischmann) com a bactéria FT230B

Com relação ao ácido acético, não foi observado diferença significativa entre os tratamentos com e sem bactéria para nenhuma das linhagens de levedura quando foi feito o inóculo da bactéria homofermentativa (Figura 7). No caso da linhagem FT230B

(heterofermentativa), observou-se que no tratamento com bactéria, o meio de crescimento apresentou maiores quantidades de ácido acético quando comparado ao tratamento sem bactéria (Figura 8).

Tais resultados estão de acordo com o tipo de metabolismo de cada linhagem de *Lactobacillus*, uma vez que fermentações que resultam na formação de ácido láctico como produto majoritário são conduzidas por *Lactobacillus* do tipo homofermentativo, enquanto aquelas que apresentam, além do ácido láctico, etanol e/ou ácido acético como produtos principais, são realizadas por *Lactobacillus* com biotipo heterofermentativo (KANDLER, 1983).

No experimento com a linhagem homofermentativa, o tratamento com a levedura PE-2 e Fleischmann foram as que apresentaram menores teores de ácido acético em comparação com as demais leveduras (Figura 7), o que poderia indicar por sua vez uma diminuição da atividade metabólica desta linhagem de levedura por ação da bactéria homofermentativa, uma vez que o ácido acético deve estar sendo produzido exclusivamente pela levedura. Além disso, ocorreu novamente uma menor produção de ácido no experimento conduzido com a levedura CAT-1, em co-cultivo com a linhagem heterofermentativa (Figura 8), nestas condições refletindo uma menor atividade metabólica da bactéria heterofermentativa.

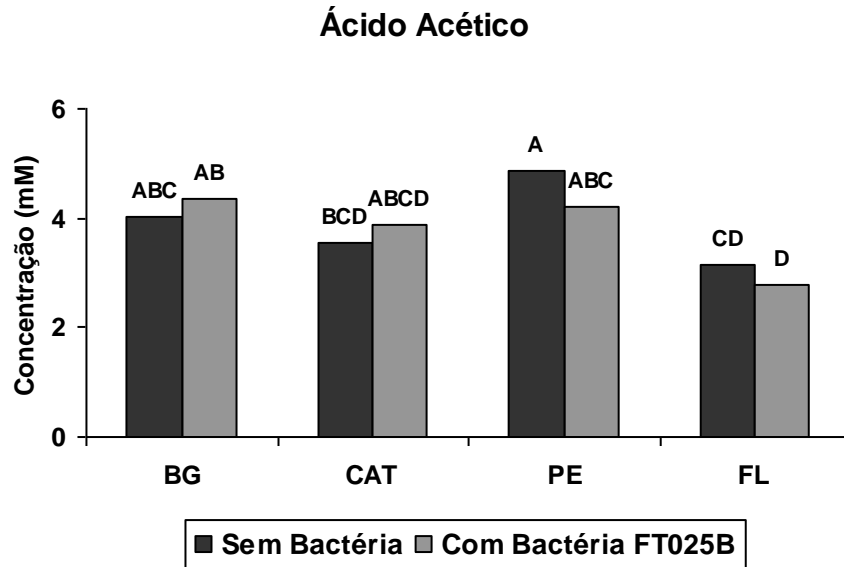


Figura 7 - Concentração (mM) de ácido acético no meio de crescimento após 24 horas de cultivo conjunto entre as leveduras industriais (BG-1, CAT-1 e PE-2) e a de panificação (Fleischmann) com a bactéria FT025B

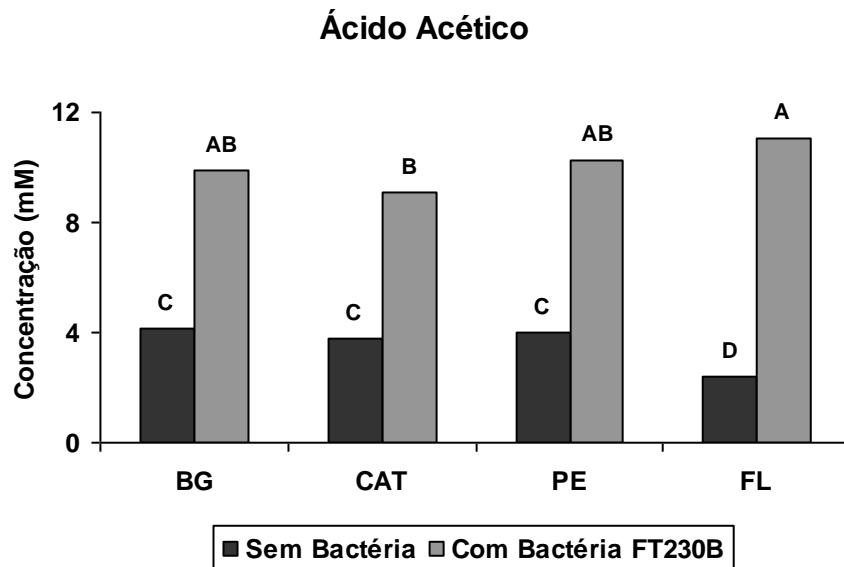


Figura 8 - Concentração (mM) de ácido acético no meio de crescimento após 24 horas de cultivo conjunto entre as leveduras industriais (BG-1, CAT-1 e PE-2) e a de panificação (Fleischmann) com a bactéria FT230B

O glicerol é produto secundário mais abundante da fermentação, sendo produzido em maiores quantidades quando a levedura se encontra em condições estressantes (ALVES, 1994 e ALVES, 2000). Sua produção implica em um desvio da



metabolização do açúcar, podendo afetar negativamente o rendimento fermentativo (OURA, 1977; ALVES, 1994).

Para a bactéria homofermentativa, a produção de glicerol foi significativamente menor no tratamento com bactéria para as 4 linhagens de leveduras (Figura 9). No caso da bactéria heterofermentativa, a produção deste composto foi mais elevada no tratamento com bactéria para todas a linhagens de leveduras analisadas, exceto para a linhagem PE-2 (Figura 10). Esta constatação deixa a intrigante dúvida se estaria ocorrendo consumo de glicerol pela bactéria homofermentativa, pois tem se estabelecido que a presença de bactérias lácticas em co-cultivos com leveduras resultam num aumento da produção de glicerol pelas últimas como uma estratégia de manter o balanço redox em situações de estresse (OURA, 1977; THOMAS et al., 2001; MEIGNEN et al., 2001).

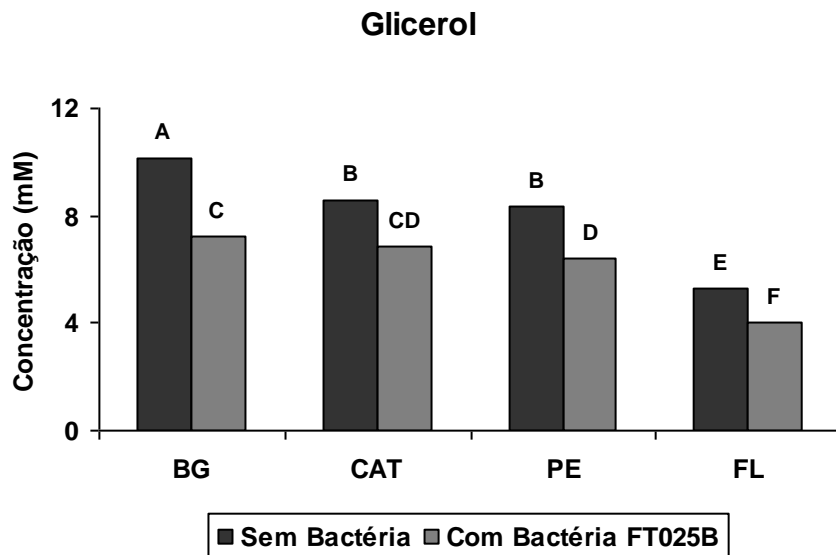


Figura 9 - Concentração (mM) de glicerol no meio de crescimento após 24 horas de cultivo conjunto entre as leveduras industriais (BG-1, CAT-1 e PE-2) e a de panificação (Fleischmann) com a bactéria FT025B

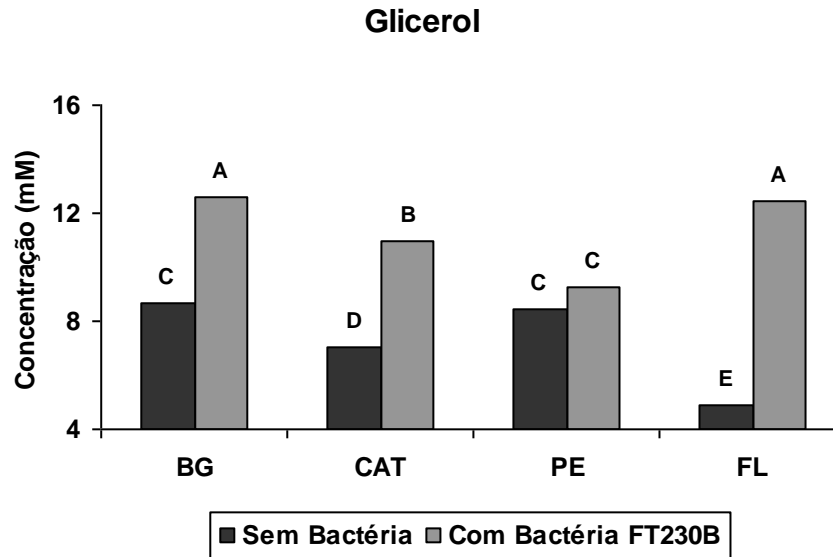


Figura 10 - Concentração (mM) de glicerol no meio de crescimento após 24 horas de cultivo conjunto entre as leveduras industriais (BG-1, CAT-1 e PE-2) e a de panificação (Fleischmann) com a bactéria FT230B

Os teores de etanol encontrados no meio de crescimento da maioria das leveduras foram significativamente menores na presença da bactéria para ambas as linhagens (homo e heterofermentativa) (Figuras 11 e 12). No entanto, observou-se que apenas para a levedura CAT-1 a produção de etanol não foi significativamente afetada pela presença de nenhum dos diferentes biotipos fermentativos de bactéria. O ânion lactato produzido por bactérias lácticas contaminantes tem sido registrado como o inibidor mais potente da produção de etanol por linhagens de leveduras (MAKANJUOLA et al., 1992; NARENDRANATH et al., 1997).

Como esperado, os níveis de manitol puderam ser detectados apenas na presença da bactéria heterofermentativa. Nos demais tratamentos (na ausência de bactérias e na presença da linhagem homofermentativa), não houve produção deste composto. A biossíntese de manitol em bactérias lácticas homofermentativas tem início com o intermediário da via glicolítica frutose 6-fosfato. Acredita-se que a produção de manitol seja uma via alternativa à formação de ácido láctico para a regeneração de NAD<sup>+</sup>. No caso das bactérias com metabolismo heterofermentativo, o manitol é o produto resultante da redução da frutose, a qual é catalisada pela enzima manitol desidrogenase NADH-dependente (VAN WEYMARN, 2002).

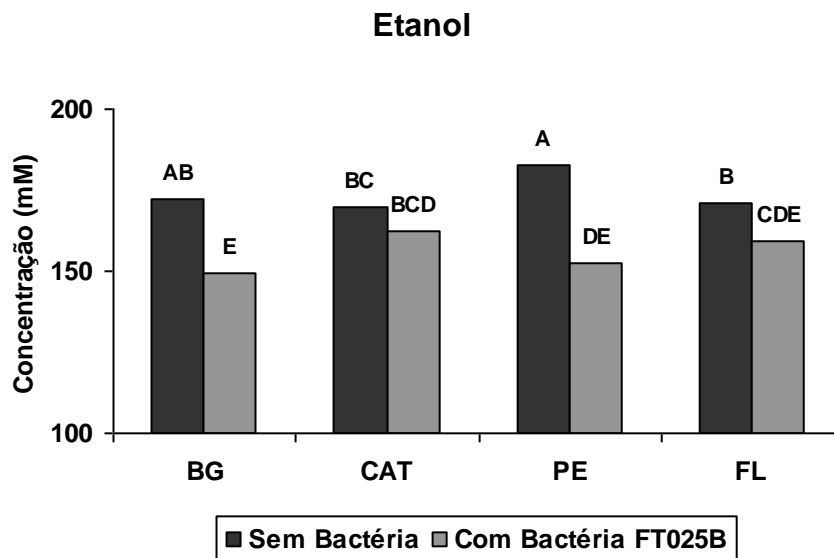


Figura 11 - Concentração (mM) de etanol no meio de crescimento após 24 horas de cultivo conjunto entre as leveduras industriais (BG-1, CAT-1 e PE-2) e a de panificação (Fleischmann) com a bactéria FT025B

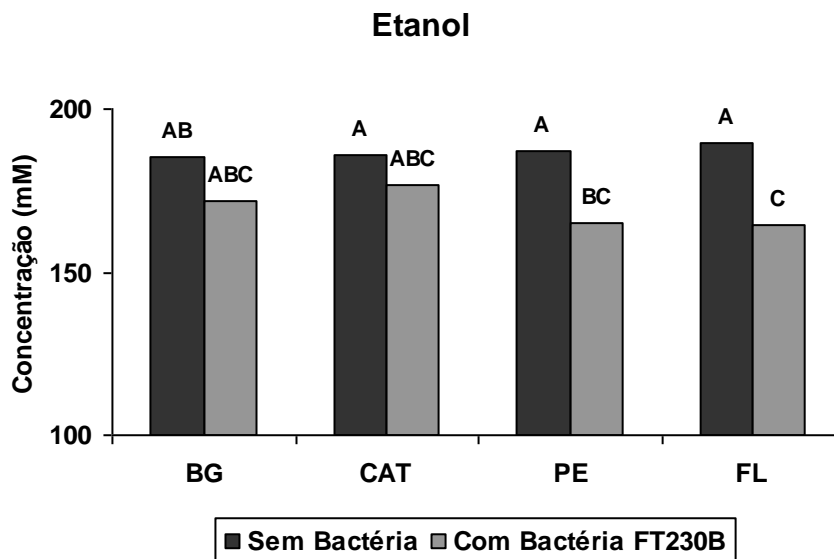


Figura 12 - Concentração (mM) de etanol no meio de crescimento após 24 horas de cultivo conjunto entre as leveduras industriais (BG-1, CAT-1 e PE-2) e a de panificação (Fleischmann) com a bactéria FT230B

#### 4.1.2 Experimentos suporte

Os experimentos a seguir (denominados de “experimentos suporte”) foram concebidos no intuito de verificar o efeito das duas linhagens de bactéria, com

metabolismos distintos, sobre cada linhagem de levedura, separadamente, de forma que os resultados observados nos experimentos anteriores fossem ou não comprovados. De acordo com os dados da Tabela 3, pode-se notar que a viabilidade das bactérias empregadas no presente estudo foi afetada de modo distinto para as duas linhagens. De uma forma geral, a viabilidade da linhagem FT025B (homofermentativa) mostrou-se reduzida em relação à linhagem FT230B (heterofermentativa), apesar do crescimento de ambas terem sido semelhantes.

Observou-se também que o crescimento e a viabilidade das 4 linhagens de levedura (BG-1, CAT-1, PE-2 e Fleischmann) avaliadas foram afetados de forma semelhante, sendo que no meio contendo a bactéria FT025B tais parâmetros foram menores do que no meio controle e no meio inoculado com a bactéria FT230B. Cabe ainda ressaltar que nos tratamentos inoculados com a linhagem bacteriana FT230B, as viabilidades das 4 leveduras permaneceram praticamente iguais às do tratamento controle (não-inoculado) ao final das 24 horas (Tabela 3).

Os valores médios de pH no meio após 24 horas de crescimento (Tabela 3) foram distintos para os 4 tratamentos. No meio controle, ou seja, no meio não inoculado com bactéria, observou-se valores mais elevados de pH para as 4 linhagens de levedura. No caso dos meios inoculados com bactérias, foi detectado um padrão nos valores finais de pH do meio de crescimento, no qual a presença da linhagem bacteriana FT025B propiciou diminuição mais acentuada no referido parâmetro que na presença da linhagem FT230B.

Tabela 3 - Populações iniciais e finais (24 horas) de leveduras e bactérias, bem como suas respectivas viabilidades e valores de pH do meio MBL após 24 horas de crescimento

Tratamento	Bactérias ( $10^7$ cél.mL <sup>-1</sup> )		Viab (%)	Leveduras ( $10^7$ cél.mL <sup>-1</sup> )		Viab (%)	pH
	0 h	24 h <sup>a</sup>		0 h	24 h <sup>a</sup>		
<b>BG-1</b>	-	-	-	1,2	8,9 A	97 A	4,7 A
<b>BG-1/025</b>	1,2	36 A	22 B	1,2	7,6 B	55 B	3,7 C
<b>BG-1/230</b>	0,7	23 A	61 A	1,2	6,9 A	96 A	4,3 B
<b>CAT-1</b>	-	-	-	1,1	6,4 A	99 A	4,9 A
<b>CAT-1/025</b>	1	71 A	22 B	1,1	6,5 B	65 B	3,5 C
<b>CAT-1/230</b>	0,6	48 A	53 A	1,1	6,5 A	97 A	4,2 B
<b>PE-2</b>	-	-	-	1,2	11,1 A	99 A	4,8 A
<b>PE-2/025</b>	1,5	74 A	30 B	1,2	8,5 B	60 B	3,4 C
<b>PE-2/230</b>	1,1	87 A	69 A	1,2	6,4 B	97 A	3,7 B
<b>FL</b>	-	-	-	0,5	5,3 A	90 A	4,9 A
<b>FL/025</b>	0,9	37 A	19 B	0,5	5,2 B	29 C	3,6 C
<b>FL/230</b>	0,8	39 A	75 A	0,5	5,2 A	88 B	4,0 B

<sup>a</sup>População de células totais (vivas + mortas)

Em relação aos principais ácidos orgânicos presentes no meio de crescimento, pode-se notar que a produção de ácido succínico foi semelhante nos 3 tratamentos para todas as linhagens de leveduras analisadas (Figuras 13, 14, 15 e 16), restringindo-se a teores de 0,7 a 1,1mM do referido ácido no meio. No entanto, os teores dos ácidos láctico e acético diferiram de acordo com a bactéria inoculada. Enquanto os níveis de ácido láctico foram superiores na presença da bactéria FT025B (homofermentativa), os teores de ácido acético foram maiores nos meios inoculados com a linhagem FT230B (heterofermentativa).

De acordo com Narendranath et al. (1997), a taxa de mortalidade das bactérias contaminantes foi maior com o aumento na concentração final de ácido láctico quando este se encontrava na presença de etanol. Isto sugere que o etanol age sinergisticamente com o ácido láctico e que a toxicidade do etanol é aumentada pela diminuição do pH causada por este ácido no meio. O crescimento das linhagens heterofermentativas medido indiretamente por densidade ótica foi menor que o crescimento das cepas homofermentativas, as quais, via glicólise, produziram 2 vezes mais ATP por molécula de glicose fermentada. Tais resultados ainda estão de acordo com Gottschalk (1979), o qual sugere que em bactérias com crescimento anaeróbio,

ocorre uma produção duas vezes maior de ácido láctico por bactérias homofermentativas que pelas heterofermentativas. O efeito sinérgico entre ácido láctico e etanol pode ter sido a principal causa da elevada mortalidade observada não apenas entre as bactérias homofermentativas, mas também para todas as linhagens de leveduras em cultivo conjunto com este biotipo bacteriano.

Os valores médios nos teores de glicerol no meio após 24 horas de crescimento (Figuras 13, 14, 15 e 16) foram maiores na presença da bactéria FT230B para todas as linhagens de levedura analisadas. Como esperado, detectou-se a presença de manitol nos meios inoculados com a linhagem heterofermentativa (FT230B). Por fim, os níveis de etanol foram significativamente menores na presença de ambas as bactérias, não havendo diferença estatística para tal parâmetro entre as mesmas (Figuras 17, 18, 19 e 20).

Estes resultados também estão de acordo com Narendranath et al. (1997), onde se observou, na presença de contaminantes, diminuição no crescimento máximo das leveduras, na concentração final de etanol e no pH final. O total de células de leveduras alcançaram o máximo após 24 horas de fermentação e a seguir começaram a declinar.

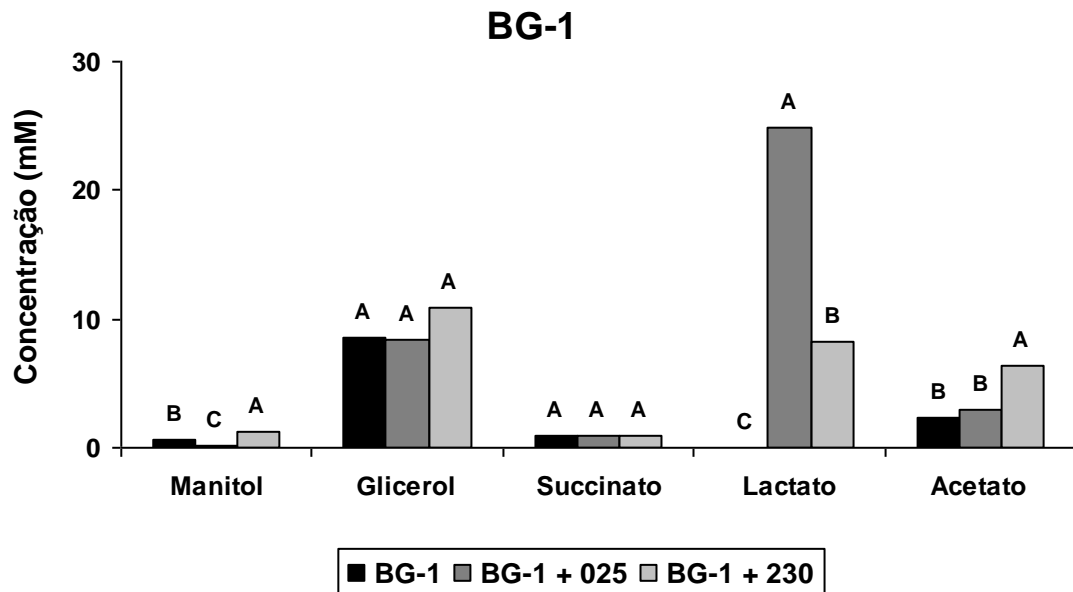


Figura 13 - Concentrações (mM) de manitol, succinato, glicerol, lactato e acetato no meio de crescimento após 24 horas de cultivo conjunto entre a levedura BG-1 e as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230)

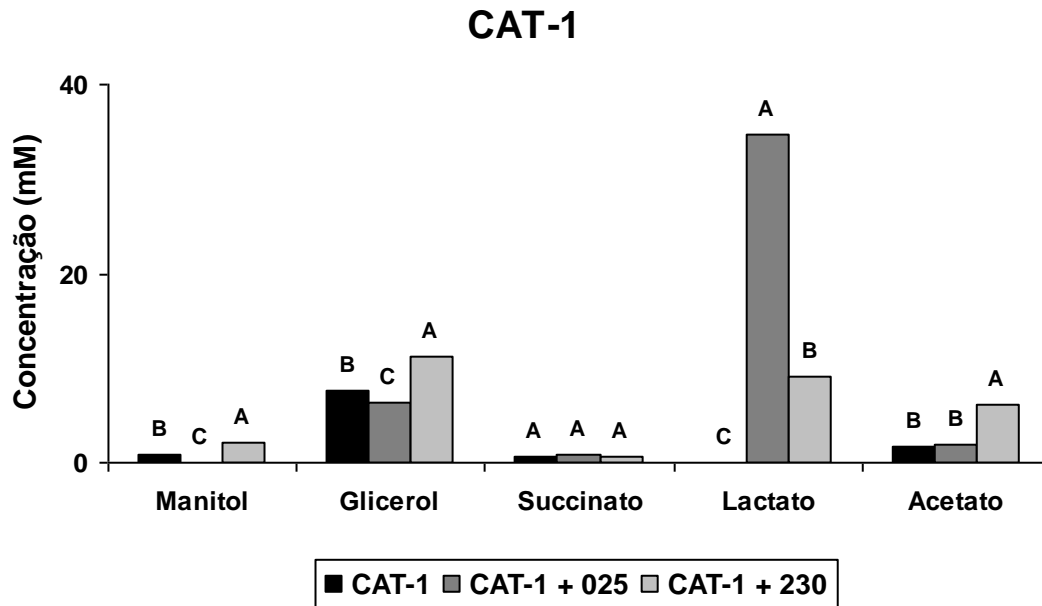


Figura 14 - Concentrações (mM) de manitol, succinato, glicerol, lactato e acetato no meio de crescimento após 24 horas de cultivo conjunto entre a levedura CAT-1 e as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230)

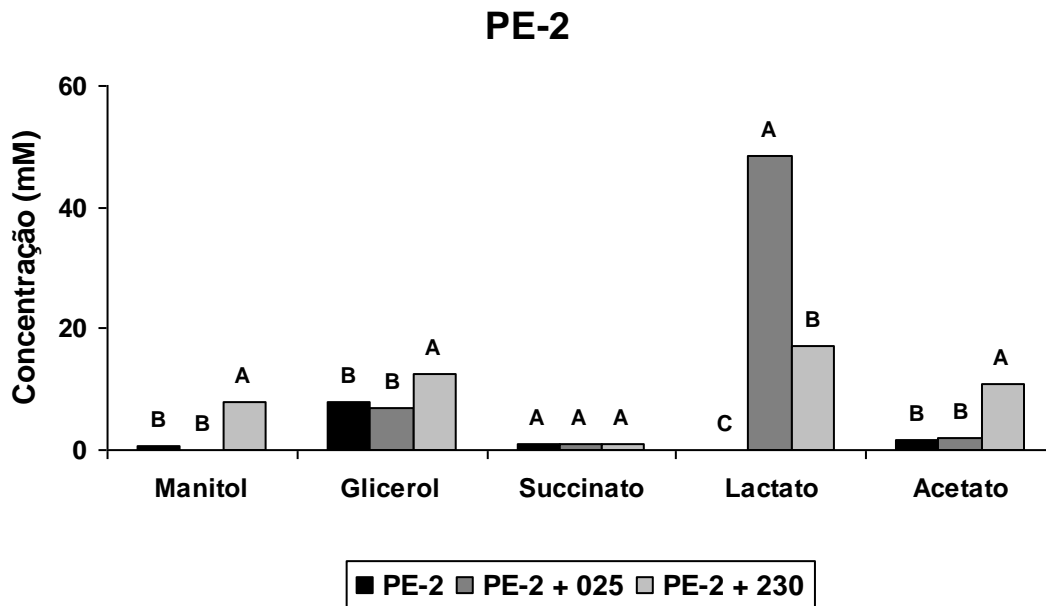


Figura 15 - Concentrações (mM) de manitol, succinato, glicerol, lactato e acetato no meio de crescimento após 24 horas de cultivo conjunto entre a levedura PE-2 e as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230)

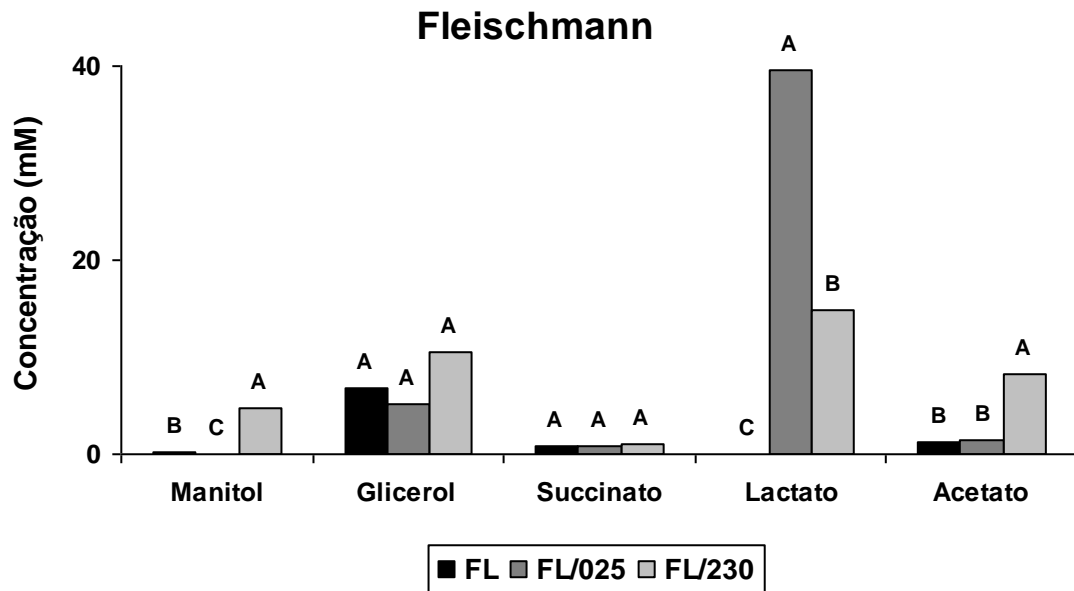


Figura 16 - Concentrações (mM) de manitol, succinato, glicerol, lactato e acetato no meio de crescimento após 24 horas de cultivo conjunto entre a levedura de panificação Fleischmann e as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230)

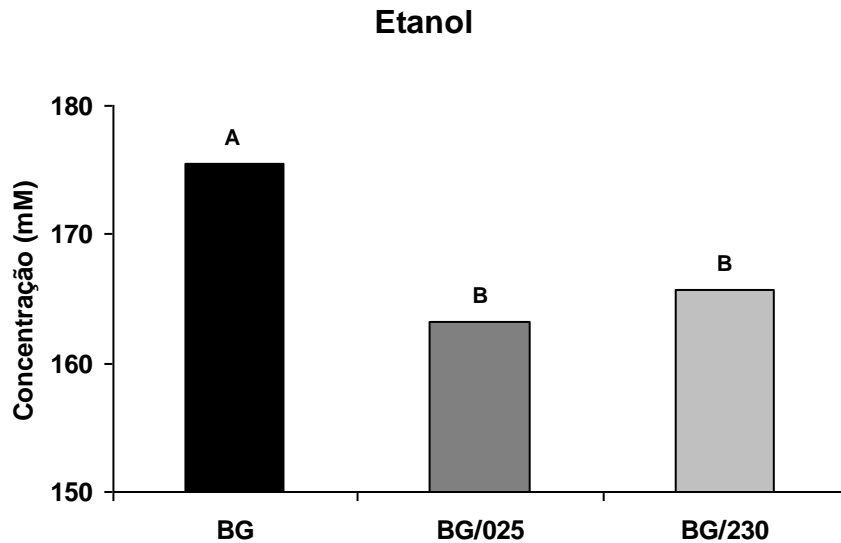


Figura 17 - Concentrações (mM) de etanol no meio de crescimento após 24 horas de cultivo conjunto entre a levedura BG-1 e as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230)



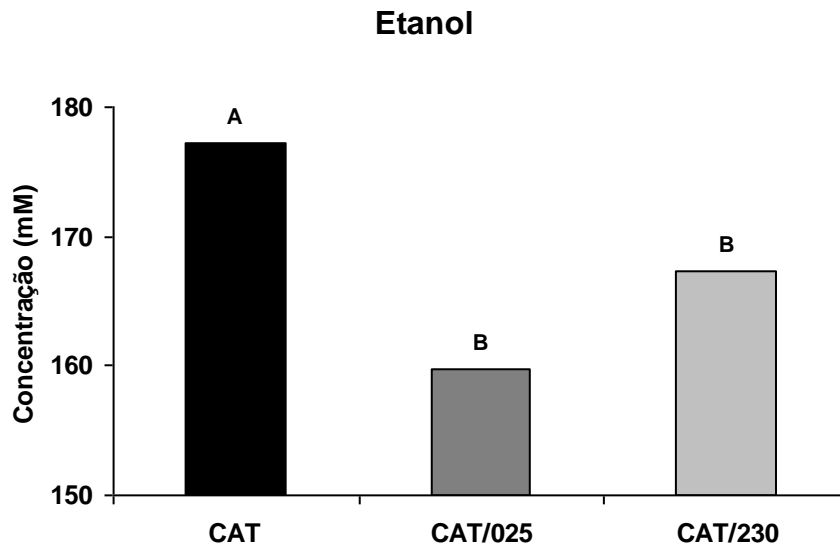


Figura 18 - Concentrações (mM) de etanol no meio de crescimento após 24 horas de cultivo conjunto entre a levedura CAT-1 e as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230)

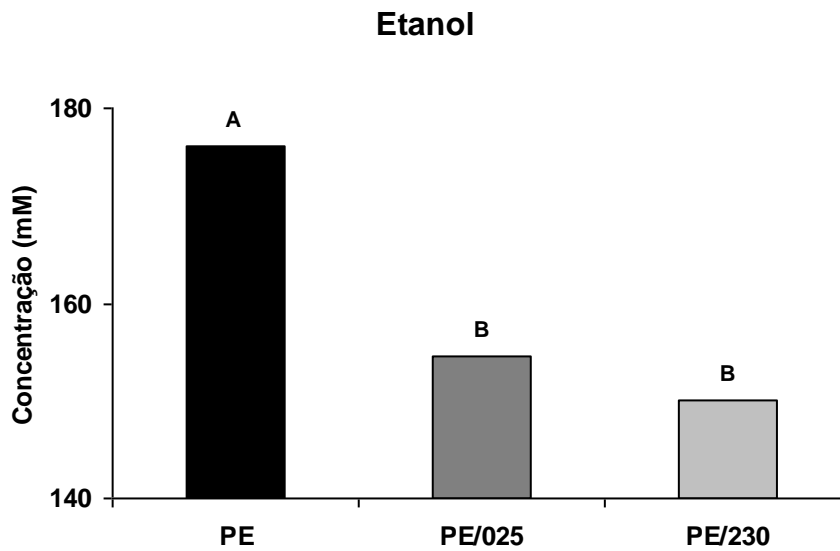


Figura 19 - Concentrações (mM) de etanol no meio de crescimento após 24 horas de cultivo conjunto entre a levedura PE-2 e as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230)

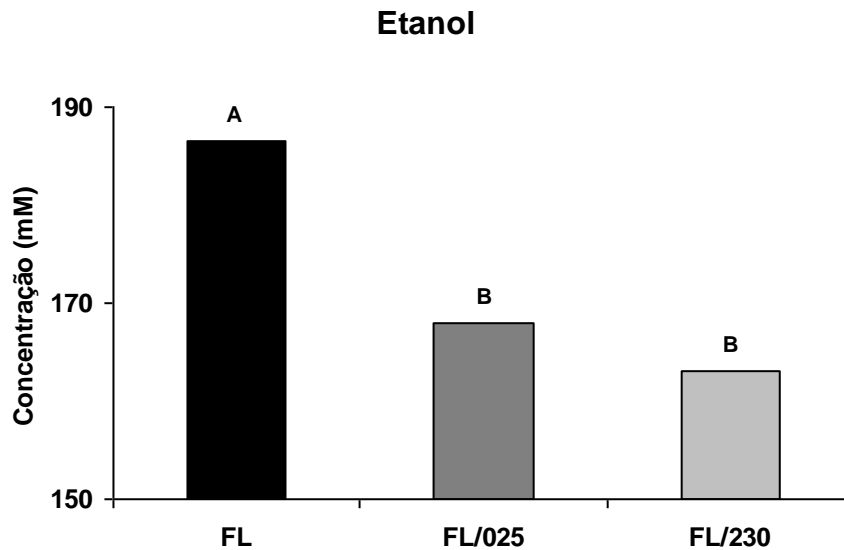


Figura 20 - Concentrações (mM) de etanol no meio de crescimento após 24 horas de cultivo conjunto entre a levedura de panificação Fleischmann e as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230)

#### 4.2 Experimento II (simulando condições industriais)

No ensaio realizado com a levedura CAT-1 foram utilizadas apenas duas linhagens bacterianas, sendo uma homofermentativa (FT025B) e uma heterofermentativa (FT230B), as mesmas utilizadas nos experimentos anteriores. Para experimentos com as demais leveduras (BG-1, PE-2 e Fleischmann) incluiu-se mais uma linhagem de bactéria floculante e também heterofermentativa, a linhagem FT432B.

Em todos os experimentos observou-se que a presença das linhagens de bactérias praticamente não afetou a viabilidade das leveduras industriais (BG-1, CAT-1 e PE-2) durante os ciclos fermentativos (Figuras 21, 22, 23 e 24). Apenas a linhagem de panificação, Fleischmann, apresentou diminuição na viabilidade na presença das bactérias nos dois últimos ciclos fermentativos. Tendência similar ocorreu com o brotamento, o qual não apresentou uma tendência à diminuição na presença de nenhuma das linhagens bacterianas (Figuras 25, 26, 27 e 28).

Cherubin (2003) num experimento comparativo entre linhagens de *S. cerevisiae* em cultura pura e em cultura mista com a bactéria *L. fermentum* durante 6 ciclos

fermentativos constatou que não houve relação entre contaminação bacteriana e viabilidade de levedura, nem entre contaminação bacteriana e rendimento fermentativo.

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

Thomas et al. (2001) pesquisaram o efeito de algumas espécies de *Lactobacillus* (*L. collinoides*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. paracasei*) em cultura mista com *S. cerevisiae* durante 6 ciclos de fermentação em batelada de mosto à base de milho e relataram que a presença das bactérias, pré-inoculadas no mosto 24 horas antes da inoculação das leveduras, ocasionou decréscimo acima de 22% na produção de etanol, aumento do desvio de carboidratos para a produção de glicerol e ácido láctico, queda de 55% na viabilidade da levedura e redução na formação de massa celular de levedura. Contudo, quando as bactérias foram inoculadas ao mesmo tempo e com o mesmo nível, de  $10^7$  células.mL<sup>-1</sup> que as leveduras, os parâmetros citados não foram significativamente afetados.

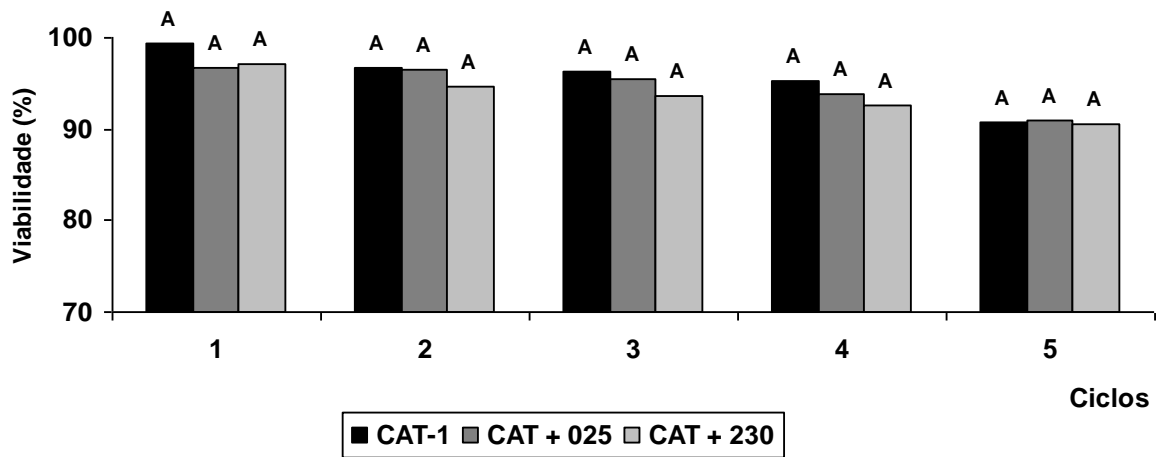


Figura 21 - Valores percentuais de viabilidade para a levedura CAT-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230) durante os cinco reciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de significância, dentro de cada ciclo

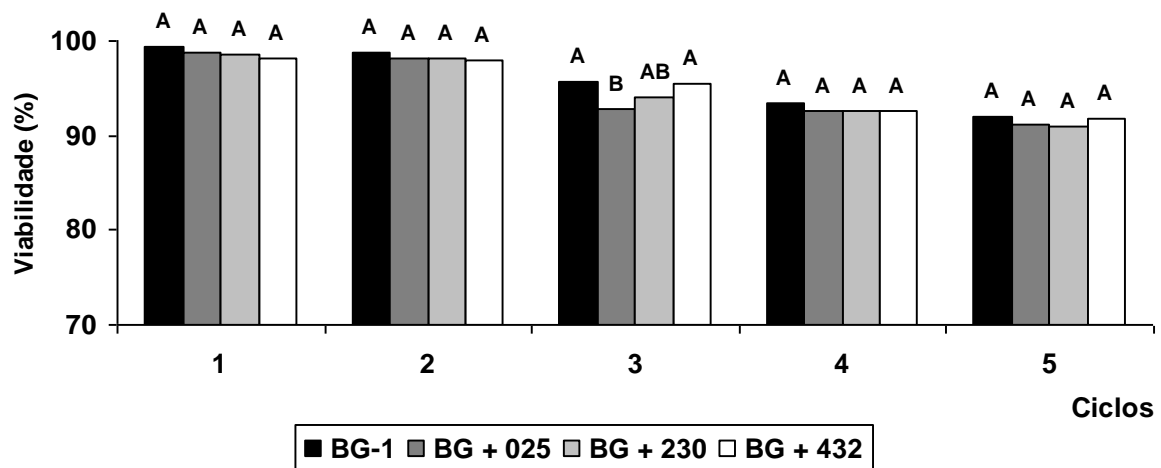


Figura 22 - Valores percentuais de viabilidade para a levedura BG-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco reciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de significância, dentro de cada ciclo

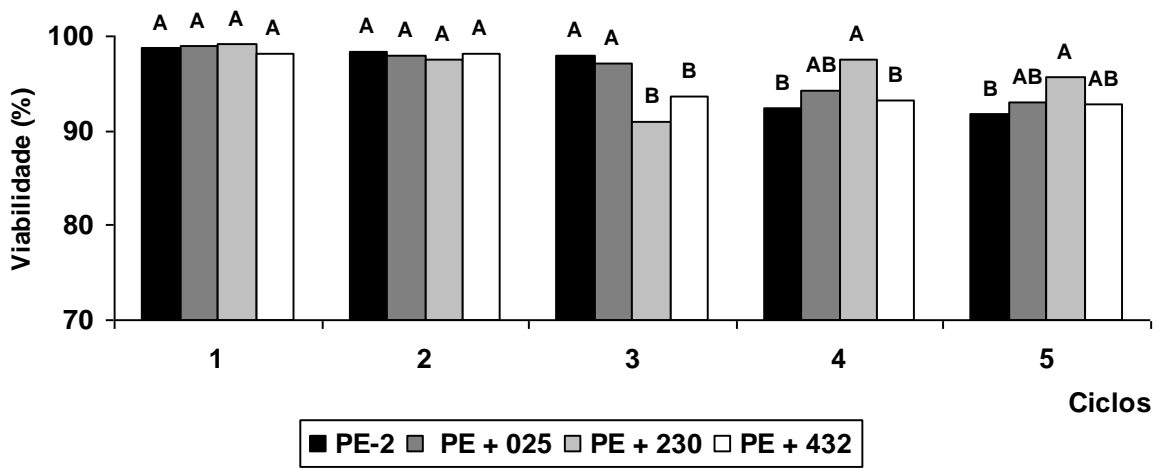


Figura 23 - Valores percentuais de viabilidade para a levedura PE-2 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco reciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de significância, dentro de cada ciclo

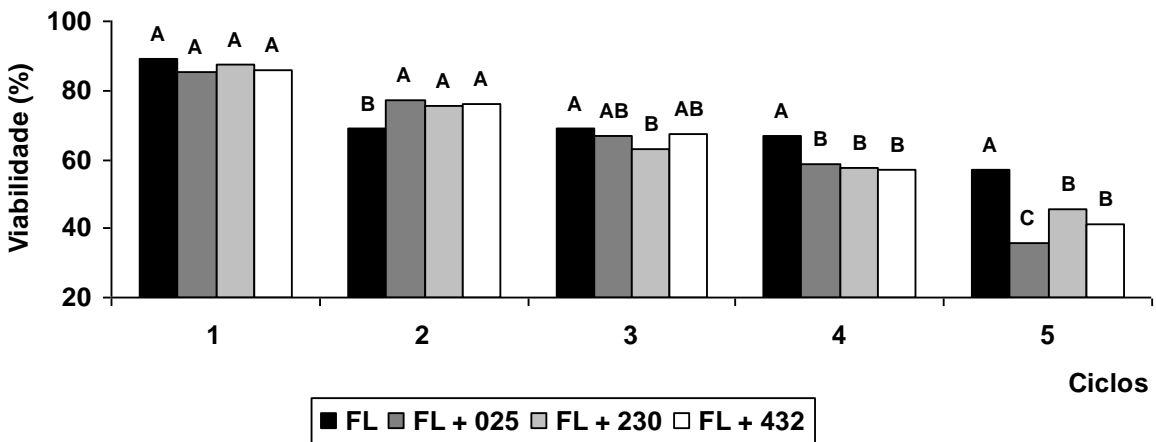


Figura 24 - Valores percentuais de viabilidade para a levedura de panificação Fleischmann em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco reciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

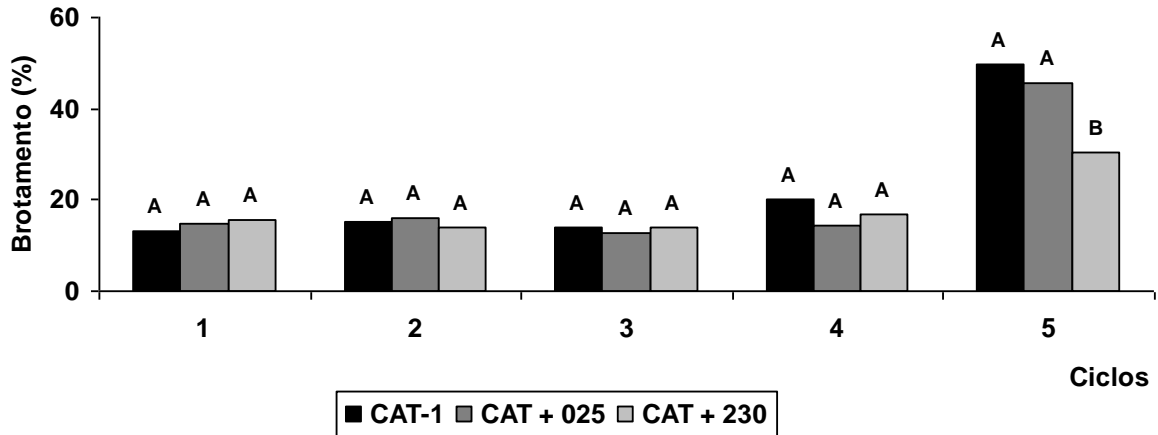


Figura 25 - Valores percentuais de brotamento para a levedura CAT-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

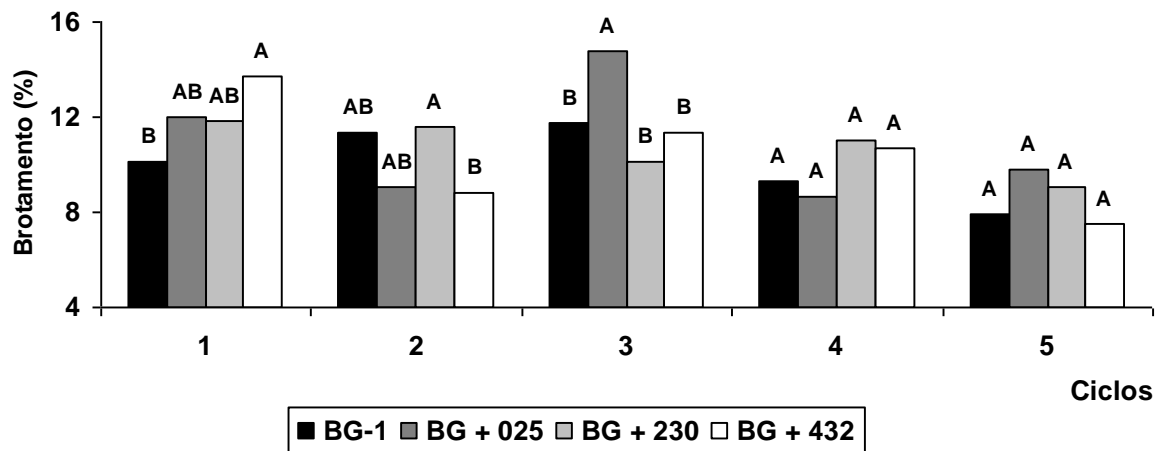


Figura 26 - Valores percentuais de brotamento para a levedura BG-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

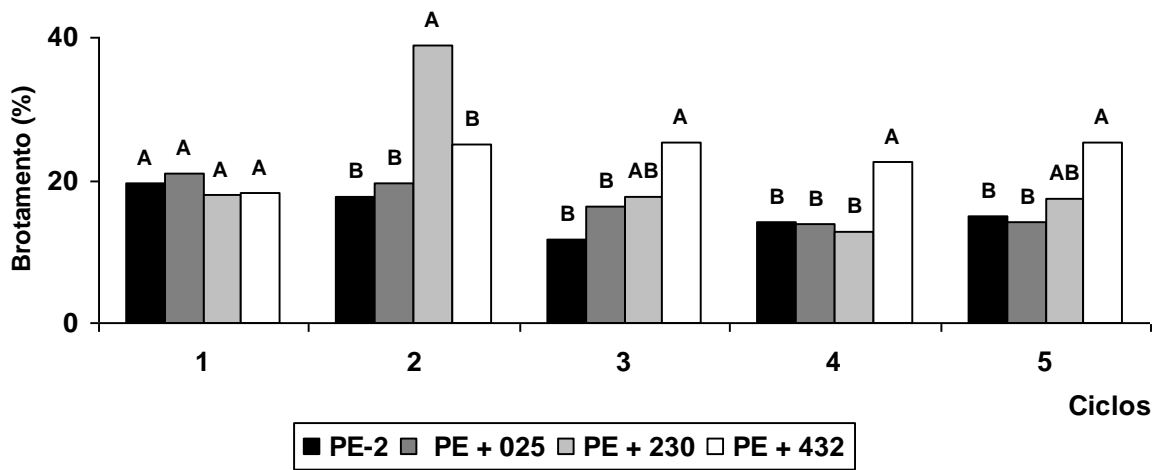


Figura 27 - Valores percentuais de brotamento para a levedura PE-2 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

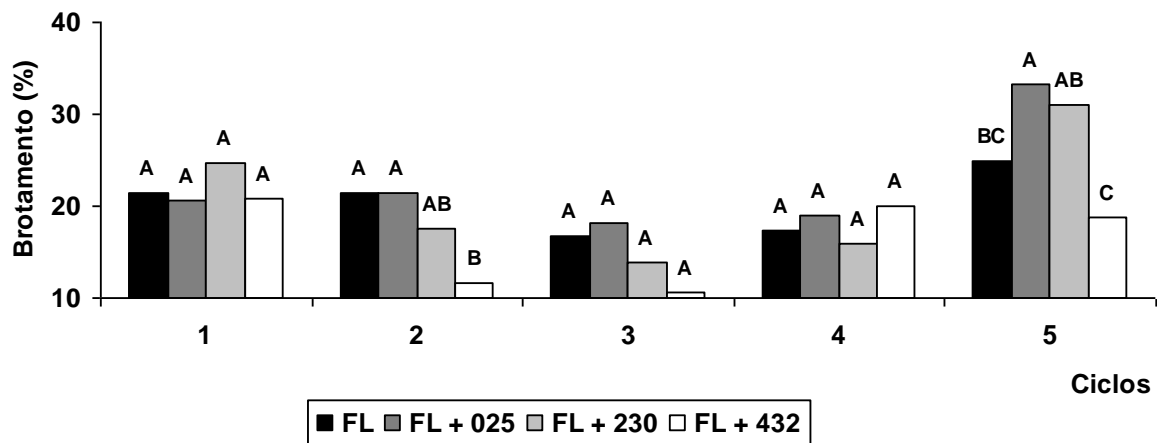


Figura 28 - Valores percentuais de brotamento para a levedura de panificação Fleischmann em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

No entanto, ao contrário do que foi observado no Experimento I, sob condições de simulação do processo industrial de produção de etanol combustível a linhagem bacteriana heterofermentativa apresentou maior crescimento em co-cultivo com as leveduras que a linhagem homofermentativa. O mesmo resultado foi obtido em ambas as metodologias de contagem de células bacterianas (Contagem ao Microscópio Óptico e Microplaqueamento em Gotas) e nos cinco ciclos fermentativos (Figuras 29, 30, 31, 32 e 33, 34, 35, 36). Apenas a contagem pelo Microplaqueamento em Gotas no experimento com a levedura de panificação Fleischmann apresentou um desvio nos resultados anteriores, uma vez que a população de células da linhagem FT432B foi menor que a da homofermentativa em todos os ciclos (Figura 36). O metabolismo bacteriano heterofermentativo é caracterizado pela produção de outros subprodutos além do ácido lático, como o ácido acético, o CO<sub>2</sub> e o etanol (KANDLER, 1983). A partir dessas considerações, pode-se sugerir que as linhagens bacterianas heterofermentativas empregadas neste estudo foram capazes de resistir melhor aos elevados teores de etanol excretados pelas leveduras e encontrados no processo industrial, já que elas também são capazes de produzir tal composto. Por outro lado, microrganismos com metabolismo homofermentativo podem estar mais susceptíveis quando presentes em condições de alto teor alcoólico.



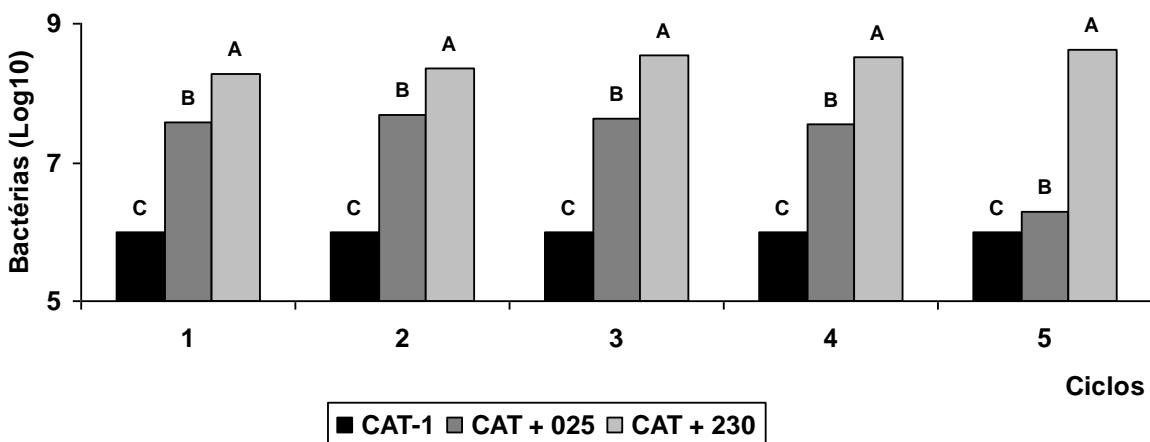


Figura 29 - População de células bacterianas (log células.mL<sup>-1</sup> de vinho) para a levedura CAT-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

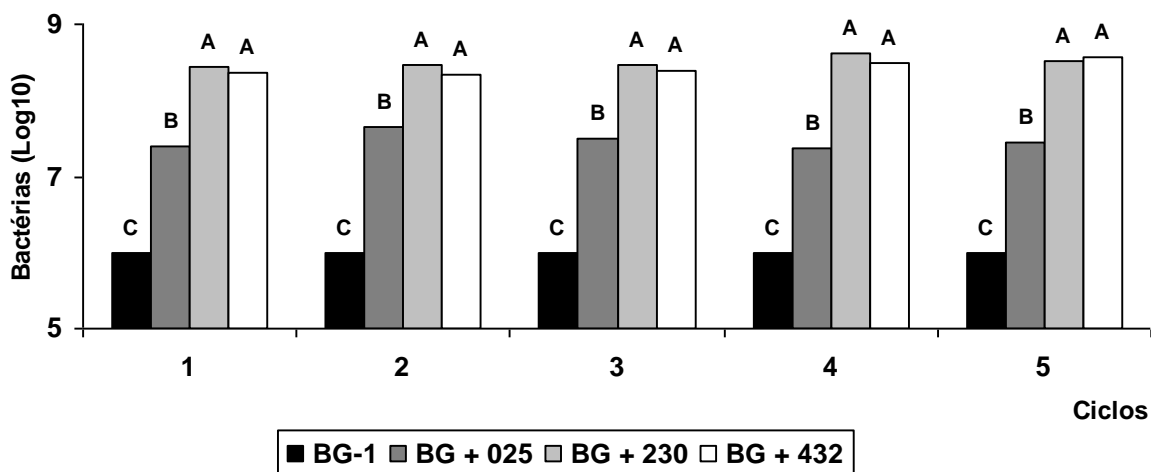


Figura 30 - População de células bacterianas (log células.mL<sup>-1</sup> de vinho) para a levedura BG-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

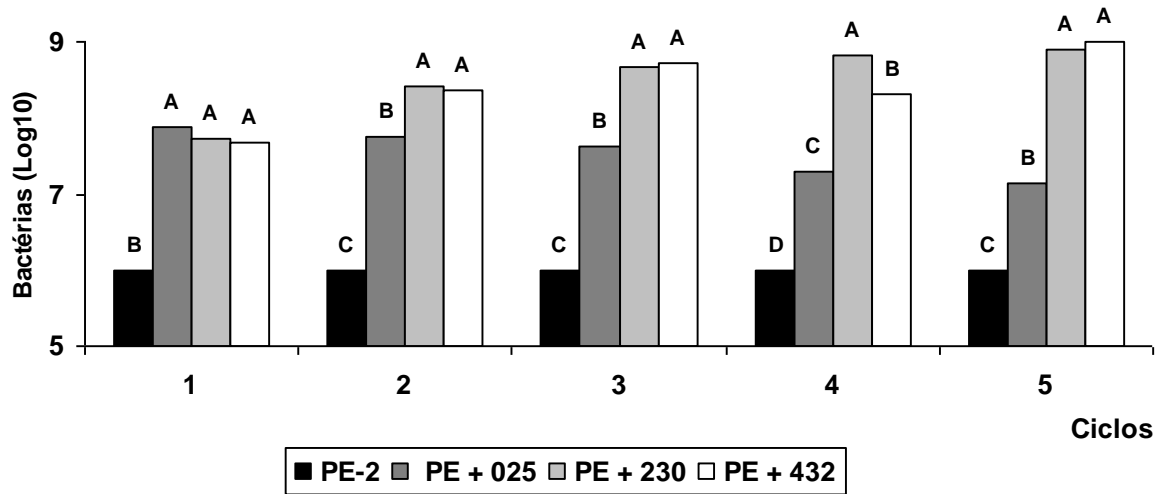


Figura 31 - População de células bacterianas (log células.mL<sup>-1</sup> de vinho) para a levedura PE-2 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco reciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

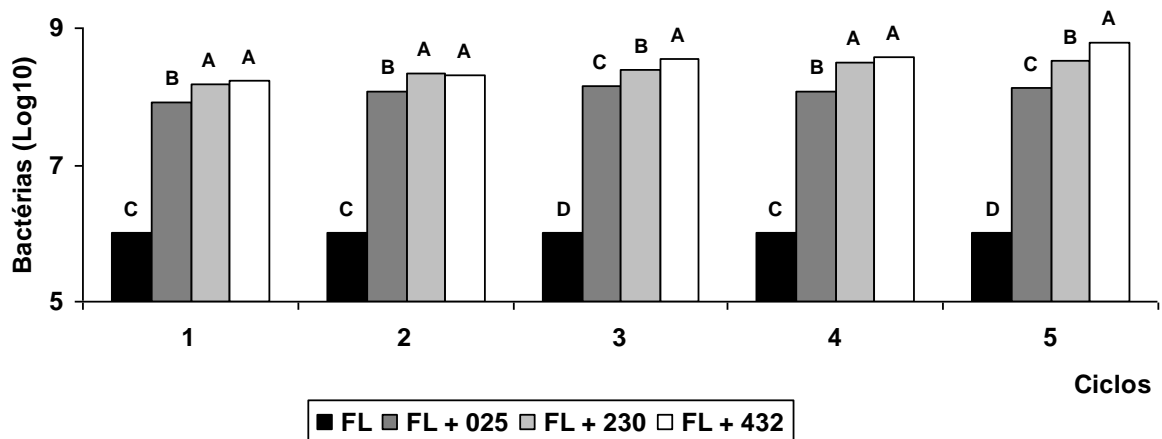


Figura 32 - População de células bacterianas (log células.mL<sup>-1</sup> de vinho) para a levedura de panificação Fleischmann em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco reciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

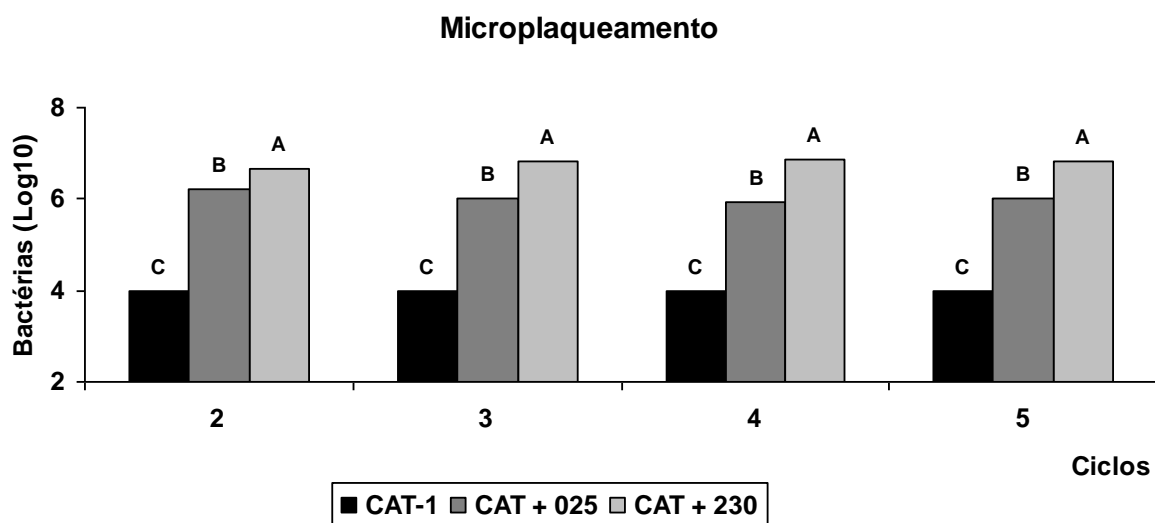


Figura 33 - População de células bacterianas (UFC.mL<sup>-1</sup>) para a levedura CAT-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230) do segundo ao quinto reciclo fermentativo. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

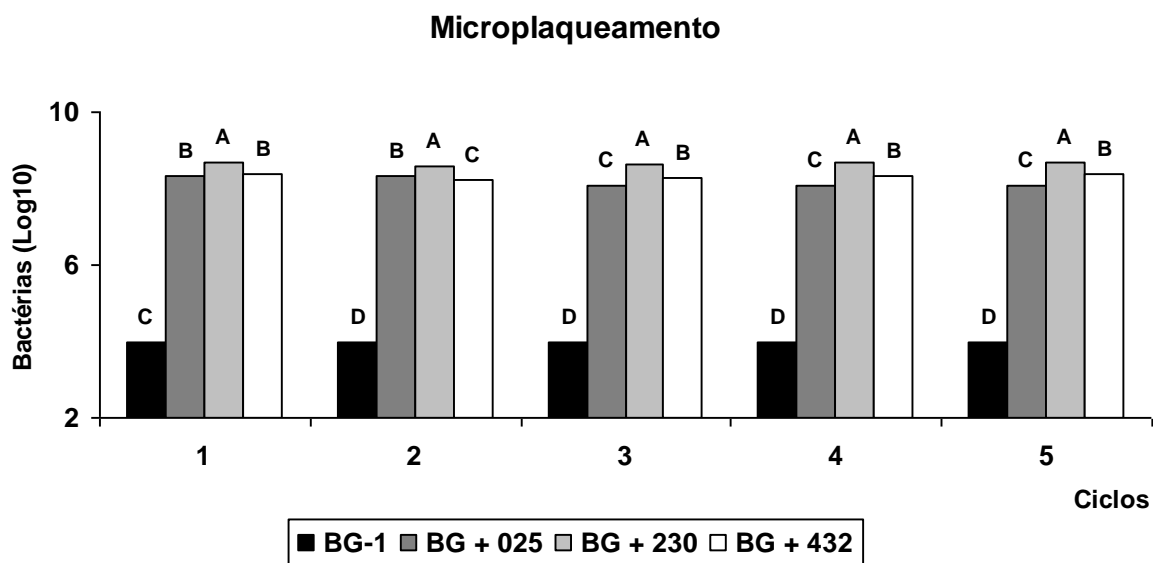


Figura 34 - População de células bacterianas (UFC.mL<sup>-1</sup>) para a levedura BG-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco reciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

### Microplaqueamento

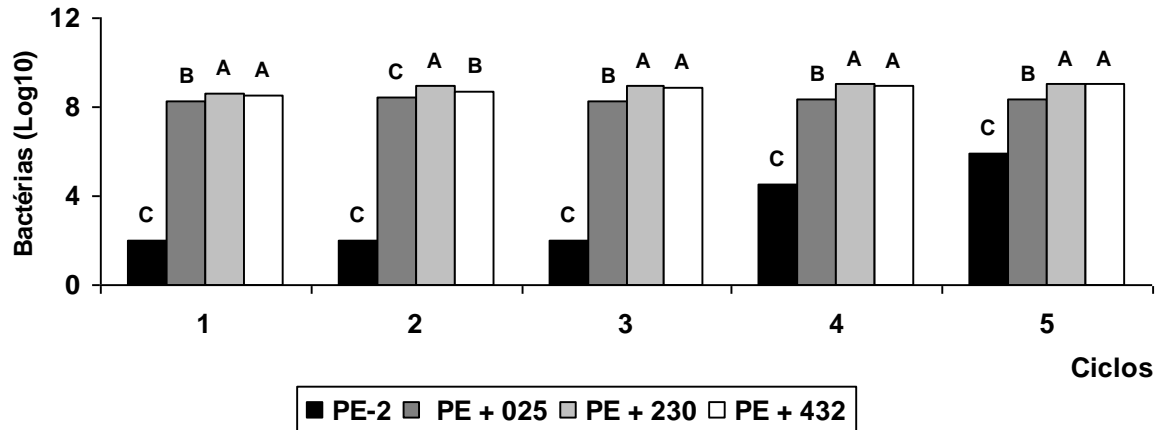


Figura 35 - População de células bacterianas (UFC.mL<sup>-1</sup>) para a levedura PE-2 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

### Microplaqueamento

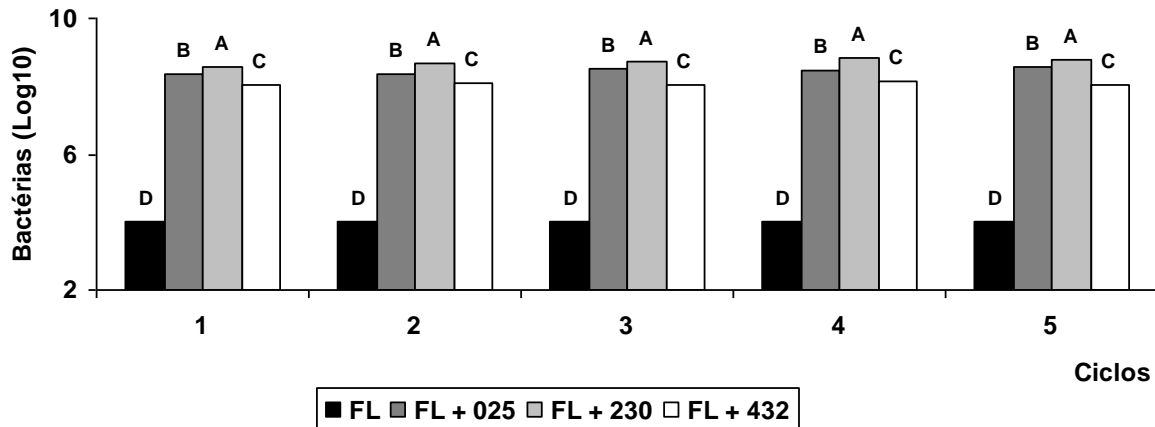


Figura 36 - População de células bacterianas (UFC.mL<sup>-1</sup>) para a levedura de panificação Fleischmann em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

Além de apresentar maior crescimento, as linhagens heterofermentativas apresentaram maiores porcentagens de viabilidade celular quando comparadas com a

homofermentativa, em todos os ciclos (Figuras 37, 38 e 39). Mesmo para a levedura Fleischmann, onde a contagem pelo Microplaqueamento em Gotas revelou menor crescimento para uma das linhagens heterofermentativas (FT432B) em comparação com a homofermentativa, a viabilidade celular bacteriana seguiu o mesmo padrão das demais linhagens de leveduras (Figura 40). No gráfico da levedura CAT-1 (Figura 37) ainda é possível perceber a queda da viabilidade da linhagem bacteriana homofermentativa, enquanto a viabilidade da bactéria heterofermentativa permanece praticamente constante no decorrer dos ciclos fermentativos. Estes resultados confirmam a maior resistência (maior crescimento e viabilidade bacteriana) da linhagem heterofermentativa em condições semelhantes às encontradas no processo industrial de produção de etanol, ao contrário do que foi observado em condições de laboratório, onde a linhagem homofermentativa obteve maior resistência.

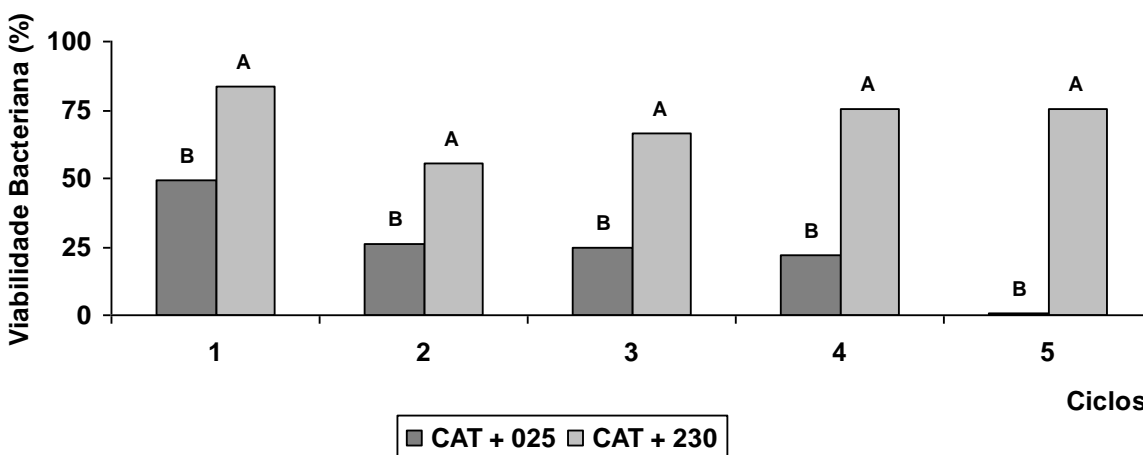


Figura 37 - Valores percentuais de viabilidade das bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230) em cultivo conjunto com a levedura CAT-1 durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

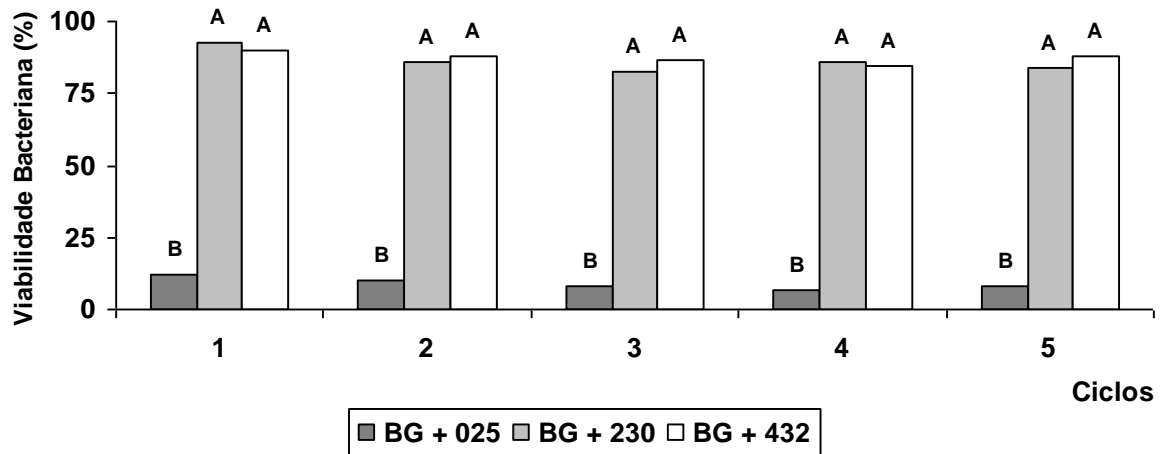


Figura 38 - Valores percentuais de viabilidade das bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) em cultivo conjunto com a levedura BG-1 durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

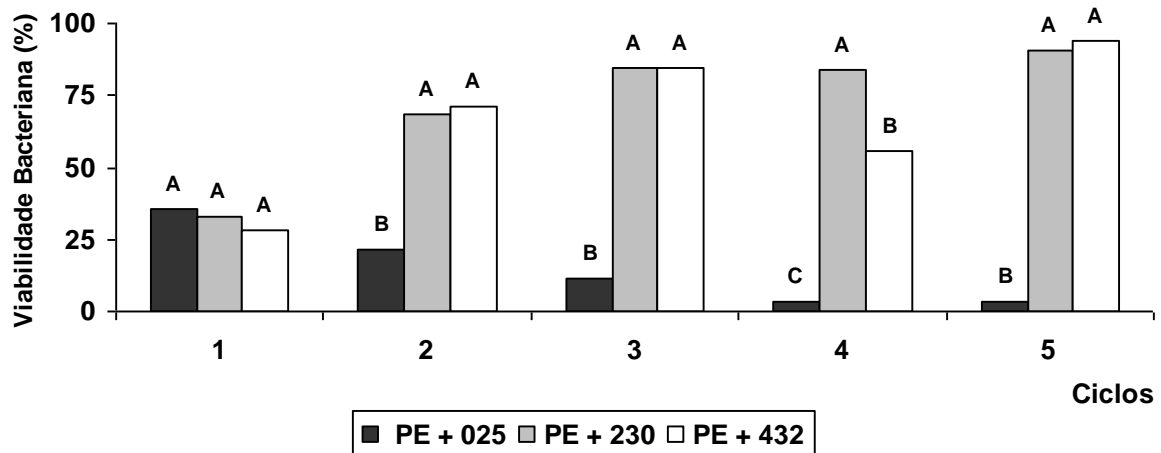


Figura 39 - Valores percentuais de viabilidade das bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) em cultivo conjunto com a levedura PE-2 durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

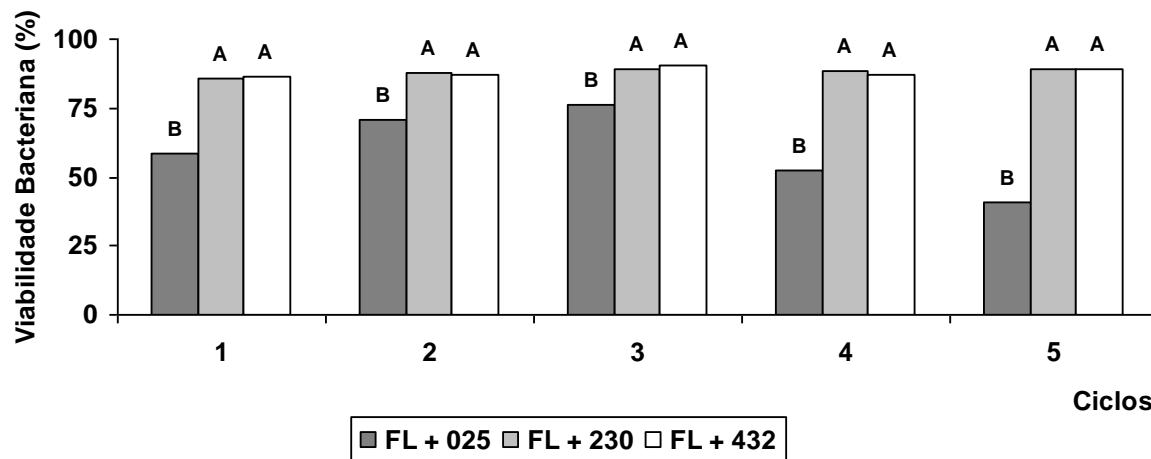


Figura 40 - Valores percentuais de viabilidade das bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) em cultivo conjunto com a levedura de panificação Fleischmann durante os cinco reciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

Com relação à formação de biomassa, a levedura CAT-1 apresentou queda na formação quando as bactérias, tanto homo quanto heterofermentativas, estavam presentes (Figura 41). Para as demais linhagens de leveduras, não se observou diminuição na formação de biomassa na presença da contaminação bacteriana. Em alguns casos, como por exemplo no experimento com a levedura BG-1 e em alguns ciclos do ensaio com a PE-2, os maiores valores de biomassa obtidos foram no tratamento com a linhagem homofermentativa (Figuras 42, 43 e 44).

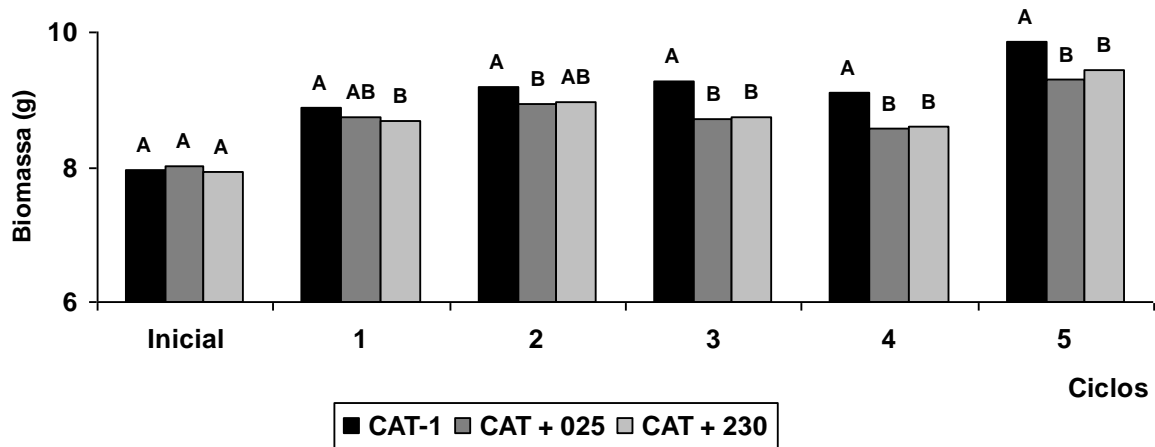


Figura 41 - Valores (em gramas) de biomassa para a levedura CAT-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

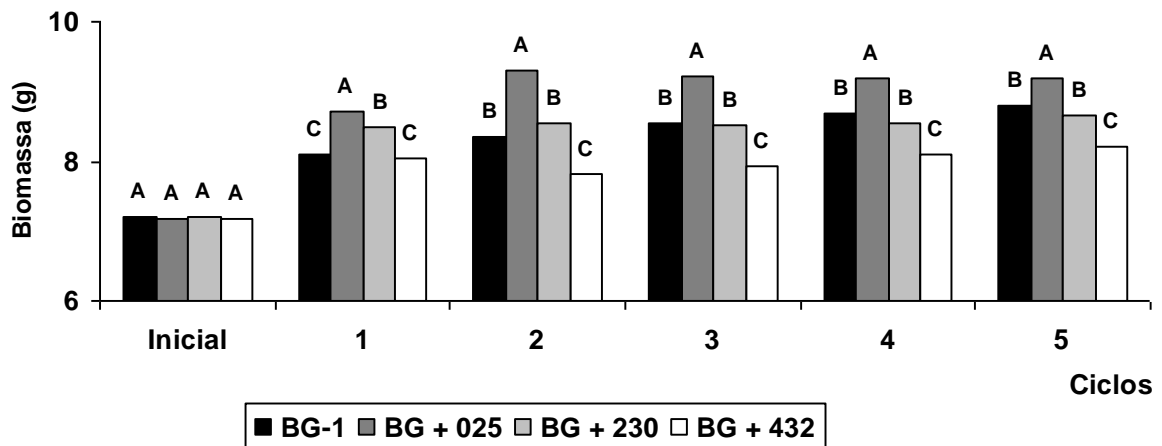


Figura 42 - Valores (em gramas) de biomassa para a levedura BG-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo



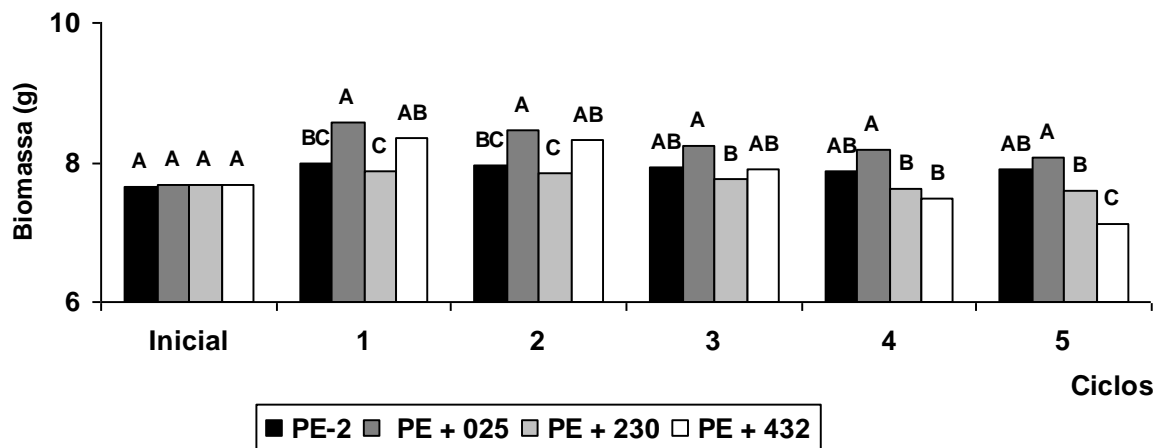


Figura 43 - Valores (em gramas) de biomassa para a levedura PE-2 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

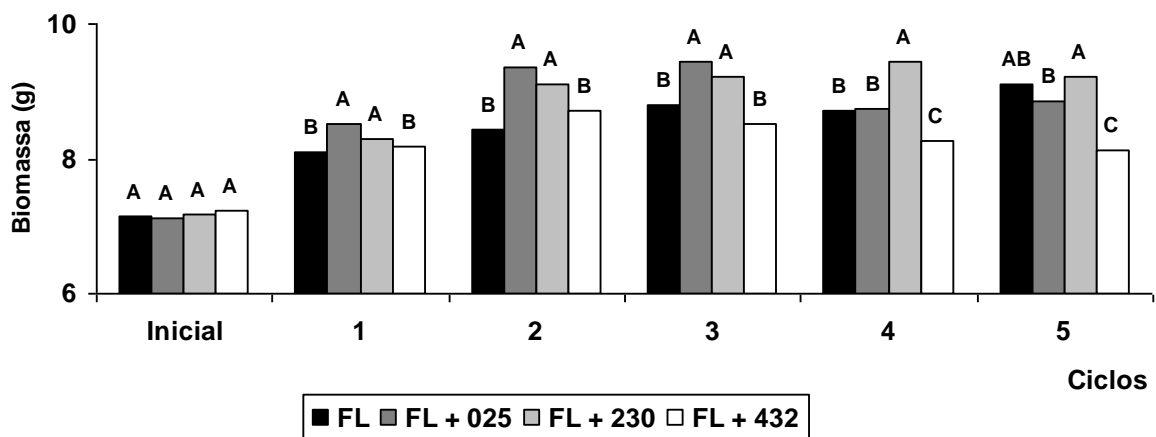


Figura 44 - Valores (em gramas) de biomassa para a levedura de panificação Fleischmann em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

Com exceção do experimento realizado com a levedura Fleischmann, a presença da bactéria homofermentativa afetou o rendimento alcoólico em poucos ciclos fermentativos para as demais leveduras. Porém, na presença de ambas as linhagens

heterofermentativas observou-se uma significativa queda no rendimento alcoólico (Figuras 45, 46, 47 e 48), demonstrando assim os prejuízos que podem ser provocados pela contaminação deste biotipo bacteriano na produção de etanol. Tem-se registro de que um inóculo de *L. fermentum* (uma das linhagens heterofermentativas utilizadas no presente estudo) em fermentações com melaço em batelada-alimentada, resultou na produção de elevadas quantidades de ácido provocando forte inibição da fermentação após poucos ciclos de células (OLIVA-NETO; YOKOYA, 1994).

Quando  $10^5 - 10^9$  UFC de *L. plantarum*, *L. paracasei*, *Lactobacillus* #3, *L. rhamnosus* ou *L. fermentum* foram inoculados em fermentação de malte de trigo, houve uma redução de mais de 7,6% na produção de etanol, dependendo da espécie da bactéria e do tamanho do inóculo (NARENDRENATH et al., 1997). Por outro lado, Chin e Ingledew (1994) observaram que a fermentação de malte de trigo artificialmente infectado com *L. fermentum* ou *L. delbruekii* a  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> não foi seriamente afetada com relação à produção de etanol.

Experimentos simulando a produção de whisky com infecção artificial por *L. brevis*, *L. plantarum* ou *Leuconostoc* sp, resultaram em aumento da acidez devido ao ácido láctico, além de redução da produção de etanol e crescimento da levedura (MAKANJUOLA, 1992). Neste estudo observou-se que uma contagem de bactérias de aproximadamente  $4,5 \times 10^8$  UFC/mL após 30 horas resultou em uma redução de 17% no rendimento alcoólico, e o autor ainda conclui que menos de 1% de perda no rendimento em etanol já é altamente significativa para destilarias de álcool combustível.

*Lactobacillus* requerem uma variedade de fatores de crescimento, como nucleotídeos, aminoácidos e vitaminas. Biotina e vitamina B<sub>12</sub> são requeridas por algumas cepas (KANDLER; WEISS, 1986). De acordo com Momose e Tonoike (1968), a inibição da levedura está relacionada ao esgotamento de vitaminas e aminoácidos (especialmente ácido glutâmico) no meio. Desde que as taxas de crescimento dos *Lactobacillus* são maiores que as taxas de *S. cerevisiae*, a remoção dos fatores de crescimento essenciais pode resultar em reduções na atividade metabólica da levedura (NARENDRANATH et al., 1997). Tal fato pode ter contribuído para a diminuição do rendimento alcoólico final, já que o crescimento observado para as linhagens heterofermentativas foi altamente significativo.

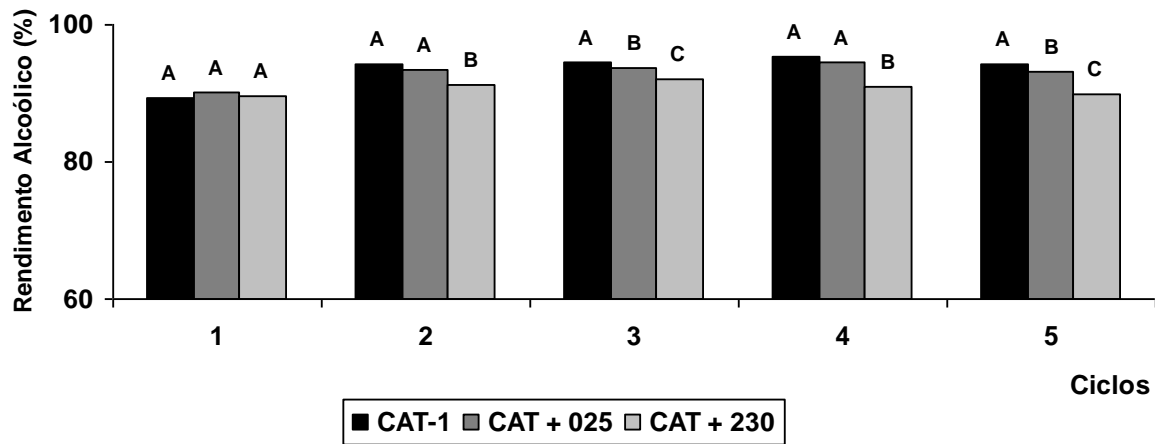


Figura 45 - Rendimento alcoólico (%) da levedura CAT-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

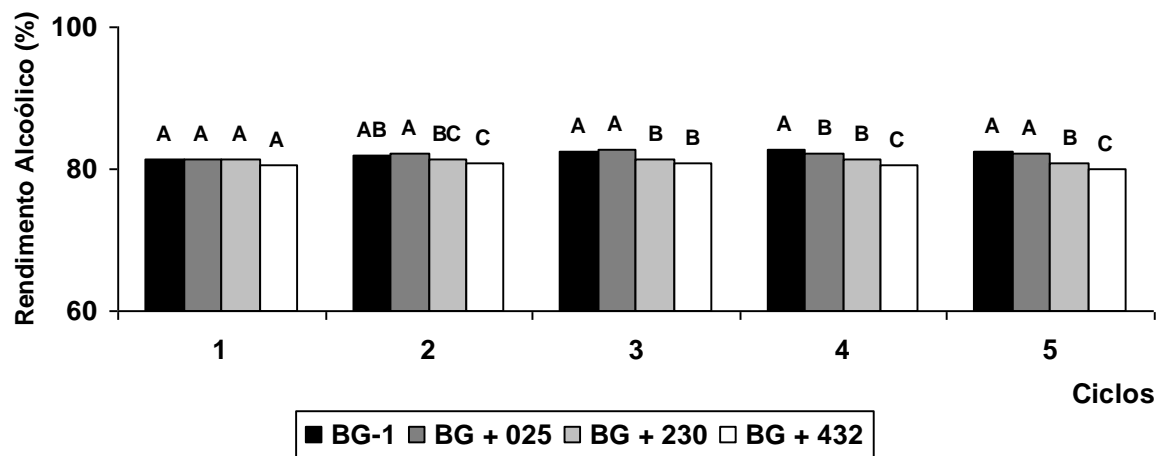


Figura 46 - Rendimento alcoólico (%) da levedura BG-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

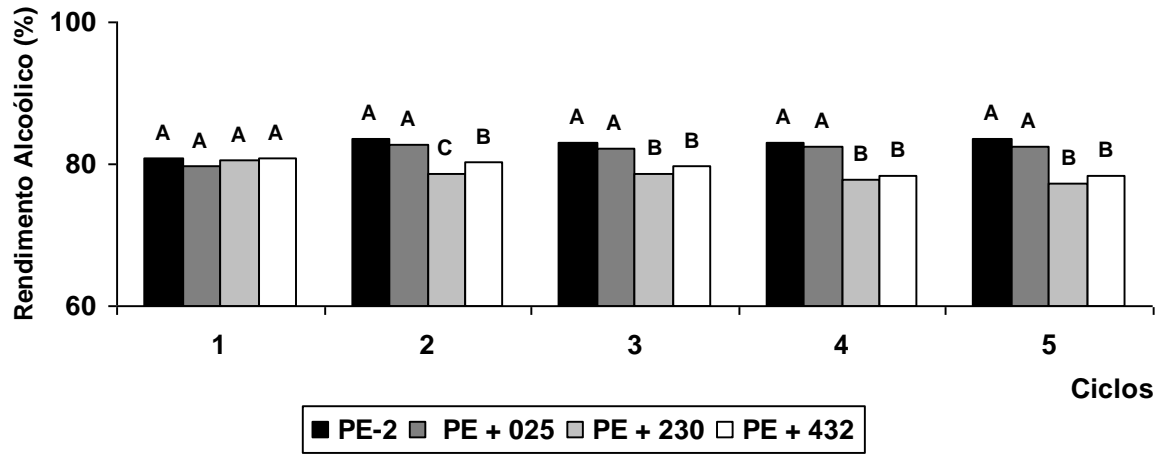


Figura 47 - Rendimento alcoólico (%) da levedura PE-2 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

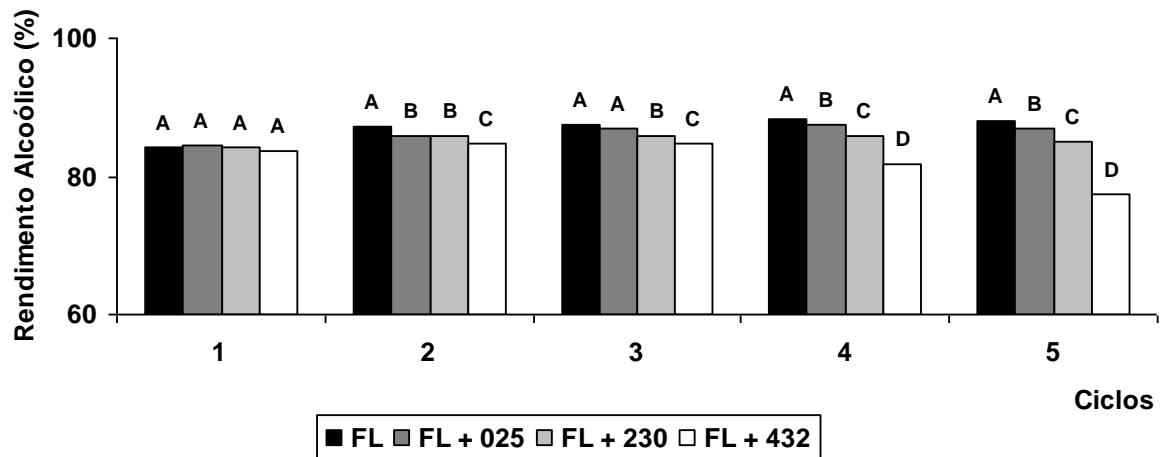


Figura 48 - Rendimento alcoólico (%) da levedura de panificação Fleischmann em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

Com relação à porcentagem de açúcares residuais no vinho, pôde-se observar nos quatro experimentos que não houve diferença significativa entre os tratamentos

(Figuras 49, 50, 51 e 52). Em fermentações de malte de trigo com contaminação bacteriana, apesar de uma pequena mudança na taxa de utilização de carboidratos ter sido observada quando o inóculo inicial de bactérias foi elevado, todas as fermentações foram completas. Isso sugere que a co-floculação, uma razão para a utilização incompleta de carboidratos e perda de rendimento alcoólico, não foi um fator neste estudo, e menos de 0,1% (m/v) dos açúcares fermentáveis permaneceram após o final das fermentações (NARENDRANATH, 1997).

No presente estudo, o maior teor encontrado de açúcares residuais foi de 0,12% (m/v) para o tratamento PE-2 em co-cultivo com a linhagem FT432B, indicando que a presença das bactérias não interferiu na finalização da fermentação, mesmo quando a bactéria inoculada foi a FT432B, uma bactéria capaz de provocar a floculação das células de leveduras.

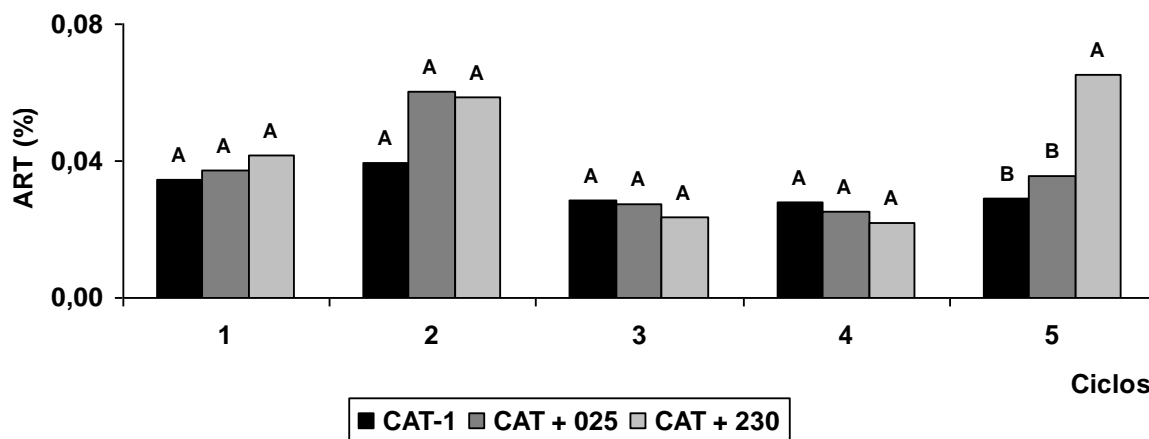


Figura 49 - Teores (%) de açúcares residuais no vinho para a levedura CAT-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

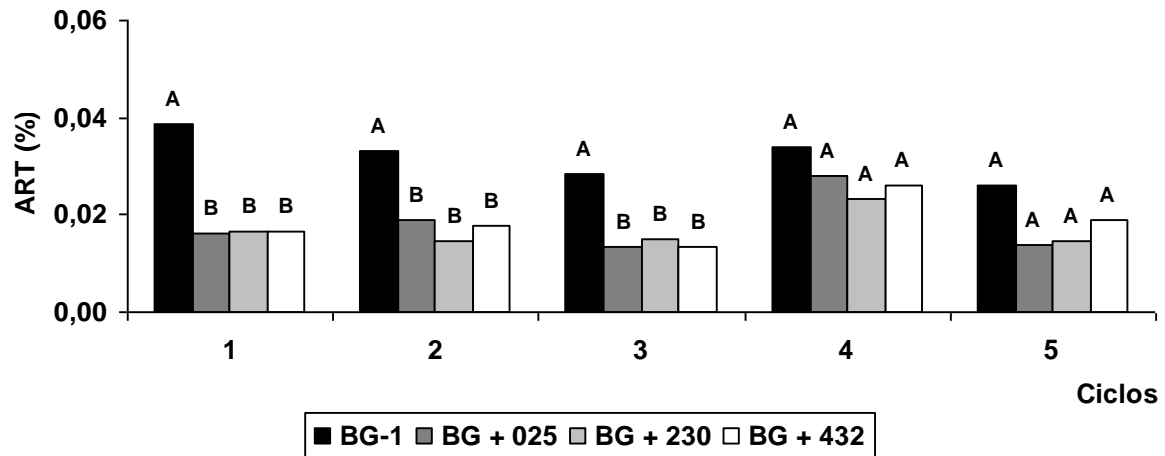


Figura 50 - Teores (%) de açúcares residuais no vinho para a levedura BG-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

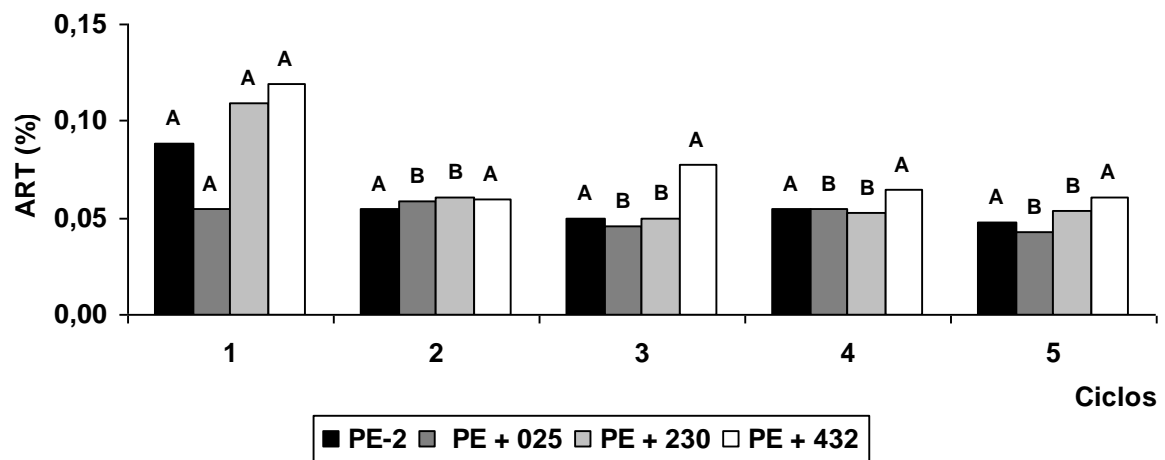


Figura 51 - Teores (%) de açúcares residuais no vinho para a levedura PE-2 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

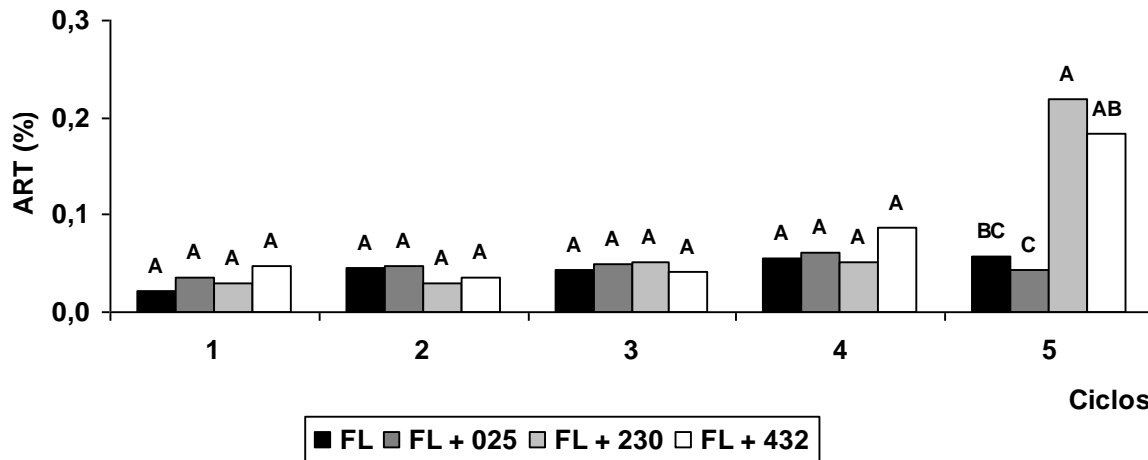


Figura 52 - Teores (%) de açúcares residuais no vinho para a levedura de panificação Fleischmann em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco reciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

Com relação aos principais ácidos orgânicos presentes no vinho de levedura, observou-se que no experimento com a levedura CAT-1, a presença de ambas as linhagens de bactérias afetaram a produção de succinato pela levedura, sendo que o tratamento com a linhagem heterofermentativa apresentou menores teores de tal ácido (Figura 53). Nos demais experimentos a produção de succinato variou bastante entre os ciclos fermentativos e para as diferentes linhagens de leveduras. No entanto, parece haver uma tendência à diminuição da produção deste ácido na presença da linhagem homofermentativa quando comparada ao tratamento controle (Figuras 54, 55 e 56).

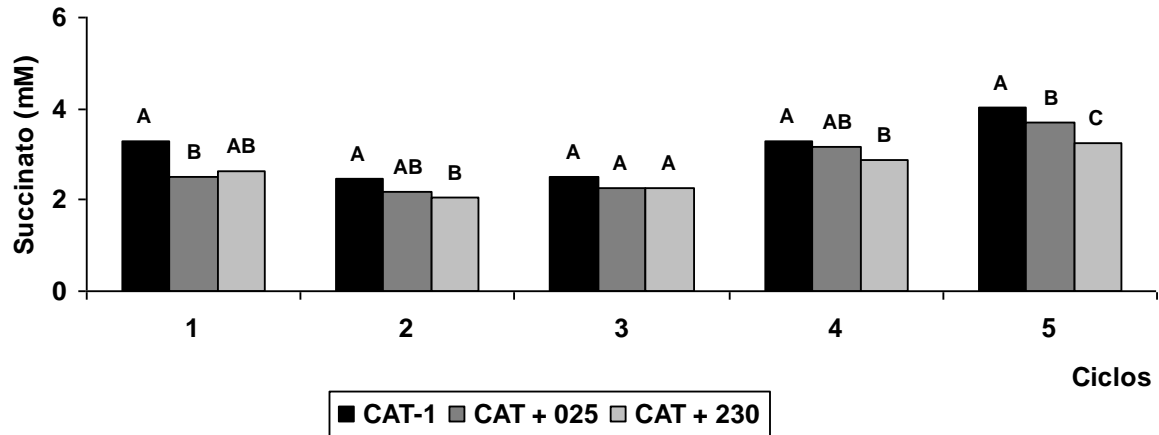


Figura 53 - Concentrações (mM) de succinato no vinho para a levedura CAT-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

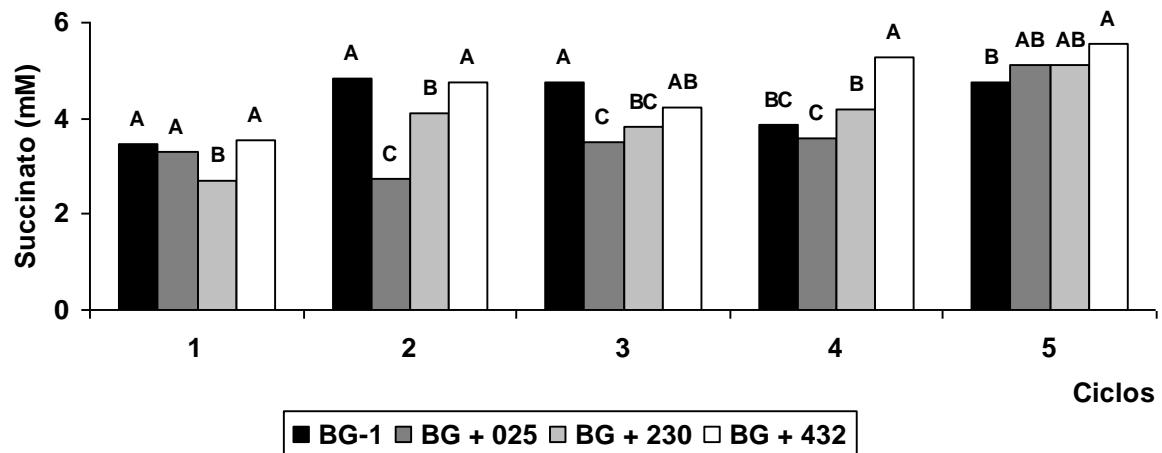


Figura 54 - Concentrações (mM) de succinato no vinho para a levedura BG-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo



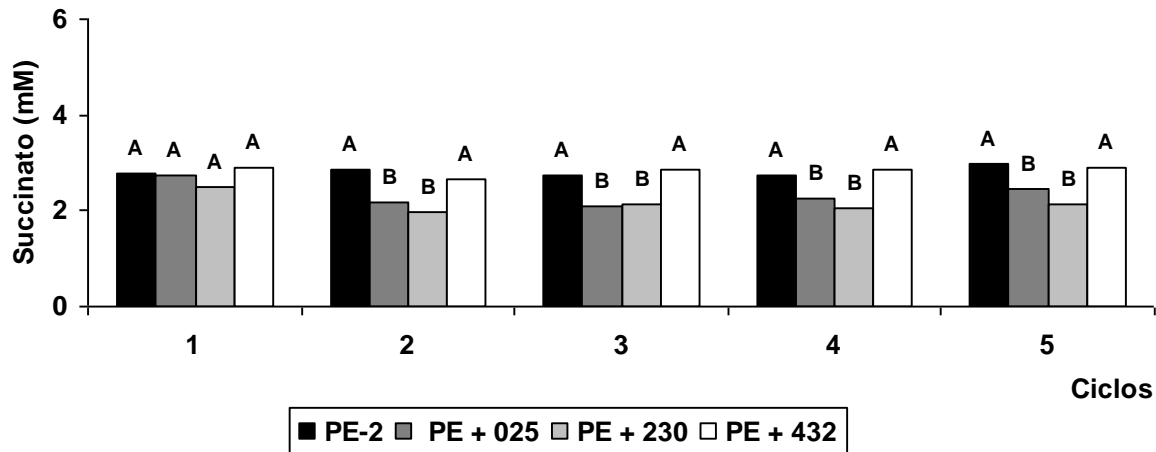


Figura 55 - Concentrações (mM) de succinato no vinho para a levedura PE-2 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco reciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

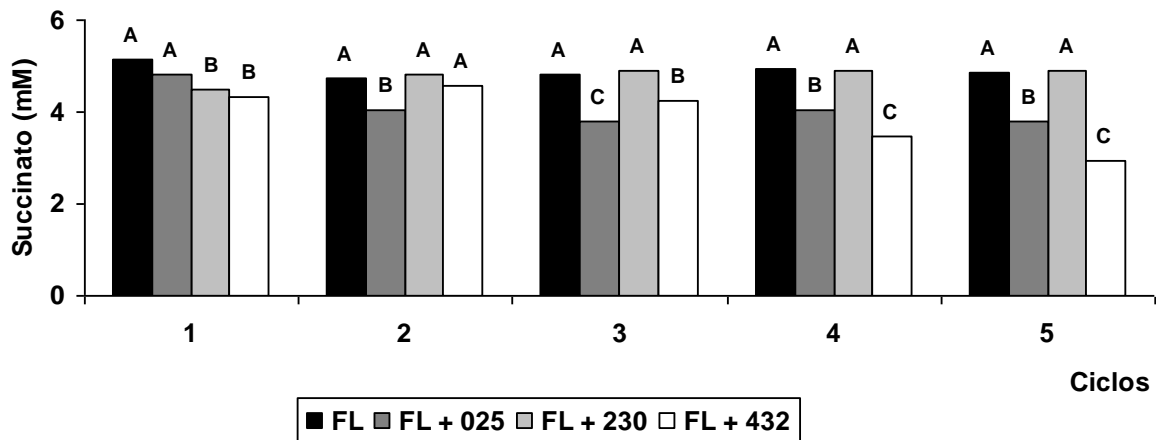


Figura 56 - Concentrações (mM) de succinato no vinho para a levedura de panificação Fleischmann em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco reciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

Devido ao maior crescimento e viabilidade da bactéria heterofermentativa em comparação com a homofermentativa nos ensaios de fermentação, nos dois primeiros

ciclos do experimento com a CAT-1, a produção de lactato pela linhagem heterofermentativa não diferiu significativamente da homofermentativa e, além disso, a partir do terceiro ciclo fermentativo o tratamento com a bactéria FT230B apresentou teores ainda mais elevados de lactato (Figura 57). Em co-cultivo com a PE-2 também houve uma produção aproximada de ácido láctico pelas linhagens homo- e heterofermentativas (Figura 59). Esta é mais uma indicação de que tal linhagem obteve melhor desempenho nessas condições de fermentação, pois o crescimento em condições de laboratório (Experimento I) revelou uma produção duas vezes maior de lactato pela bactéria homofermentativa (Figuras 13, 14, 15 e 16).

Nos experimentos com as leveduras BG-1 e Fleischmann a produção de lactato pela linhagem homofermentativa permaneceu superior à produção das duas linhagens heterofermentativas na maior parte dos ciclos fermentativos (Figuras 58 e 60). Porém, esses valores foram bem mais próximos que os observados no Experimento I.

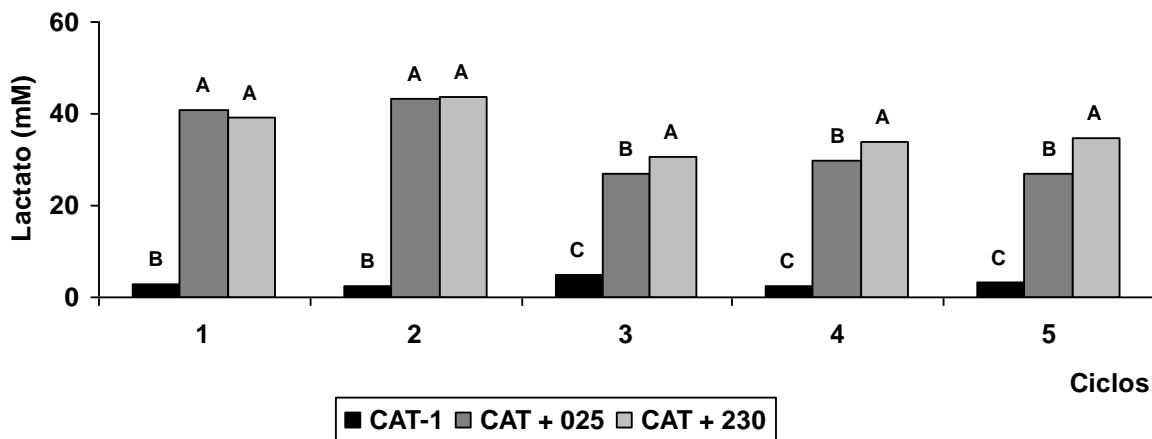


Figura 57 - Concentrações (mM) de lactato no vinho para a levedura CAT-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

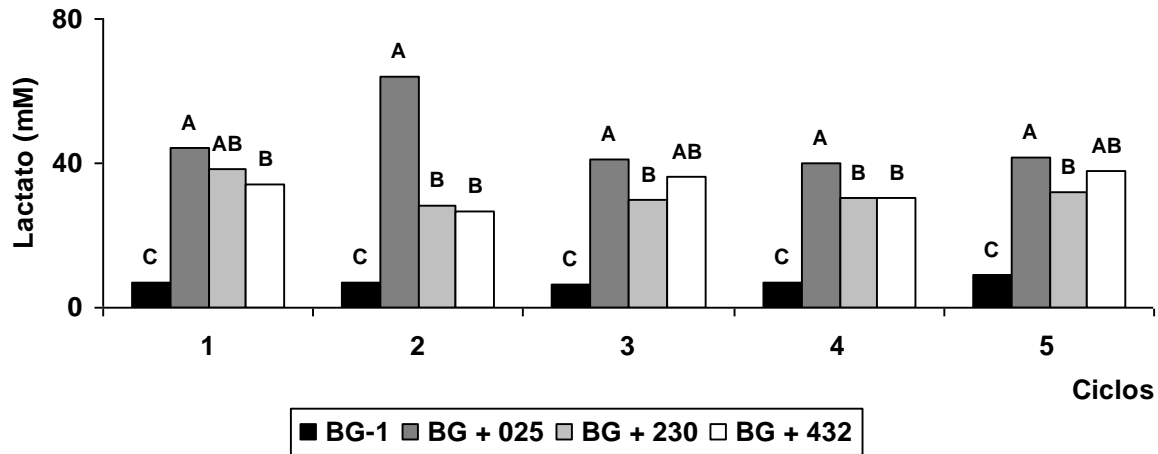


Figura 58 - Concentrações (mM) de lactato no vinho para a levedura BG-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

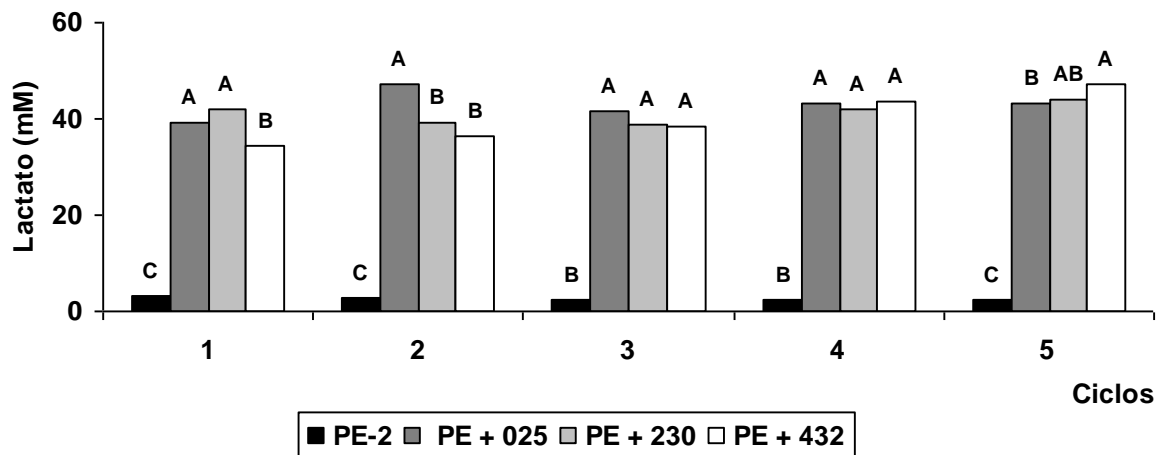


Figura 59 - Concentrações (mM) de lactato no vinho para a levedura PE-2 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

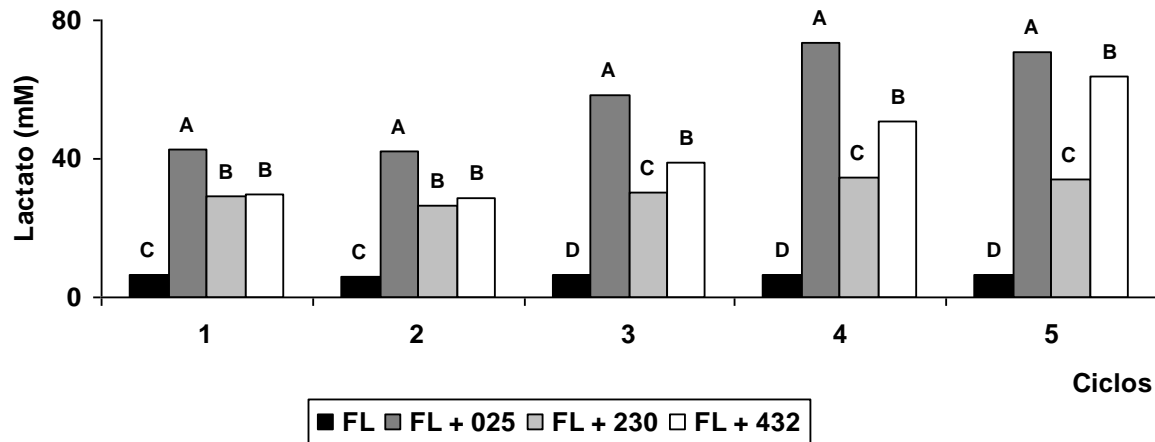


Figura 60 - Concentrações (mM) de lactato no vinho para a levedura de panificação Fleischmann em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

A produção de ácido acético, como esperado, foi significativamente superior no tratamento com a linhagem heterofermentativa em todos os ciclos de fermentação para os quatro experimentos (Figuras 61, 62, 63 e 64), uma vez que esta bactéria produz ácido acético e os teores observados provavelmente são uma soma dos montantes produzidos pela levedura e pela bactéria.

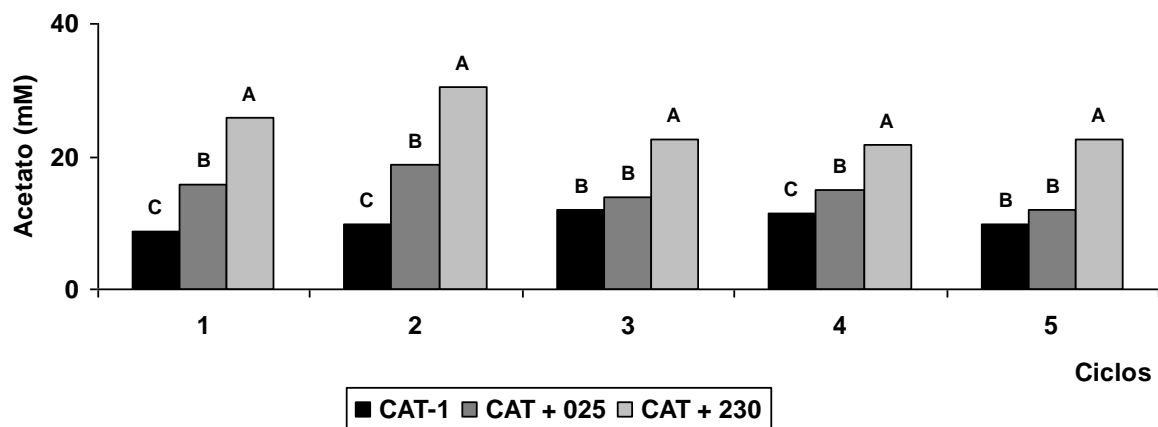


Figura 61 - Concentrações (mM) de acetato no vinho para a levedura CAT-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

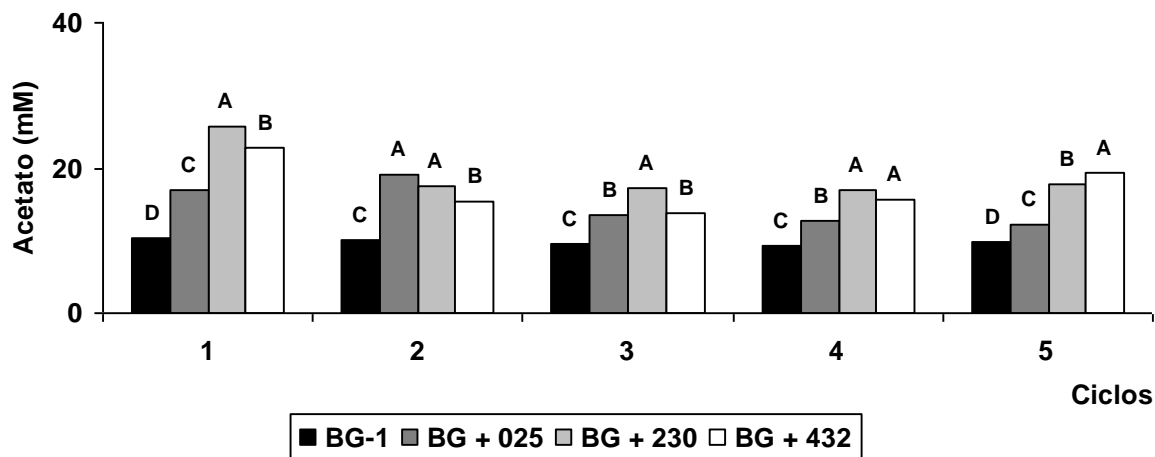


Figura 62 - Concentrações (mM) de acetato no vinho para a levedura BG-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

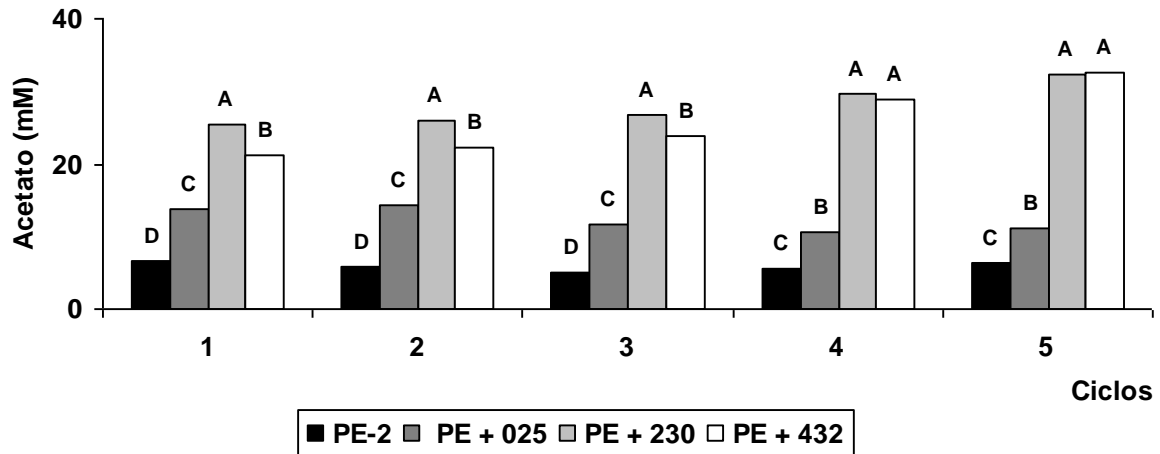


Figura 63 - Concentrações (mM) de acetato no vinho para a levedura PE-2 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

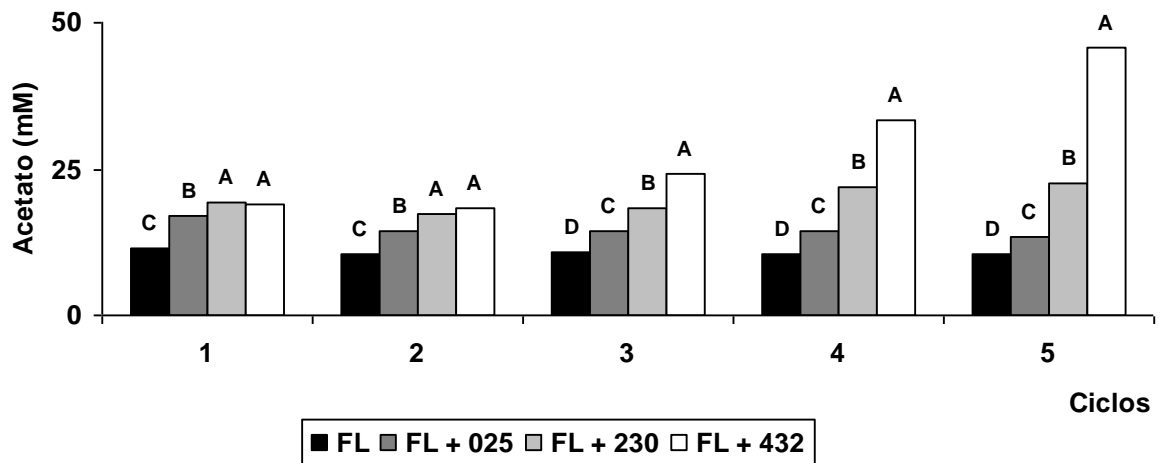


Figura 64 - Concentrações (mM) de acetato no vinho para a levedura de panificação Fleischmann em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

Em estudos sobre o efeito de alguns produtos secundários no sistema de fermentação, Maiorella et al. (1983) concluíram que o ácido acético e o ácido láctico causam interferências químicas na manutenção das funções celulares. Segundo os autores, o mecanismo de inibição pelo ácido acético é diferente do ácido láctico, sendo que este último é muito menos solúvel em lipídios que o acético e não inibe o transporte de fosfato. No entanto, a concentração de inibição do ácido acético é muito maior que sua produção, necessitando aparecer no teor de 17 g/L para diminuir 20% da produção da massa celular, sendo a redução de 80% obtida com 38 g/L. Em experimentos realizados por Oliva-Neto e Yokoya (1994) verificou-se que apenas depois do 15º ciclo de fermentação, a eficiência alcoólica sofreu uma redução quando a quantidade de ácido láctico foi superior a 6 g/L e a contaminação bacteriana foi maior que  $1,2 \times 10^9$  UFC . mL<sup>-1</sup>.

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

Em sua forma não dissociada, ácidos fracos podem atravessar a membrana por difusão e dissociar-se dentro da célula. Para manter a homeostase celular, os prótons e ânions resultantes devem ser ativamente transportados para fora da célula. Isto requer energia na forma de ATP e, conseqüentemente, a formação de biomassa ou produção de etanol ficam restritos (THOMSSON; LARSSON, 2006).

A literatura aponta para uma maior toxidez exercida pelo ácido acético quando comparada com o ácido láctico, em decorrência da natureza mais apolar do primeiro (MAIORELLA et al., 1983; PAMPULHA, 1989). Os dois ácidos juntos possuem um efeito sinérgico e negativo no crescimento e metabolismo das leveduras. Sabe-se também que o etanol acentua o efeito do ácido acético na inibição da fermentação por células de leveduras (PAMPULHA; LOUREIRO-DIAS, 1989). Tani et al. (1963) observaram uma inibição de *S. cerevisiae* pelo ácido láctico produzido por *Lactobacillus sake*, enquanto Noda et al. (1980), utilizando *Pediococcus halophilus*, atribuíram a

inibição ao ácido acético, mesmo se a quantidade de ácido láctico fosse maior do que o ácido acético.

O ácido acético é o principal ácido orgânico volátil produzido durante a fermentação alcoólica, sendo que o mesmo é produzido tanto pela levedura como por bactérias contaminantes do processo, podendo ocorrer em concentrações suficientes para manifestar efeitos tóxicos à levedura *Saccharomyces*. Dessa forma, pode-se inferir que o metabolismo bacteriano, nas suas modalidades hetero e homofermentativa, portanto, respectivamente podendo ou não produzir ácido acético, poderá exercer efeitos tóxicos diferenciados sobre a levedura durante a fermentação alcoólica (ALVES, 1994). A partir dessas considerações, pode-se sugerir que o ácido láctico e o acético, juntamente com o etanol, podem ter agido sinergisticamente no metabolismo e crescimento das leveduras, resultando principalmente em uma diminuição do rendimento alcoólico e, desde que maiores teores de acetato são produzidos pelas linhagens heterofermentativas, o rendimento alcoólico foi ainda mais afetado na presença deste tipo metabólico de bactéria.

Com relação ao pH dos vinhos, como esperado, houve uma diminuição na presença de ambas as bactérias. Para as leveduras CAT-1 e PE-2, nos dois primeiros ciclos, tal parâmetro foi significativamente menor no meio contendo a linhagem homofermentativa, devido à sua maior produção de ácido láctico. No entanto, a partir do terceiro ciclo foram encontrados menores valores de pH na presença da bactéria heterofermentativa (Figura 65 e 67). Tal fato pode estar correlacionado com a população de células e à viabilidade celular da linhagem heterofermentativa que, em condições semelhantes ao processo industrial de produção de etanol, apresentaram maiores valores quando comparados com a linhagem homofermentativa, produzindo assim uma maior quantidade de ácido láctico. Para as outras duas leveduras (BG-1 e Fleischmann), valores menores de pH foram observados no tratamento com a bactéria homofermentativa (Figuras 66 e 68), onde de fato, houve uma maior produção de ácido láctico em comparação com as linhagens heterofermentativas e com o tratamento controle.

Segundo Gao e Fleet (1988), a diminuição do pH externo de 6 para 3 aumenta a sensibilidade da levedura ao etanol, que acaba por dissipar a força protomotiva da



membrana, reduzindo o pH interno abaixo do ótimo para as enzimas glicolíticas e etanológicas. Esse feito é aumentado na presença de ácidos orgânicos fracos, aumentando a toxidez pelo etanol, de modo sinérgico como o caso do ácido acético (PAMPULHA; LOUREIRO, 1989).

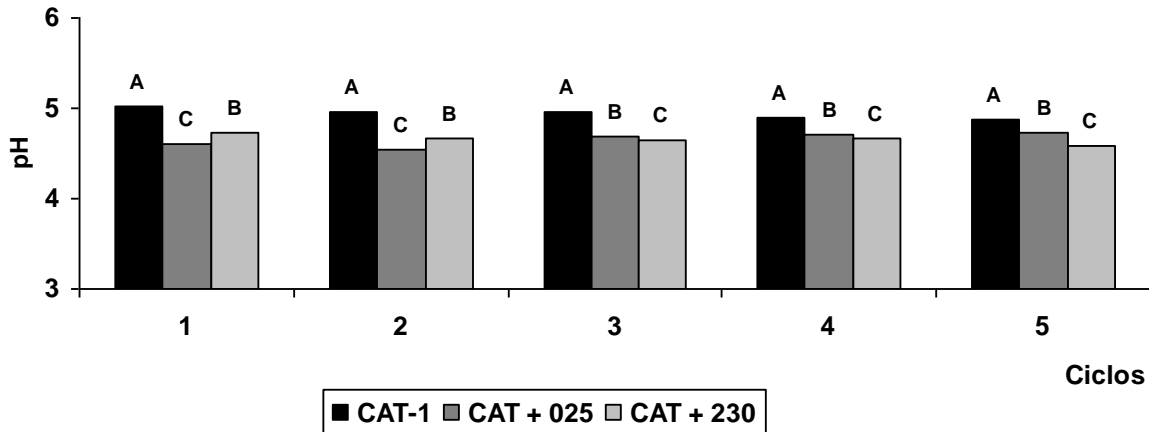


Figura 65 - Valores de pH dos vinhos para a levedura CAT-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230) durante os cinco reciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

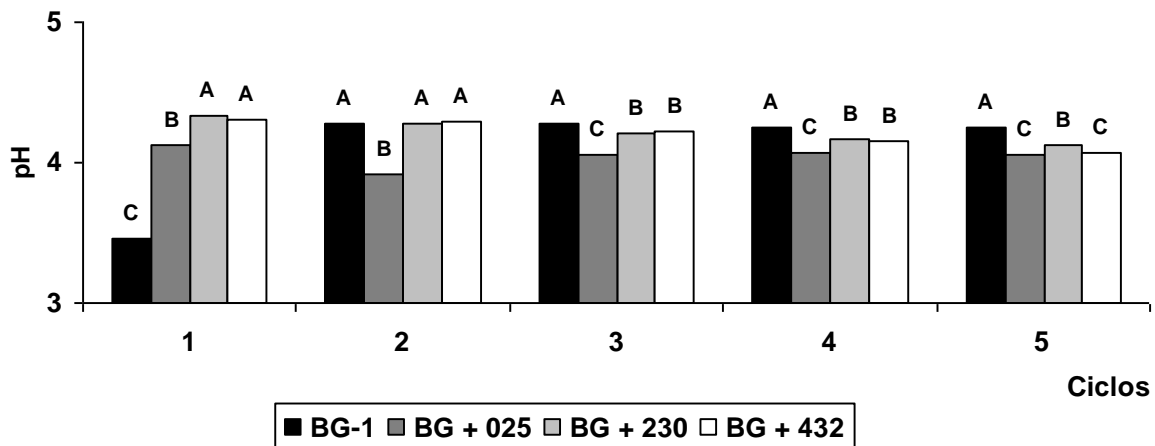


Figura 66 - Valores de pH dos vinhos para a levedura BG-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco reciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

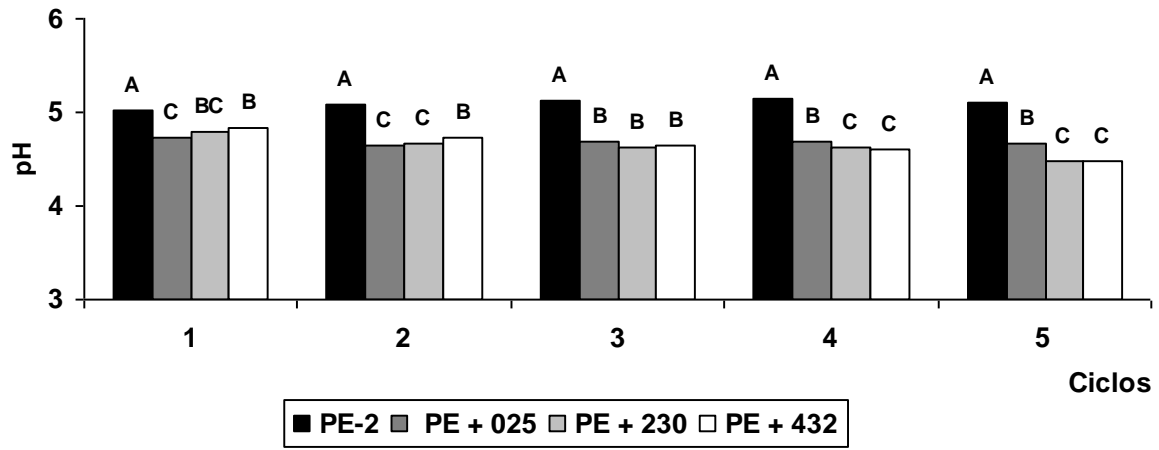


Figura 67 - Valores de pH dos vinhos para a levedura PE-2 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

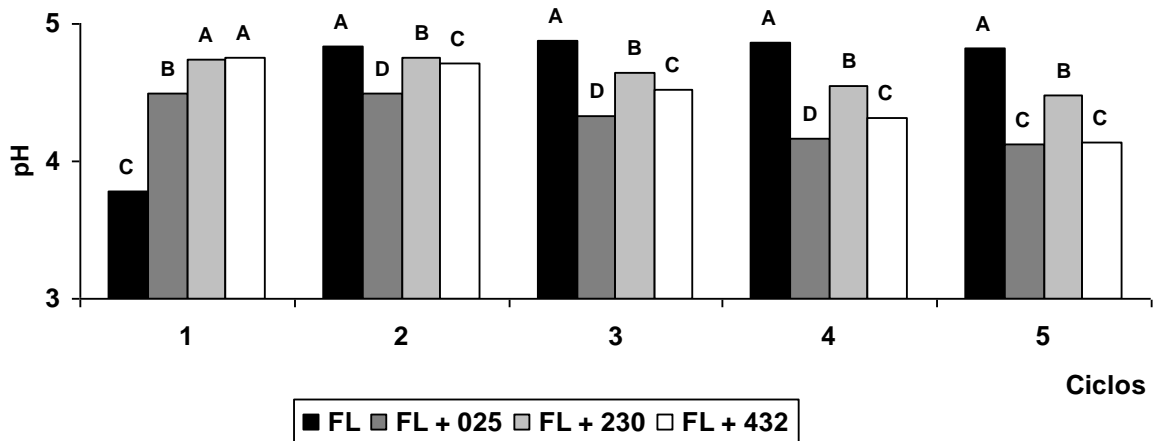


Figura 68 - Valores de pH dos vinhos para a levedura de panificação Fleischmann em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

Com relação ao glicerol, observa-se maior produção em condição de estresse osmótico (BRUMM; HEBEDA, 1988; MYERS et al., 1997), bem como diante da

imposição de várias outras situações estressantes, sugerindo que um aumento na formação do mesmo possa refletir condições gerais de estresse durante a fermentação. Em geral, cerca de 5 a 8% do açúcar metabolizado pela levedura é transformado em glicerol (ALVES, 1994; ALVES, 2000). Já a partir do segundo ciclo, observou-se maior produção deste composto nos tratamentos com as linhagens heterofermentativas em todos os experimentos, indicando a condição de estresse promovida pela quantidade de bactérias e seus produtos metabólicos em tal tratamento (Figuras 69, 70, 71 e 72).

De fato, tem-se registro de que a contaminação bacteriana presente no vinho exerce estímulo sobre a produção de glicerol pela *S. cerevisiae*, independente da linhagem de levedura (CHERUBIN, 2003). Tais resultados estão compatíveis com o presente estudo quando a contaminação foi promovida por uma linhagem heterofermentativa de bactéria. Porém, quando utilizada uma linhagem bacteriana homofermentativa, observou-se que a produção de glicerol foi significativamente menor até mesmo que no tratamento controle, seguindo a mesma tendência que foi observada no Experimento I (em condições de laboratório). Trata-se, portanto, do primeiro registro de menor produção de glicerol por leveduras que encontram-se na presença de contaminação bacteriana.

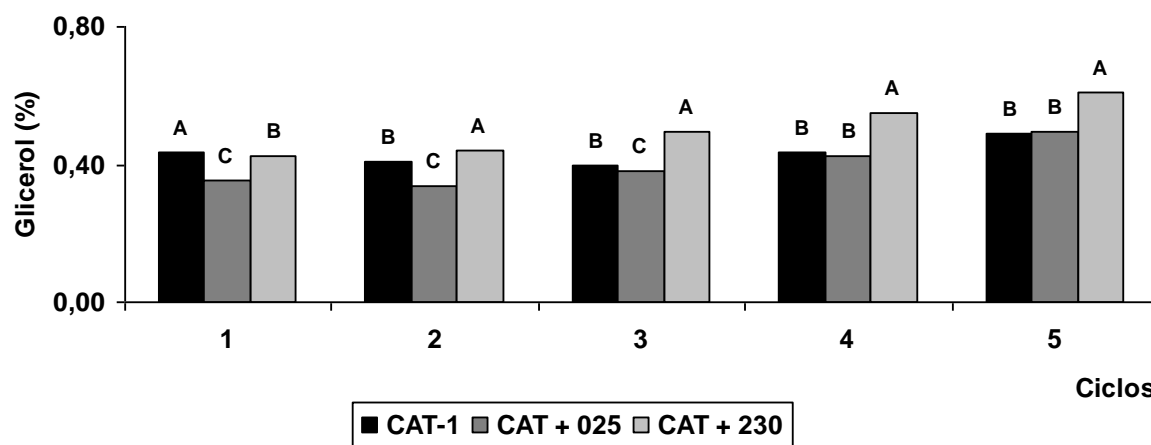


Figura 69 - Concentrações (%) de glicerol no vinho para a levedura CAT-1 em cultivo conjunto com as bactérias láticas FT025B (025) e FT230B (230) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

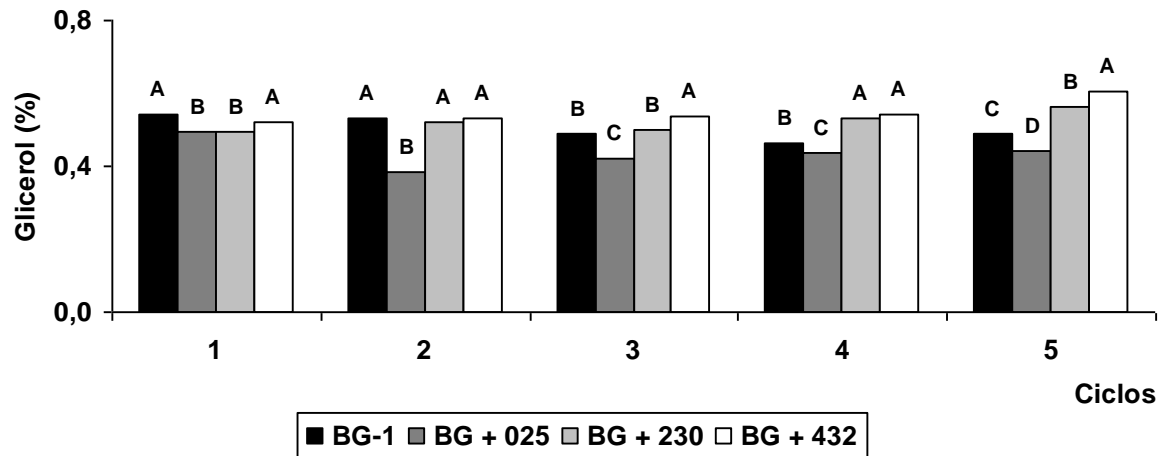


Figura 70 - Concentrações (%) de glicerol no vinho para a levedura BG-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

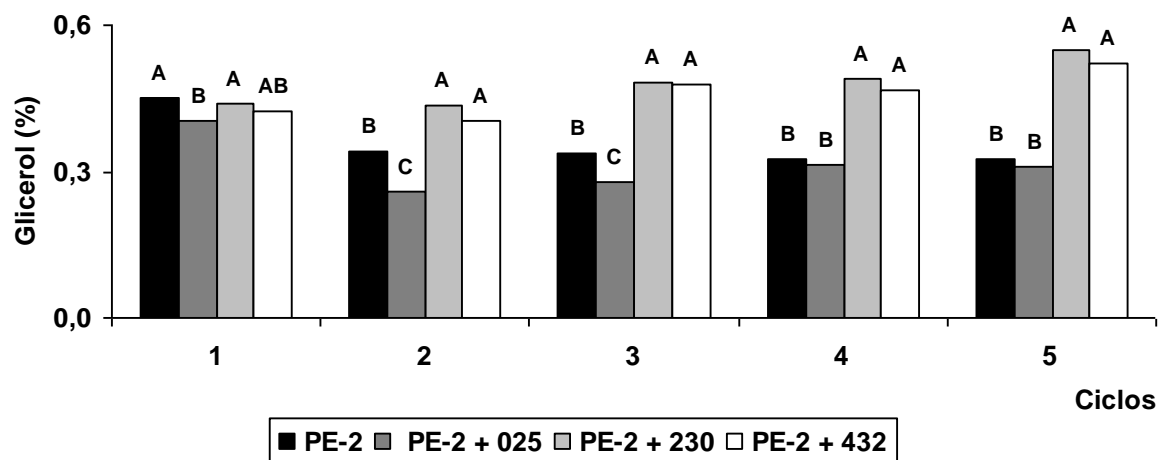


Figura 71 - Concentrações (%) de glicerol no vinho para a levedura PE-2 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

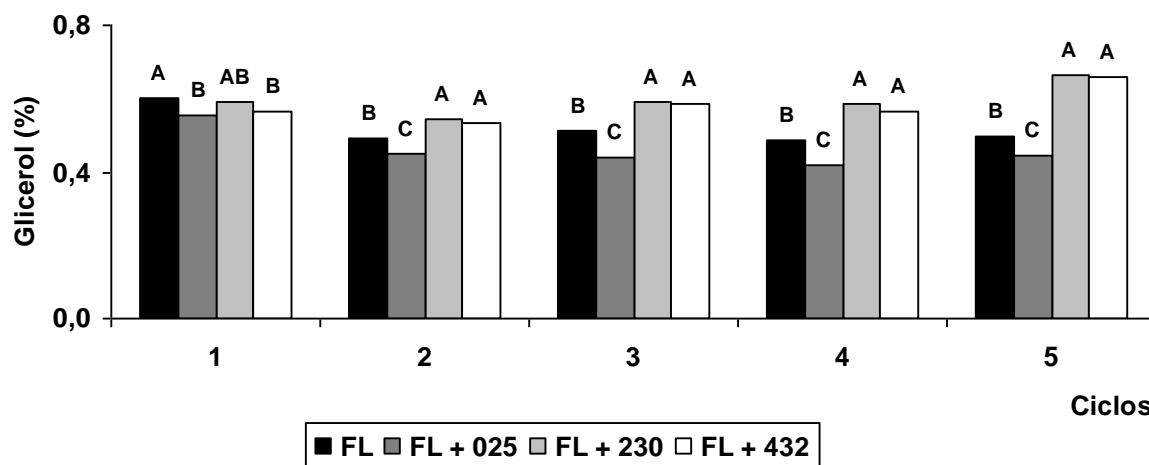


Figura 72 - Concentrações (%) de glicerol no vinho para a levedura de panificação Fleischmann em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

Com relação ao manitol, houve significativa produção pelas linhagens bacterianas heterofermentativas, como já era esperado (Figuras 73, 74, 75 e 76). Observou-se ainda que, em alguns dos experimentos, como os conduzidos com as leveduras BG-1 e Fleischmann, a produção de manitol no tratamento com a linhagem homofermentativa foi significativamente menor que a encontrada no tratamento controle.

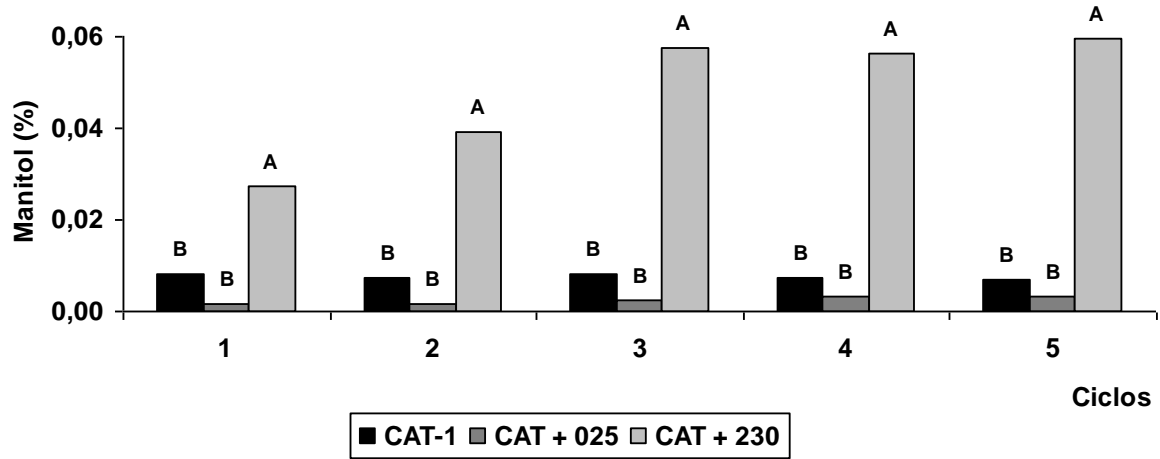


Figura 73 - Concentrações (%) de manitol no vinho para a levedura CAT-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

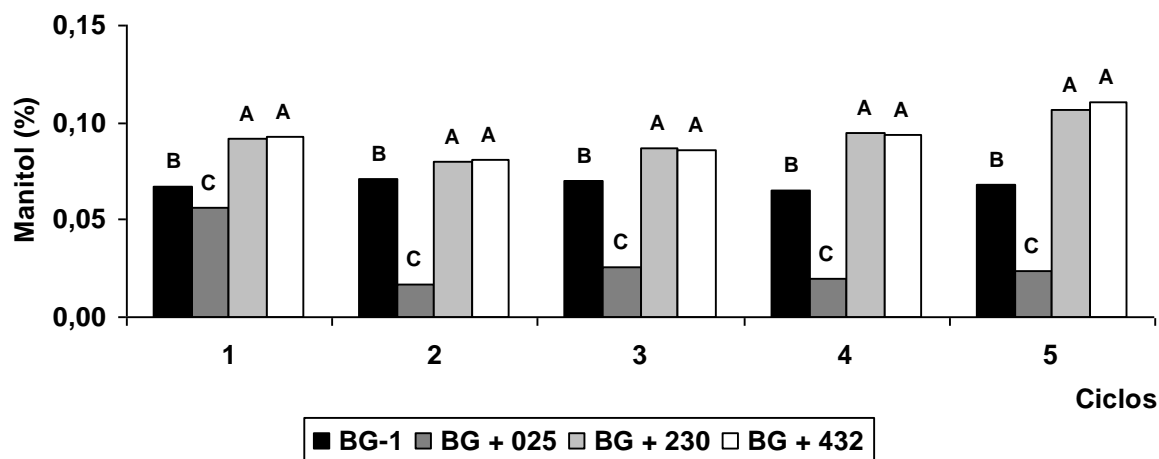


Figura 74 - Concentrações (%) de manitol no vinho para a levedura BG-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

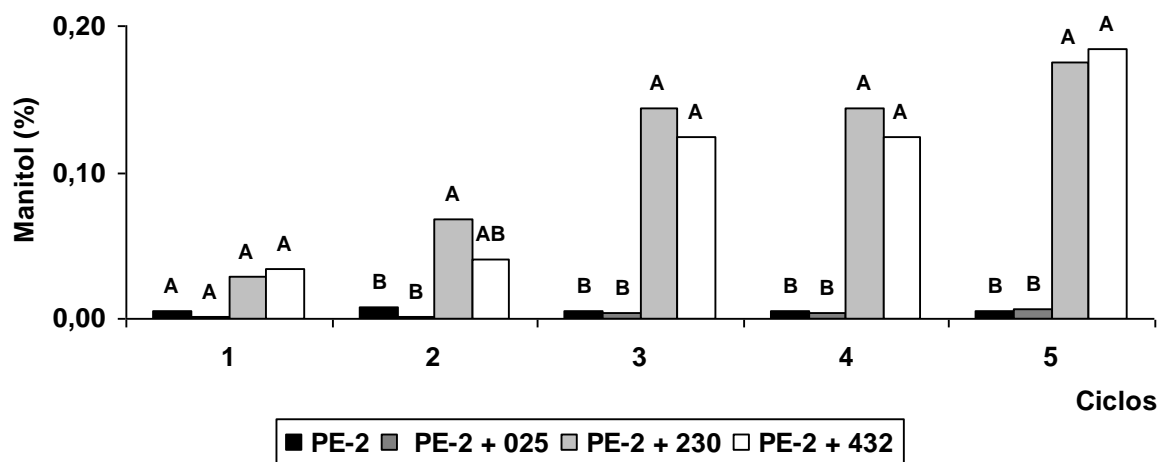


Figura 75 - Concentrações (%) de manitol no vinho para a levedura PE-2 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco ciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

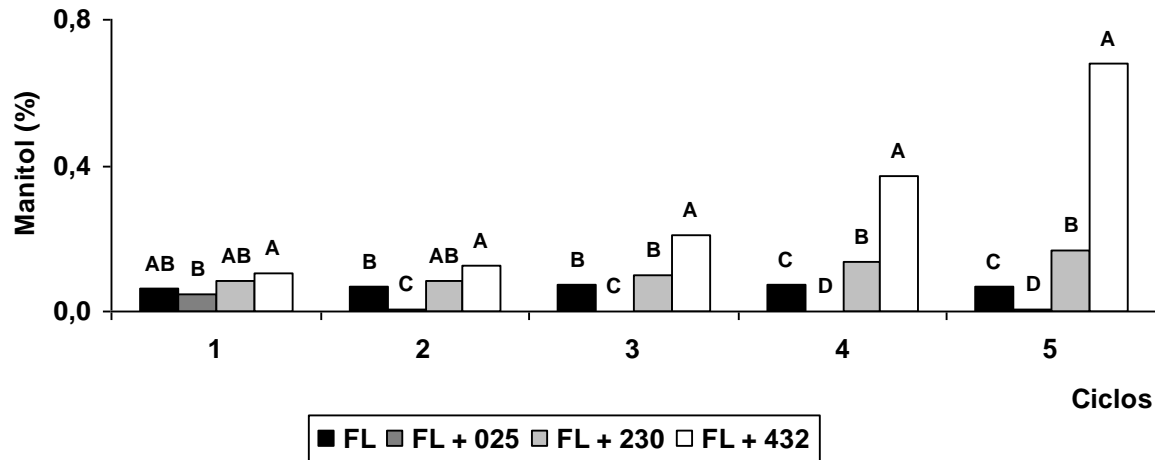


Figura 76 - Concentrações (%) de manitol no vinho para a levedura de panificação Fleischmann em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante os cinco reciclos fermentativos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância, dentro de cada ciclo

As leveduras, quando fermentando em condições estressantes, mostram queda da viabilidade celular, redução na formação de biomassa, aumento na formação de glicerol e diminuição nos conteúdos celulares de glicogênio e trealose, sendo que tais parâmetros são de extrema utilidade para a identificação de linhagens tolerantes a um único ou um conjunto de fatores estressantes (ALVES, 1994; ALVES, 2000; BASSO; AMORIM, 1998). Assim, glicogênio e trealose, os dois principais carboidratos de reserva em *S. cerevisiae*, representando até 25% da matéria seca (LILLE; PRINGLE, 1980), já foram envolvidos com a tolerância a diversos tipos de estresses (ATTFIELD, 1997; D'AMORE et. al, 1991; LEÃO et. al., 1994; MANSURE et. al., 1997; PARROU et. al, 1997; SINGER; LINDQUIST, 1998).

De acordo com Alves (1994), os teores de trealose têm relação direta com a tolerância da levedura a diferentes agentes estressantes. Este composto assumiu uma importância tecnológica relevante quando seu acúmulo foi relacionado à manutenção da viabilidade celular para o armazenamento de levedura de panificação, manutenção de esporos viáveis e à melhor capacidade de produção de etanol em cepas com altos teores iniciais de trealose (D' AMORE et al., 1991).



No presente estudo, os teores de trealose não foram alterados em decorrência dos tratamentos tanto no início como final da fermentação para as leveduras CAT-1, BG-1 e PE-2 (Figuras 77, 78 e 79). Comprovou-se ainda acúmulo deste carboidrato de reserva ao final da fermentação em todos esses experimentos. No entanto, a presença das linhagens FT025B e FT432B afetou a produção de trealose final pela levedura Fleischmann (Figura 80).

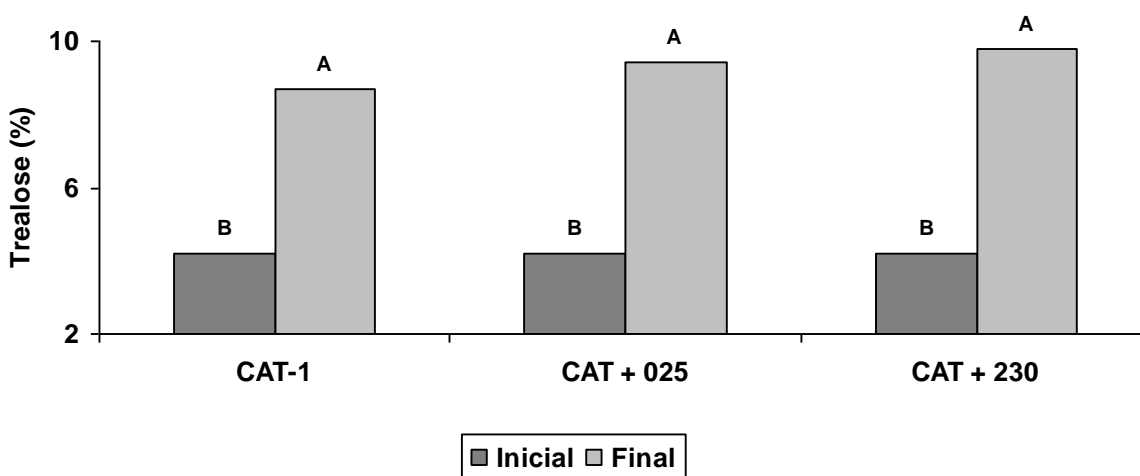


Figura 77 - Teores (%) de trealose nos vinhos inicial e final para a levedura CAT-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância

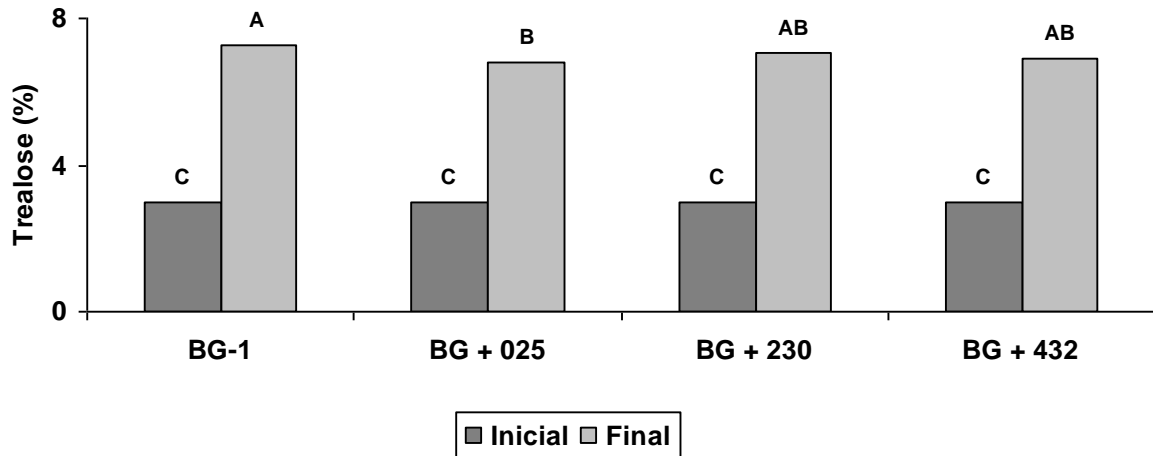


Figura 78 - Teores (%) de trealose nos vinhos inicial e final para a levedura BG-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância

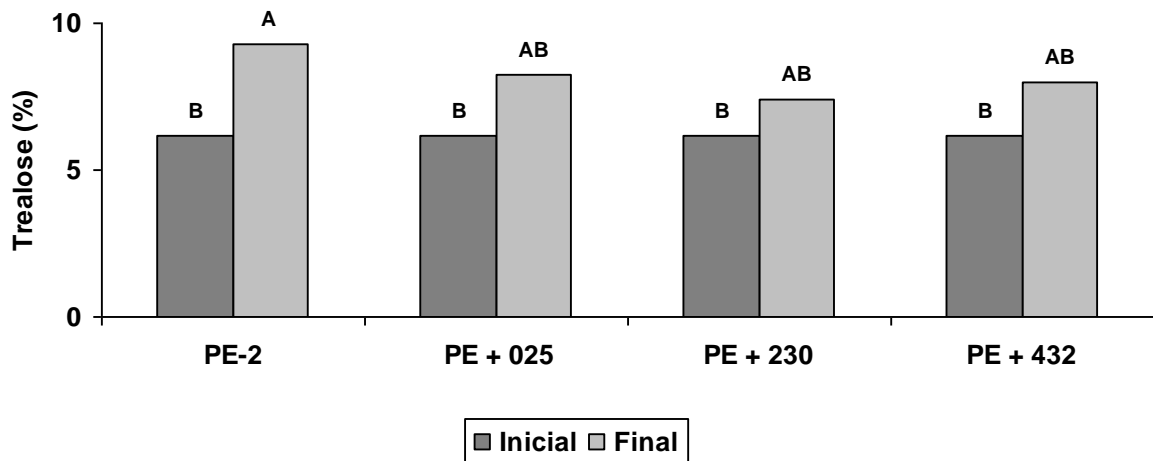


Figura 79 - Teores (%) de trealose nos vinhos inicial e final para a levedura PE-2 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância

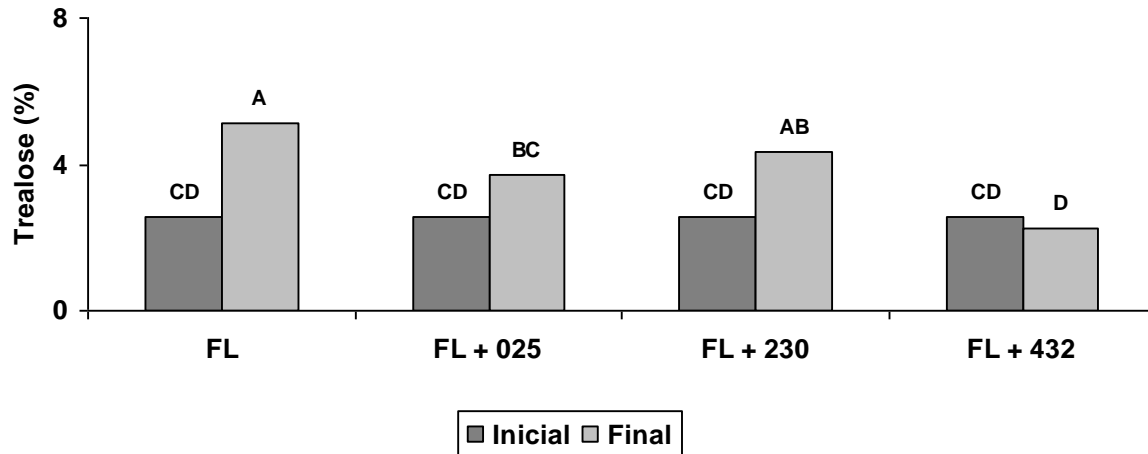


Figura 80 - Teores (%) de trealose nos vinhos inicial e final para a levedura de panificação Fleischmann em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível de 5% de significância

Com relação à velocidade de fermentação, calculada através da liberação de  $\text{CO}_2$  emitida durante as 21 horas de fermentação, observou-se pequena diminuição no tratamento com pelo menos uma das linhagens heterofermentativas empregadas, em especial no experimento conduzido com a levedura PE-2 (Figuras 81, 82, 83 e 84).

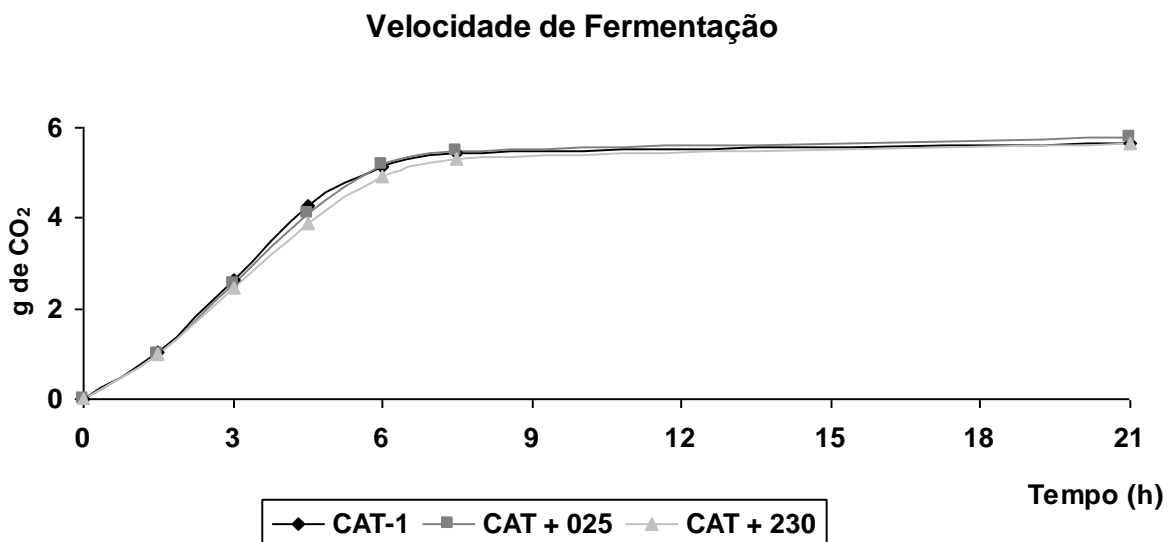


Figura 81 - Teores de  $\text{CO}_2$  (em gramas) emitidos pela levedura CAT-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025) e FT230B (230) durante 21 horas de fermentação (média dos cinco ciclos fermentativos)

### Velocidade de Fermentação

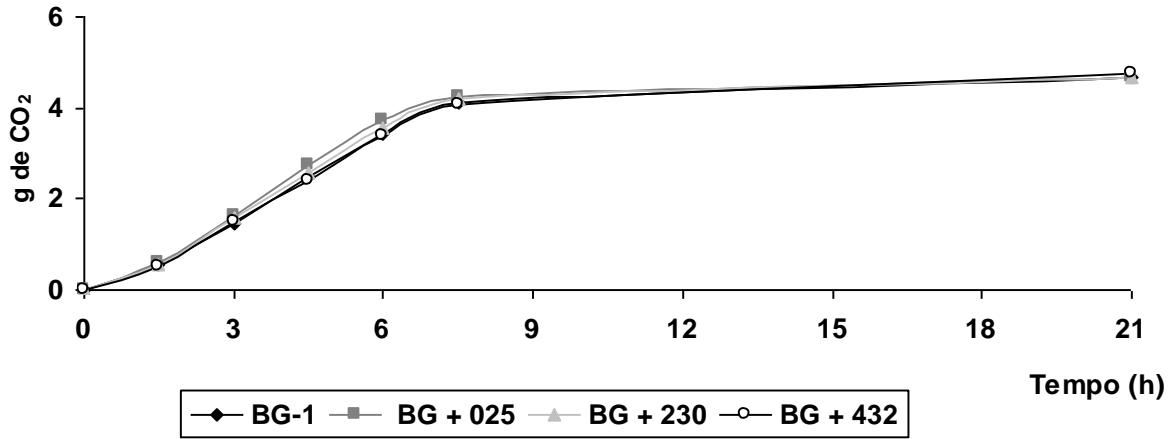


Figura 82 - Teores de CO<sub>2</sub> (em gramas) emitidos pela levedura BG-1 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante 21 horas de fermentação (média dos cinco ciclos fermentativos)

### Velocidade de Fermentação

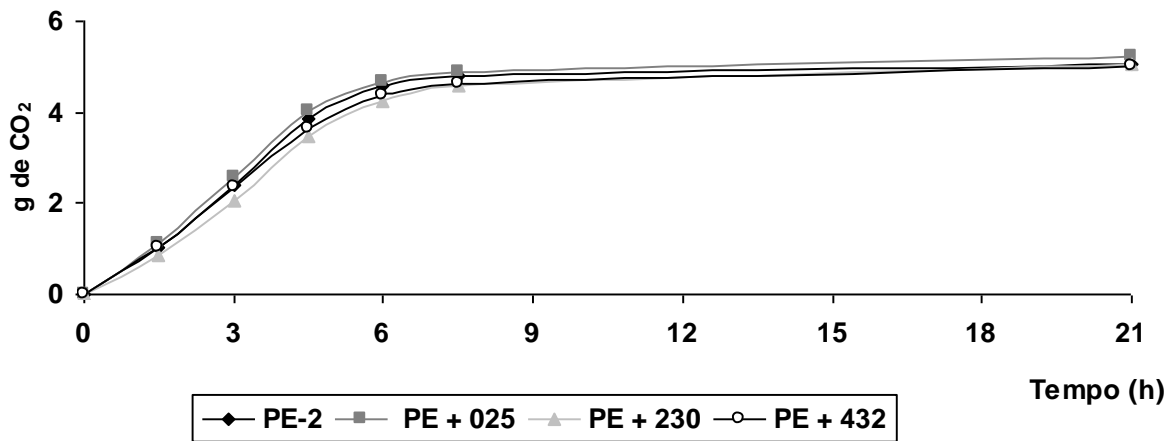


Figura 83 - Teores de CO<sub>2</sub> (em gramas) emitidos pela levedura PE-2 em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante 21 horas de fermentação (média dos cinco ciclos fermentativos)

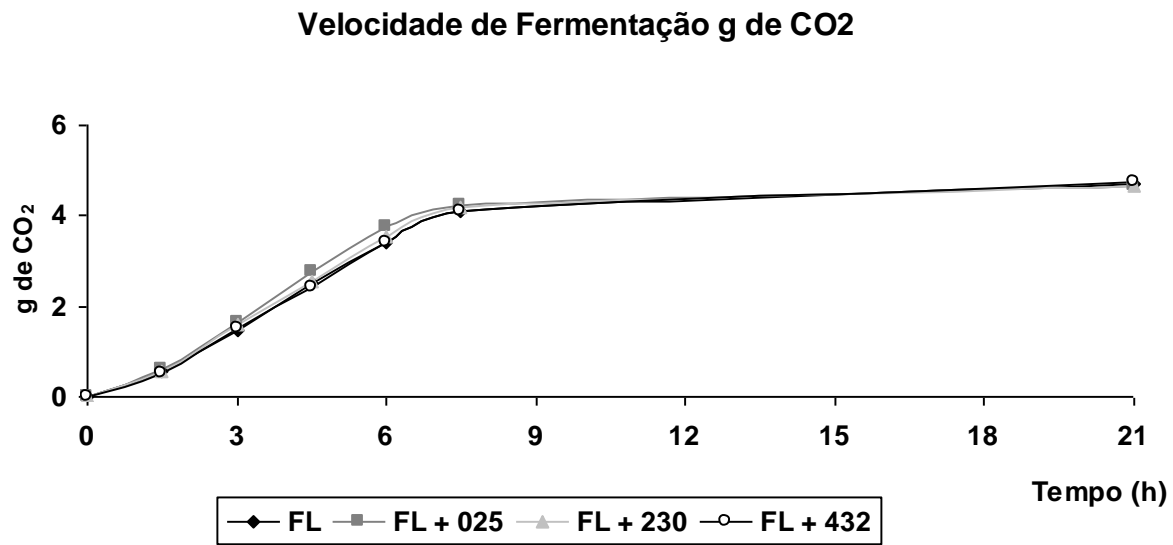


Figura 84 - Teores de CO<sub>2</sub> (em gramas) emitidos pela levedura de panificação Fleischmann em cultivo conjunto com as bactérias lácticas FT025B (025), FT230B (230) e FT432B (432) durante 21 horas de fermentação (média dos cinco ciclos fermentativos)

## 5 CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- A linhagem de levedura possui um efeito específico sobre o crescimento e viabilidade das bactérias, assim como o tipo metabólico bacteriano (homo ou heterofermentativo) atua sobre os mesmos parâmetros das leveduras.
- A levedura CAT-1 parece exercer uma ação antibacteriana mais pronunciada do que as demais linhagens, sendo também mais tolerante à ação estressante da contaminação bacteriana.
- Sob condições industriais, a bactéria heterofermentativa aparenta ser favorecida em relação à homofermentativa, resultando em maior desvio de açúcar em detrimento da formação de etanol. Sugere-se que as linhagens bacterianas heterofermentativas sejam capazes de resistir melhor aos elevados teores de etanol excretados pelas leveduras no processo industrial, uma vez que também produzem tal composto. Microrganismos com metabolismo homofermentativo podem estar mais susceptíveis nessas condições.
- O ácido láctico e o acético, juntamente com o etanol, podem ter agido sinergisticamente no metabolismo das leveduras, resultando principalmente em uma diminuição do rendimento alcoólico.
- Menores quantidades de glicerol são encontradas na presença de bactérias homofermentativas, deixando dúvidas se este composto estaria sendo produzido em menores quantidades pelas leveduras ou se bactérias de tal tipo metabólico são capazes de consumir glicerol.



## REFERÊNCIAS

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

ALTHERTUM, F.; CRUZ, M.R.M.; VAIRO, M.L.R.; GAMBASSI, P.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. 251p. 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. 118p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro. 2000.

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

AQUARONE, E. Penicillin and tetracycline as control agents in alcoholic fermentation of sugar cane molasses. **Applied Microbiology**, New York, v.8, p.263-268, 1960.



ATTFIELD, P.V. Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. **Nature Biotechnology**, New York , v.15, p.1351-1357, 1997.

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. **Efeitos de diferentes proporções de mel e caldo sobre a fermentação alcoólica**. Piracicaba: Fermentec, 1998. p. 83-95 (Relatório de Atividades).

BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G.; AMORIM, H.V. The antibacterial action of succinic acid produced by yeast during fermentation. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.28, p.77-88, 1997.

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; LOPES, M.L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v.8, p.1155–1163, 2008.

BASSO, T.O. Manitol e Metabolismo Bacteriano. In: REUNIÃO ANUAL FERMENTEC, 27<sup>a</sup>. 2006. Piracicaba. **Anais...**Piracicaba: FERMENTEC, 2006.

BAYROCK, D.P; INGLEDEW, W.M. Ethanol production in multistage continuous, single stage continuous, *Lactobacillus* – contaminated continuous, and batch fermentations. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v.21, p.83-88, 2005.

\_\_\_\_\_. 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.

\_\_\_\_\_. Changes in steady state on introduction of a *Lactobacillus* contaminant to a continuous culture ethanol fermentation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v.27, p.39-45, 2001.

BAYROCK, D.P.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. Control of *Lactobacillus* contaminants in continuous fuel ethanol fermentations by constant or pulsed addition of penicillin G. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.62, p.498–502, 2003.

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

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

BRUMM, P.J.; HEBEDA, R.E. Glycerol production in industrial alcohol fermentations. **Biotechnology Letters**, Kew, v.10, n.9, p.677-682, 1988.

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. Use of sulfite and hydrogen peroxide to control bacterial contamination in ethanol fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.63, p.1, 1997.

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

CHIN, P. M.; INGLEDEW, W. M. Effect of lactic acid bacteria on wheat mash fermentations prepared with laboratory backset. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v.16, p.311–317, 1994.

COSTA, V.M.; BASSO, T.O.; ANGELONI, L.H.P.; OETTERER, M.; BASSO, L.C. Produções de ácido acético, etanol e dos isômeros óticos do ácido láctico por linhagens de *Lactobacillus* isoladas de fermentações alcoólicas industriais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.2, p.503-509, 2008.

D'AMORE, T.; CRUMPLEN, R; STEWART G.G. The involvement of trehalose in yeast stress tolerance. **Journal of Industrial Microbiology**, Amsterdam, v.7, p.191-196, 1991.

DORTA, C.; OLIVA-NETO, P.; ABREU-NETO, M.S.; NICOLAU-JUNIOR, N.; NAGASHIMA, A.I. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.22, p.177-182, 2006.

EGGLESTON, G.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; PAULILLO, S.C.L.; BASSO, T.O. Mannitol as a sensitive indicator of sugarcane deterioration and bacterial contamination in fuel alcohol production. **Zuckerindustrie**, Berlin, v.132, n.1, p.33-39, 2007.

FERGUGLIA, R.M.O. **Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* em cultura mista com *Lactobacillus fermentum* envolvidos na floculação de leveduras**. 1997. 104p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – 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. 338p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 1990.

GALLO, C.R.; CANHOS, V.P. Contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica, **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v.9, p.45-55, 1991.

GAO, C.; FLEET, G.H. The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 65, p.405-409, 1988.

GARVIE, E.I. Bacterial lactate dehydrogenases. **Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.44, p.106-139, 1980.

GILLILAND, R.P., LACEY, J.P. Lethal action by an *Acetobacter* on yeasts. **Nature**, London, v.202, p.727-728, 1964.

GOTTSCHALK, G. **Bacterial metabolism**. 2 nd. ed., New York: Springer-Verlag 1979. 359p.

GRANDA, C.B.; ZHU, L.; HOLTZAPPLE, M.T. Sustainable liquid biofuels and their environmental impact. **Environmental Progress**, New York, v.26, n.3, p. 233-250, 2007.

GUCHTE, M.; SERROR, P., CHERVAUX, C.; SMOKVINA.T.; EHRlich, E.D.; MAGUIN, E. Stress response in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v.82, n.1/4, p.187-216, 2002.

HYNES, S.H.; KJARSGAARD, D.M.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. Use of virginiamycin to control the growth of lactic acid bacteria during alcohol fermentation. **Journal of Industrial Microbiology**, Amsterdam, v.18, p.284–291, 1997.

HOJVENDAHL, 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.

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.

KAJI, D.A.; CANHOS, V.P. Contaminantes do processo de produção de açúcar e álcool. In: EGUCHI S.Y.; YOKOYA, F.; CANHOS V.P.; GALLO, C.R. **Pontos críticos microbiológicos em usinas de açúcar e álcool**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas Tecnológicas André Tosello, 1989. p.1-9.

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

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

KANEKO, T.; YAMAMOTO, Y. Killing of yeast by acid bacteria. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v.74, n.5, p.476, 1968.

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. 54, n.4, p.1046-1051, 1991.

LEÃO, M.H.R., SALGADO, A.M., FERREIRA, A.M.N., ALCÁZAR, E.B; PEREIRA Jr, N. Alteração da conversão de açúcar em álcool por células de levedura aprisionadas. **Álcool & Açúcar**, São Paulo, v.75, p.16-24, 1994.

LEITE, R.C.C. **Biomassa, a esperança verde para poucos**. 2005. Disponível em: <http://www.agrisustentavel.com/san/biomassa.htm>. Acesso em: 28 jan. 2008.

LILLIE, S.H.; PRINGLE, J.R. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: response to nutrient limitation. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.143, p.1384-1394, 1980.

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 bacteria on laboratory-scale yeast fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v.14, p.350–357, 1992.

MANOME, A.; OKADA, S.; UCHIMURA, T.; KOMAGATA, K. The ratio of L-form to D-form of lactic acid as a criteria for the identification of lactic acid bacteria. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 44, p.371–374, 1998.

MANSURE, J.J.; SOUZA, R.C.; PANEK, A.D. Trehalose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. **Biotechnology Letters**, Kew, v.19, n.2, p.1201-1203, 1997.

MEIGNEN, B.; ONNO, B.; GELINAS, P.; INFANTES, M.; GUILOIS, S.; CAHAGNIER, B., Optimization of sourdough fermentation with *Lactobacillus brevis* and baker's yeast. **Food Microbiology**, New York, v.18, n.3, p.239-245, 2001.

MOMOSE, H.; TONOIKE, T. Studies on the putrefactive fermentation of sake mash (XIII). On endogenous respiration of sake yeast cultured with putrefactive lactic acid bacteria. **Journal of Fermentation Technology**, Osaka, v.46, p.765-771, 1968.

MYERS, D.K.; LAWLOR, D.T.; ATTFIELD, P.V. Influence of invertase activity and glycerol synthesis and retention on fermentation of media with high sugar concentration by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.63, p.145-150, 1997.

NARENDRANATH. N.V.; HYNWA, S.H.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. Effects of lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.63, n.11, p.4158-4163, 1997.

NARENDRANATH N.V., POWER, R. Effect of yeast inoculation rate on the metabolism of contaminating lactobacilli during fermentation of corn mash. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v.31, p.581-584, 2004.

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.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW W.M. Urea hydrogen peroxide reduces the numbers of lactobacilli, nourishes yeast, and leaves no residues in the ethanol fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.66, p.4187–4192, 2000.

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

NOBRE, T. P. **Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica**. 2005. 90p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2005.

NODA, F. HAYASHI, K.; MIZUNUMA, T. Antagonism between osmophilic lactic acid bacteria and yeast in brine fermentation of soy sauce. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.40, p.452-457, 1980.

OLIVA-NETO, P. **Estudos de diferentes fatores que influenciam o crescimento da população bacteriana contaminante da fermentação alcoólica por leveduras**. 1995. 183p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1995.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA F. Effect of 3,4,4'-trichlorocarbanilide on growth of lactic acid bacteria contaminants in alcoholic fermentation. **Bioresource Technology**, Essex, v.63, p.17, 1998.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Effects 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.

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

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, 89p.



OLIVEIRA, E.P.; SOBRINHO, J.B.S.; NEGREIROS, J.C.; AMAZONAS, L.; ALMEIDA, MBA; ANDRADE, R.A.; PIFFER, T.R.O.; TEIXEIRA, W.S. **Acompanhamento da safra brasileira. Cana-de-açúcar – safra 2007/2008, terceiro levantamento**. 2007. 13p. CONAB, Brasília, DF. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/2lev-cana.pdf>. Acesso em: 28 jan. 2008.

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

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

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

PARROU, J.L.; TESTE, M.A.; FRANCOIS, J. Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose. **Microbiology**, Reading, v.143, p.1891-1900, 1997.

QUADRI, 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.

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

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

SILVA, N.; NAKASATO, L.T.; MIYAGUSKU, L. Avaliação do método de plaqueamento em gotas para contagem de microrganismos. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.1, p.49-54, jan./jun. 1996.

SINGER, M.A.; LINDQUIST, S. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v.16, p.460-468, 1998.

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

SKINNER-NEMEC, K.A.; NICHOLS, N.N.; LEATHERS, T.D. Biofilm formation by bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Biotechnology Letters**, Kew, v.29, p.379-383. 2007.

STEWART, P.S.; MUKHERJEE, P.K.; GHANNOUM, M.A. Biofilm antimicrobial resistance. In: Ghannoum, M.; O'Toole, G.A. (Ed.) **Microbial biofilms**. Washington: ASM Press, 2004. p. 250-268.

TANI, Y.; SCHIMOIDE, M.; SUMINO, K.; FUKUI, S. Influence of culture condition on coagulation of *Saccharomyces sake* occurring in media containing lactic acid. **Journal of Fermentation Technology**, Osaka, v.41, p.445-450, 1963.

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.

THOMAS K.C., HYNES S.H., INGLEDEW W.M. Influence of medium buffering capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic and lactic acids. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.68, p.1616–1623, 2002.

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

URBAIN, W.M. **Food irradiation**. Orlando: Academic Press, 1986. 351p.

VALDES, C. Ethanol demand driving the expansion of Brazil's sugar industry. **Sugar Journal**, New Orleans, v. 70, p. 9-11, 2007.

VAN WEYMARN, N. Production of D-mannitol by heterofermentative lactic acid bacteria. **Process Biochemistry**, London, v.37, p. 1207-1213, 2002.

WALKER, G.M. **Yeast physiology and biotechnology**. New York: John Wiley, 1998, 350p.

WALKSMAN, S.A.; **Microbial antagonism and antibiotic substances**. New York: The Commonwealth Fund, 1945. p.38-215.

WATANABE, I.; NAKAMURA, T.; SHIMA, J. A strategy to prevent the occurrence of *Lactobacillus* strains using lactate-tolerant yeast *Candida glabrata* in bioethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v.35, p.1117-1122, 2008.

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

YOKOYA, F.; OLIVA-NETO, P. Características da floculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum*. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.22, n.1, p.12-16, 1991.

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

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.

ZHOU, S; SHANMUGAM, K.T. E INGRAM, L.O. Functional replacement of the *Escherichia coli* D(-)-lactate dehydrogenase gene (ldhA) with the L(+)-lactate dehydrogenase gene (ldhL) from *Pediococcus acidilactici*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.69, n. 4, p.2237-2244, 2003.



# **ANEXO**



## Experimento I (Condições de Laboratório)

### Experimento principal

Tabela 4 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria e com bactéria homofermentativa (025) sobre os teores de succinato (mM), lactato (mM), acetato (mM), glicerol (mM), manitol (mM) e etanol (mM) após 24h de crescimento empregando-se as leveduras BG-1, CAT-1, Fleischmann e PE-2

(continua)

Tratamento	Succinato (mM)	Lactato (mM)	Acetato (mM)	Glicerol (mM)	Manitol (mM)	Etanol (mM)
BG-1	0.83	0.00	4.43	9.99	0.00	177.28
	0.93	0.00	3.70	9.90	0.00	171.00
	0.84	0.00	3.93	10.55	0.00	168.38
Média	0.86	0.00	4.02	10.15	0.00	172.22
BG-1 + 025	0.89	53.68	4.79	7.40	0.00	150.31
	0.85	53.07	4.30	7.08	0.00	147.69
	0.87	56.50	3.99	7.28	0.00	149.56
Média	0.87	54.41	4.36	7.25	0.00	149.19
CAT-1	0.66	0.00	3.23	8.57	0.00	165.84
	0.69	0.00	3.41	8.43	0.00	174.19
	0.68	0.00	3.97	8.72	0.00	168.84
Média	0.68	0.00	3.54	8.57	0.00	169.62
CAT-1 + 025	0.76	40.76	3.58	7.01	0.00	162.20
	0.83	46.95	3.94	6.47	0.00	160.93
	0.84	42.11	4.10	7.00	0.00	164.80
Média	0.81	43.27	3.87	6.83	0.00	162.64
FL	0.67	0.00	3.22	5.46	0.00	173.08
	0.74	0.00	3.06	5.54	0.00	171.09
	0.75	0.00	3.18	4.83	0.00	169.63
Média	0.72	0.00	3.15	5.28	0.00	171.27
FL + 025	0.90	51.28	2.70	4.20	0.00	158.18
	0.90	57.61	2.83	4.22	0.00	159.06
	0.93	54.16	2.79	3.67	0.00	160.81
Média	0.91	54.35	2.77	4.03	0.00	159.35



Tabela 5 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria e com bactéria homofermentativa (025) sobre os teores de succinato (mM), lactato (mM), acetato (mM), glicerol (mM), manitol (mM) e etanol (mM) após 24h de crescimento empregando-se as leveduras BG-1, CAT-1, Fleischmann e PE-2

(conclusão)						
Tratamento	Succinato (mM)	Lactato (mM)	Acetato (mM)	Glicerol (mM)	Manitol (mM)	Etanol (mM)
PE-2	0.85	0.00	5.63	8.44	0.00	188.81
	0.81	0.00	3.98	8.48	0.00	180.80
	0.85	0.00	4.96	8.23	0.00	178.74
Média	0.83	0.00	4.86	8.38	0.00	182.78
PE-2 + 025	0.77	57.07	3.97	6.56	0.00	149.14
	0.80	53.49	4.24	6.29	0.00	150.01
	0.84	53.17	4.38	6.38	0.00	157.62
Média	0.80	54.57	4.20	6.41	0.00	152.26

Tabela 6 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria e com bactéria heterofermentativa (230) sobre os teores de succinato (mM), lactato (mM), acetato (mM), glicerol (mM), manitol (mM) e etanol (mM) após 24h de crescimento empregando-se as leveduras BG, CAT-1, Fleischmann e PE-2

Tratamento	Succinato (mM)	Lactato (mM)	Acetato (mM)	Glicerol (mM)	Manitol (mM)	Etanol (mM)
BG-1	0,94	0,00	4,22	9,63	0,00	189,68
	0,88	0,00	3,83	9,92	0,00	180,25
	1,00	0,00	4,34	10,18	0,00	185,15
Média	0,94	0,00	4,13	9,91	0,00	185,02
BG-1 + 230	0,81	11,07	9,73	13,53	2,76	179,07
	0,83	10,67	9,73	13,30	2,92	168,58
	0,83	11,27	10,21	14,38	3,14	168,52
Média	0,82	11,00	9,89	13,73	2,94	172,06
CAT-1	0,78	0,00	3,58	8,71	0,00	184,71
	0,72	0,00	3,88	7,77	0,00	185,06
	0,78	0,00	3,84	7,92	0,00	187,55
Média	0,76	0,00	3,76	8,14	0,00	185,77
CAT-1 + 230	0,75	10,39	8,85	11,86	2,71	175,48
	0,81	10,68	9,28	12,32	3,07	178,71
	0,77	10,64	9,20	11,99	3,04	176,41
Média	0,78	10,57	9,11	12,06	2,94	176,87
FL	0,81	0,00	2,31	5,86	0,00	187,55
	0,82	0,00	2,53	5,78	0,00	190,29
	0,88	0,00	2,26	6,00	0,00	191,73
Média	0,83	0,00	2,37	5,88	0,00	189,85
FL + 230	0,90	16,30	10,62	10,52	7,22	164,54
	1,35	16,88	11,64	10,61	7,62	163,98
	0,95	16,35	11,00	10,25	6,78	164,20
Média	1,07	16,51	11,09	10,46	7,21	164,24
PE-2	0,87	0,00	3,79	10,06	0,00	183,92
	0,90	0,00	3,88	9,00	0,00	195,49
	0,79	0,00	4,34	10,22	0,00	182,12
Média	0,85	0,00	4,00	9,76	0,00	187,18
PE-2 + 230	0,67	10,3	8,71	13,65	2,92	146,64
	0,80	12,4	10,99	14,63	3,54	175,16
	0,77	12,9	11,04	14,46	3,62	172,67
Média	0,75	11,9	10,25	14,25	3,36	164,82

## Experimentos suporte

Tabela 7 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre os teores de succinato (mM), lactato (mM), acetato (mM), glicerol (mM), manitol (mM) e etanol (mM) após 24h de crescimento empregando-se a levedura BG-1

Tratamento	Succinato (mM)	Lactato (mM)	Acetato (mM)	Glicerol (mM)	Manitol (mM)	Etanol (mM)
BG-1	0,90	0,00	2,50	9,38	0,58	171,36
	0,90	0,00	2,00	6,65	0,62	177,24
	0,90	0,00	2,50	9,55	0,56	178,08
Média	0,90	0,00	2,33	8,53	0,58	175,56
BG-1 + 025	0,90	25,85	3,00	7,89	0,12	161,28
	0,90	26,31	3,00	8,73	0,13	161,28
	0,90	22,62	3,00	8,47	0,00	167,16
	Média	0,90	24,92	3,00	8,36	0,08
BG-1 + 230	1,02	8,77	7,00	11,63	1,41	162,96
	0,90	8,08	6,00	10,93	1,23	166,32
	1,02	7,85	6,00	10,19	1,07	168,00
	Média	0,98	8,23	6,33	10,92	1,24

Tabela 8 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre os teores de succinato (mM), lactato (mM), acetato (mM), glicerol (mM), manitol (mM) e etanol (mM) após 24h de crescimento empregando-se a levedura CAT-1

Tratamento	Succinato (mM)	Lactato (mM)	Acetato (mM)	Glicerol (mM)	Manitol (mM)	Etanol (mM)
CAT-1	0,70	0,00	1,74	8,04	0,81	195,70
	0,59	0,00	1,38	7,54	0,74	165,44
	0,66	0,00	1,74	7,12	0,69	170,45
Média	0,65	0,00	1,62	7,56	0,75	177,20
CAT-1 + 025	1,05	34,87	1,77	6,61	0,12	167,49
	0,76	36,88	2,05	6,15	0,00	165,16
	0,65	32,07	1,60	6,53	0,12	146,40
	Média	0,82	34,61	1,81	6,43	0,08
CAT-1 + 230	0,59	7,32	5,50	11,17	2,01	153,09
	0,73	10,00	6,43	11,43	2,34	170,37
	0,78	10,18	6,54	10,79	2,16	178,44
	Média	0,70	9,17	6,15	11,13	2,17

Tabela 9 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre os teores de succinato (mM), lactato (mM), acetato (mM), glicerol (mM), manitol (mM) e etanol (mM) após 24h de crescimento empregando-se a levedura Fleischmann

Tratamento	Succinato (mM)	Lactato (mM)	Acetato (mM)	Glicerol (mM)	Manitol (mM)	Etanol (mM)
FL	0,90	0,00	1,50	6,45	0,11	181,44
	0,90	0,00	1,00	6,59	0,12	188,16
Média	0,90	0,00	1,00	7,08	0,15	189,84
	0,90	0,00	1,17	6,71	0,13	186,48
FL + 025	0,90	39,00	2,00	5,57	0,12	168,0
	0,90	40,15	1,50	4,99	0,00	168,0
	0,90	39,69	1,00	5,20	0,11	168,0
Média	0,90	39,62	1,50	5,26	0,08	168,0
FL + 230	1,13	15,69	9,00	11,11	5,69	162,96
	1,13	14,31	7,50	9,99	4,13	159,60
	0,90	14,31	8,00	10,23	4,60	166,32
Média	1,05	14,77	8,17	10,44	4,81	162,96

Tabela 10 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre os teores de succinato (mM), lactato (mM), acetato (mM), glicerol (mM), manitol (mM) e etanol (mM) após 24h de crescimento empregando-se a levedura PE-2

Tratamento	Succinato (mM)	Lactato (mM)	Acetato (mM)	Glicerol (mM)	Manitol (mM)	Etanol (mM)
PE-2	0,90	0,00	1,50	7,71	0,44	162,96
	0,90	0,00	1,50	7,90	0,53	179,76
Média	0,90	0,00	1,50	8,35	0,58	185,64
	0,90	0,00	1,50	7,99	0,52	176,12
PE-2 + 025	0,79	48,00	1,50	6,43	0,15	151,20
	0,90	49,85	2,00	6,88	0,12	156,24
	0,90	47,54	2,00	7,11	0,12	156,24
Média	0,86	48,46	1,83	6,81	0,13	154,56
PE-2 + 230	0,90	18,00	11,00	13,48	8,95	147,84
	0,90	17,08	11,00	12,59	8,27	149,52
	0,90	16,62	11,00	12,00	6,83	152,88
Média	0,90	17,23	11,00	12,69	8,02	150,08

## Experimento II (Simulando condições industriais)

### Levedura CAT-1

Tabela 11 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre o rendimento fermentativo (%), crescimento do fermento (g) e pH no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura CAT-1

Tratamento	RENDIMENTO FERMENTATIVO (%)					MÉDIA GERAL	PESO DE FERMENTO (g)					pH					
	R1	R2	R3	R4	R5		PI	P1	P2	P3	P4	P5	pH1	pH2	pH3	pH4	pH5
CAT-1	88,8	93,8	94,8	94,7	93,8		8,00	9,00	9,36	9,24	9,13	9,98	5,01	4,97	4,96	4,9	4,87
	89,3	94,3	94,5	95,4	94,6		7,92	8,81	9,14	9,25	9,13	9,73	5,02	4,96	4,95	4,9	4,88
	89,9	94,5	94,2	95,8	94,6		7,96	8,84	9,07	9,36	9,06	9,89	5,01	4,96	4,95	4,9	4,87
Média	89,4	94,2	94,5	95,3	94,4	93,53	7,96	8,88	9,19	9,28	9,11	9,87	5,01	4,96	4,95	4,90	4,87
CAT-1 + 025	89,9	92,6	92,7	93,2	91,7		8,10	8,67	8,88	8,60	8,53	9,28	4,60	4,54	4,70	4,70	4,71
	89,9	93,7	93,8	94,8	93,8		7,98	8,78	9,05	8,79	8,63	9,48	4,61	4,56	4,71	4,73	4,76
	90,3	94,3	94,4	95,5	94,1		7,94	8,76	8,92	8,74	8,55	9,18	4,60	4,54	4,68	4,69	4,71
Média	90,0	93,5	93,6	94,5	93,2	92,99	8,01	8,74	8,95	8,71	8,57	9,31	4,60	4,55	4,70	4,71	4,73
CAT-1 + 230	90,3	91,7	92,2	91,8	89,8		7,95	8,76	9,03	8,72	8,52	9,17	4,73	4,68	4,65	4,64	4,56
	89,5	91,2	92,1	90,8	90,0		7,88	8,65	8,82	8,68	8,49	9,32	4,72	4,68	4,66	4,66	4,59
	89,0	91,0	91,8	90,4	90,0		7,97	8,62	9,02	8,82	8,79	9,85	4,72	4,66	4,65	4,68	4,62
Média	89,6	91,3	92,0	91,0	90,0	90,78	7,93	8,68	8,96	8,74	8,60	9,45	4,72	4,67	4,65	4,66	4,59

Tabela 12 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a viabilidade da levedura (%), taxa de brotamento (%) e os teores de trealose (%) no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura CAT-1

Tratamento	VIABILIDADE (%)					BROTAMENTO (%)					TREALOSE (%)	
	V1	V2	V3	V4	V5	BR1	BR2	BR3	BR4	BR5	INICIAL	FINAL
CAT-1	100	97	97	97	92	16	18	11	15	57	4,19	8,33
	99	97	96	96	87	10	12	15	18	42	4,17	9,31
	100	96	96	94	93	14	16	16	27	50	4,30	8,51
Média	99	97	96	95	91	13	15	14	20	50	4,22	8,72
CAT-1 + 025	97	96	95	94	93	13	18	13	15	40	4,19	9,24
	96	96	95	94	90	20	18	15	16	41	4,17	8,96
	97	98	97	94	90	12	13	11	12	55	4,30	10,12
Média	97	97	96	94	91	15	16	13	14	46	4,22	9,44
CAT-1 + 230	97	95	95	93	93	18	14	19	18	24	4,19	9,29
	98	94	94	92	87	9	12	10	14	28	4,17	9,68
	97	95	93	92	91	20	16	13	19	39	4,30	10,37
Média	97	95	94	93	91	16	14	14	17	30	4,22	9,78

Tabela 13 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a contaminação bacteriana observada por contagem ao microscópio ótico ( $10^7$  células.mL<sup>-1</sup>), pelo método do Microplaqueamento em Gotas ( $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>) e sobre a viabilidade bacteriana % no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura CAT-1

Tratamento	BACTÉRIAS ( $10^7$ células.mL <sup>-1</sup> )					BACTÉRIAS ( $10^7$ UFC.mL <sup>-1</sup> )				VIABILIDADE BACTERIANA (%)				
	BC1	BC2	BC3	BC4	BC5	BC2	BC3	BC4	BC5	VB1	VB2	VB3	VB4	VB5
CAT-1	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,001	0,001	0,001	0,001	0	0	0	0	0
	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,001	0,001	0,001	0,001	0	0	0	0	0
	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,001	0,001	0,001	0,001	0	0	0	0	0
Média	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,001	0,001	0,001	0,001	0	0	0	0	0
CAT-1 + 025	6,82	5,23	3,86	4,32	0,10	0,15	0,11	0,10	0,11	64	30	27	26	0
	2,27	7,28	5,23	2,73	0,68	0,16	0,11	0,07	0,11	37	31	24	14	3
	3,18	3,19	3,86	3,64	0,10	0,16	0,10	0,09	0,10	47	17	22	25	0
Média	4,09	5,23	4,32	3,56	0,29	0,16	0,11	0,09	0,11	49	26	25	22	1
CAT-1 + 230	20,40	16,60	40,20	29,80	47,10	0,45	0,60	0,77	0,60	85	44	71	74	80
	18,60	33,90	37,00	44,10	40,50	0,47	0,73	0,67	0,73	77	66	66	83	73
	19,30	22,50	29,30	26,80	38,00	0,49	0,60	0,67	0,60	88	57	63	70	74
Média	19,43	24,33	35,50	33,57	41,87	0,47	0,64	0,70	0,64	83	55	67	75	75

Tabela 14 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre os teores residuais de açúcares (%), expressos como ART e sacarose no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura CAT-1

Tratamento	ART RESIDUAL (%)					SACAROSE RESIDUAL(%)				
	ART1	ART2	ART3	ART4	ART5	SAC1	SAC2	SAC3	SAC4	SAC5
CAT-1	0,032	0,045	0,030	0,030	0,026	0,015	0,026	0,012	0,013	0,010
	0,036	0,045	0,026	0,030	0,030	0,019	0,026	0,009	0,011	0,013
	0,035	0,029	0,029	0,024	0,030	0,016	0,010	0,011	0,008	0,014
Média	0,034	0,039	0,028	0,028	0,029	0,017	0,021	0,011	0,011	0,012
CAT-1 + 025	0,032	0,034	0,029	0,020	0,023	0,018	0,022	0,017	0,009	0,012
	0,044	0,089	0,032	0,022	0,028	0,030	0,017	0,019	0,011	0,017
	0,036	0,058	0,022	0,032	0,056	0,022	0,023	0,010	0,020	0,012
Média	0,038	0,060	0,028	0,025	0,036	0,023	0,021	0,015	0,013	0,014
CAT-1 + 230	0,044	0,103	0,023	0,023	0,056	0,030	0,030	0,012	0,011	0,014
	0,037	0,037	0,025	0,020	0,085	0,024	0,023	0,013	0,009	0,011
	0,044	0,036	0,023	0,022	0,055	0,030	0,022	0,012	0,011	0,012
Média	0,042	0,059	0,024	0,022	0,065	0,028	0,025	0,012	0,010	0,012



Tabela 15 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre os teores residuais de açúcares (%), expressos como glicose e frutose no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura CAT-1

Tratamento	GLICOSE RESIDUAL (%)					FRUTOSE RESIDUAL (%)				
	G1	G2	G3	G4	G5	F1	F2	F3	F4	F5
CAT-1	0,015	0,017	0,016	0,015	0,015	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
	0,015	0,017	0,016	0,017	0,016	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
	0,017	0,017	0,016	0,014	0,015	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Média	0,016	0,017	0,016	0,016	0,015	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
CAT-1 + 025	0,012	0,010	0,011	0,010	0,009	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
	0,012	0,010	0,011	0,010	0,010	0,001	0,061	0,001	0,001	0,001
	0,012	0,010	0,010	0,010	0,009	0,001	0,023	0,001	0,001	0,034
Média	0,012	0,010	0,011	0,010	0,009	0,001	0,028	0,001	0,001	0,012
CAT-1 + 230	0,012	0,011	0,010	0,011	0,009	0,001	0,060	0,001	0,001	0,033
	0,011	0,010	0,011	0,010	0,009	0,001	0,003	0,001	0,001	0,064
	0,011	0,010	0,010	0,009	0,009	0,001	0,003	0,001	0,001	0,033
Média	0,011	0,010	0,010	0,010	0,009	0,001	0,022	0,001	0,001	0,043

Tabela 16 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a formação de succinato (mM), lactato (mM) e acetado (mM) no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura CAT-1

Tratamento	SUCCINATO (mM)					LACTATO (mM)					ACETATO (mM)				
	S1	S2	S3	S4	S5	L1	L2	L3	L4	L5	A1	A2	A3	A4	A5
CAT-1	3,46	2,51	2,47	3,23	4,15	3,25	2,62	9,85	2,54	3,60	7,53	9,87	14,16	11,06	9,66
	3,19	2,54	2,55	3,40	3,75	2,98	2,40	2,49	2,69	2,83	8,66	9,35	10,98	11,54	9,91
	3,19	2,40	2,53	3,28	4,19	2,78	2,44	2,20	2,66	2,95	9,63	9,82	10,54	11,99	9,87
Média	3,28	2,48	2,51	3,30	4,03	3,00	2,49	4,85	2,63	3,13	8,61	9,68	11,89	11,53	9,81
CAT-1 + 025	2,37	2,50	2,51	3,23	4,01	35,77	39,90	23,92	27,18	23,32	15,14	18,00	13,85	14,64	11,36
	2,44	2,03	2,19	3,13	3,61	43,34	45,41	27,18	29,39	27,23	16,47	19,79	13,86	15,34	12,63
	2,75	2,03	2,10	3,19	3,50	42,90	45,00	29,23	32,56	29,99	15,58	18,59	14,22	15,02	12,11
Média	2,52	2,19	2,27	3,18	3,70	40,67	43,43	26,78	29,71	26,85	15,73	18,79	13,98	15,00	12,03
CAT-1 + 230	2,35	2,20	2,08	2,99	3,14	38,60	45,13	29,90	35,37	35,26	23,28	30,05	21,32	25,06	21,66
	2,82	2,09	2,41	2,98	3,11	39,69	42,98	30,76	34,08	35,69	27,64	30,79	23,26	24,80	23,97
	2,68	1,87	2,35	2,65	3,46	39,30	43,10	31,12	32,25	33,45	26,91	30,47	23,01	15,76	21,86
Média	2,62	2,05	2,28	2,87	3,24	39,20	43,74	30,60	33,90	34,80	25,94	30,44	22,53	21,87	22,50

Tabela 17 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a formação de glicerol (mM) e manitol (mM) no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura CAT-1

Tratamento	GLICEROL (mM)					MANITOL (mM)				
	G1	G2	G3	G4	G5	M1	M2	M3	M4	M5
CAT-1	0,437	0,411	0,403	0,437	0,488	0,008	0,007	0,008	0,007	0,007
	0,434	0,413	0,396	0,436	0,478	0,008	0,008	0,008	0,008	0,006
	0,442	0,406	0,401	0,439	0,504	0,008	0,007	0,008	0,007	0,007
Média	0,437	0,410	0,400	0,437	0,490	0,008	0,007	0,008	0,007	0,007
CAT-1 + 025	0,357	0,342	0,378	0,430	0,494	0,002	0,002	0,003	0,003	0,003
	0,356	0,338	0,383	0,417	0,505	0,002	0,002	0,003	0,003	0,003
	0,344	0,339	0,375	0,429	0,489	0,002	0,002	0,003	0,003	0,003
Média	0,352	0,339	0,379	0,425	0,496	0,002	0,002	0,003	0,003	0,003
CAT-1 + 230	0,416	0,446	0,491	0,548	0,622	0,028	0,039	0,057	0,065	0,073
	0,438	0,440	0,491	0,544	0,605	0,028	0,041	0,060	0,059	0,060
	0,412	0,439	0,509	0,561	0,602	0,026	0,038	0,055	0,045	0,045
Média	0,422	0,442	0,497	0,551	0,610	0,027	0,039	0,057	0,056	0,059

Tabela 18 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a velocidade de fermentação (g de CO<sub>2</sub>) no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura CAT-1

Tratamento	Ciclo	VELOCIDADE DE FERMENTAÇÃO (g de CO <sub>2</sub> )					
		1.5h	3h	4.5h	6h	7.5h	21h
CAT-1	1	0,95	2,51	3,87	4,78	5,14	5,44
	2	0,93	2,26	3,86	4,98	5,30	5,64
	3	1,07	2,86	4,47	5,24	5,52	5,68
	4	1,12	2,60	4,78	5,31	5,56	5,74
	5	1,21	2,90	4,49	5,47	5,58	5,73
	Média	1,06	2,63	4,29	5,15	5,42	5,65
CAT-1 + 025	1	0,95	2,56	3,88	4,91	5,26	5,61
	2	0,91	2,27	3,78	5,09	5,43	5,80
	3	1,05	2,74	4,34	5,25	5,60	5,84
	4	0,95	2,35	4,34	5,20	5,60	5,88
	5	1,11	2,77	4,23	5,46	5,57	5,80
	Média	0,99	2,54	4,11	5,18	5,49	5,78
CAT-1 + 230	1	0,87	2,46	3,64	4,67	5,09	5,45
	2	0,95	2,19	3,81	5,02	5,39	5,80
	3	1,01	2,57	4,03	4,87	5,37	5,66
	4	0,94	2,29	4,24	4,84	5,33	5,68
	5	1,19	2,70	3,80	5,30	5,30	5,62
	Média	0,99	2,44	3,90	4,94	5,30	5,64

## Levedura BG-1

Tabela 19 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre o rendimento fermentativo (%), crescimento do fermento (g) e pH no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura BG-1

Tratamento	RENDIMENTO FERMENTATIVO (%)					MÉDIA	PESO DE FERMENTO (g)					pH					
	R1	R2	R3	R4	R5	GERAL	PI	P1	P2	P3	P4	P5	pH1	pH2	pH3	pH4	pH5
BG-1	80,7	81,7	82,5	81,6	82,1		7,20	8,12	8,37	8,44	8,65	8,79	4,29	4,28	4,28	4,26	4,24
	81,7	82,2	82,2	83,2	82,7		7,16	8,07	8,34	8,55	8,70	8,80	4,28	4,29	4,26	4,25	4,26
	81,5	81,6	82,6	83,4	82,7		7,22	8,13	8,38	8,63	8,71	8,79	4,29	4,27	4,28	4,26	4,27
Média	81,3	81,8	82,4	82,7	82,5	82,16	7,19	8,11	8,36	8,54	8,69	8,79	3,47	4,28	4,27	4,26	4,26
BG-1 + 025	81,0	82,1	83,2	82,0	82,4		7,19	8,79	9,44	8,96	8,94	8,94	4,12	3,90	4,02	4,01	3,99
	82,1	82,4	82,4	82,1	82,1		7,17	8,66	9,19	9,21	9,33	9,39	4,14	3,93	4,11	4,15	4,11
	81,3	82,4	82,6	82,1	82,1		7,18	8,66	9,27	9,46	9,26	9,24	4,13	3,92	4,03	4,03	4,06
Média	81,5	82,3	82,7	82,1	82,2	82,16	7,18	8,70	9,30	9,21	9,18	9,19	4,13	3,92	4,05	4,06	4,05
BG-1 + 230	81,5	81,3	81,3	81,1	80,9		7,19	8,44	8,51	8,46	8,43	8,48	4,33	4,27	4,2	4,16	4,1
	81,2	82,0	81,5	82,1	80,9		7,22	8,49	8,55	8,40	8,41	8,54	4,34	4,29	4,23	4,17	4,13
	81,0	80,9	81,5	81,3	80,8		7,19	8,50	8,60	8,73	8,81	8,97	4,33	4,28	4,20	4,17	4,13
Média	81,3	81,4	81,4	81,5	80,8	81,29	7,20	8,48	8,55	8,53	8,55	8,66	4,33	4,28	4,21	4,17	4,12
BG-1 + 432	80,5	80,3	80,2	81,0	79,3		7,21	8,22	8,15	8,24	8,39	8,54	4,34	4,3	4,23	4,17	4,08
	80,5	80,9	80,7	80,2	79,9		7,10	7,97	7,65	7,80	7,99	8,04	4,29	4,27	4,21	4,13	4,06
	80,9	81,2	81,4	80,7	80,4		7,25	7,92	7,65	7,74	7,93	8,09	4,29	4,30	4,21	4,15	4,06
Média	80,6	80,8	80,8	80,7	79,9	80,54	7,19	8,04	7,82	7,93	8,10	8,22	4,31	4,29	4,22	4,15	4,07

Tabela 20 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a viabilidade da levedura (%), taxa de brotamento (%) e os teores de trealose (%) no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura BG-1

Tratamento	VIABILIDADE (%)					BROTAMENTO (%)					TREALOSE (%)	
	V1	V2	V3	V4	V5	BR1	BR2	BR3	BR4	BR5	INICIAL	FINAL
BG-1	100	99	95	93	92	11	11	12	10	8	2,96	7,21
	100	99	97	92	92	9	13	13	10	7	2,96	7,54
	99	99	95	96	93	11	10	10	8	9	2,96	7,12
Média	99	99	96	93	92	10	11	12	9	8	2,96	7,29
BG-1 + 025	99	98	89	90	87	14	10	13	8	9	2,96	6,51
	99	99	97	95	93	13	9	15	7	10	2,96	7,00
	99	98	93	93	94	10	9	17	10	10	2,96	6,88
	Média	99	98	93	93	91	12	9	15	9	10	2,96
BG-1 + 230	98	98	93	92	91	10	10	11	9	7	2,96	6,93
	98	98	97	93	92	13	13	10	12	11	2,96	7,15
	99	98	92	92	90	12	12	9	12	9	2,96	7,10
	Média	99	98	94	93	91	12	12	10	11	9	2,96
BG-1 + 432	99	97	96	90	90	13	9	10	11	7	2,96	6,72
	98	98	97	94	93	11	10	12	9	9	2,96	6,88
	98	99	94	94	92	18	8	12	12	7	2,96	7,18
	Média	98	98	95	93	92	14	9	11	11	8	2,96

Tabela 21 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a contaminação bacteriana observada por contagem ao microscópio ótico ( $10^7$  células.mL<sup>-1</sup>), pelo método do Microplaqueamento em Gotas ( $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>) e sobre a viabilidade bacteriana % no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura BG-1

Tratamento	BACTÉRIAS ( $10^7$ células.mL <sup>-1</sup> )					BACTÉRIAS ( $10^7$ UFC.mL <sup>-1</sup> )					VIABILIDADE BACTERIANA (%)				
	BC1	BC2	BC3	BC4	BC5	BC1	BC2	BC3	BC4	BC5	VB1	VB2	VB3	VB4	VB5
BG-1	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0	0	0	0	0
	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0	0	0	0	0
	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0	0	0	0	0
Média	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0	0	0	0	0
BG-1 + 025	3,64	4,32	3,18	2,27	2,04	20,00	21,70	12,00	11,70	14,30	16	9	9	6	7
	1,59	2,96	2,95	2,27	3,64	24,70	21,30	11,30	11,30	11,00	11	8	9	6	11
	2,73	6,37	3,18	2,50	2,76	17,70	21,30	12,00	11,50	12,70	11	15	7	7	6
Média	2,65	4,55	3,10	2,35	2,81	20,80	21,43	11,77	11,50	12,67	12	10	8	6	8
BG-1 + 230	26,90	25,30	25,20	41,20	32,10	73,70	42,70	47,70	49,70	54,70	85	85	78	83	78
	32,30	31,80	34,10	44,80	31,20	32,00	37,70	43,00	46,00	48,30	97	80	81	91	85
	25,90	32,30	30,20	41,90	35,30	56,30	40,00	45,40	49,00	45,30	96	93	89	84	89
Média	28,37	29,80	29,83	42,63	32,87	54,00	40,13	45,37	48,23	49,43	92	86	83	86	84
BG-1 + 432	19,10	27,30	23,80	31,20	39,80	16,00	19,00	18,30	18,70	23,00	92	88	87	83	89
	27,00	25,50	23,20	34,80	38,20	31,30	18,70	20,30	25,00	33,30	89	87	84	89	87
	24,80	15,40	25,40	27,00	35,00	27,70	11,50	18,30	19,30	19,70	89	89	89	81	88
Média	23,63	22,73	24,13	31,00	37,67	25,00	16,40	18,97	21,00	25,33	90	88	87	84	88

Tabela 22 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre os teores residuais de açúcares (%), expressos como ART e sacarose no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura BG-1

Tratamento	ART RESIDUAL (%)					SACAROSE RESIDUAL(%)				
	ART1	ART2	ART3	ART4	ART5	SAC1	SAC2	SAC3	SAC4	SAC5
BG-1	0,050	0,069	0,041	0,043	0,041	0,014	0,028	0,023	0,024	0,023
	0,027	0,013	0,026	0,028	0,015	0,001	0,001	0,008	0,014	0,001
	0,039	0,017	0,018	0,031	0,022	0,015	0,001	0,001	0,014	0,001
Média	0,039	0,033	0,029	0,034	0,026	0,010	0,010	0,011	0,017	0,008
BG-1 + 025	0,013	0,030	0,010	0,027	0,014	0,001	0,018	0,001	0,015	0,001
	0,019	0,013	0,015	0,033	0,015	0,001	0,001	0,001	0,019	0,001
	0,016	0,014	0,015	0,024	0,013	0,001	0,001	0,001	0,021	0,001
Média	0,016	0,019	0,013	0,028	0,014	0,001	0,007	0,001	0,018	0,001
BG-1 + 230	0,019	0,026	0,012	0,030	0,013	0,001	0,013	0,001	0,015	0,001
	0,013	0,015	0,018	0,013	0,018	0,001	0,001	0,001	0,001	0,015
	0,017	0,003	0,015	0,027	0,013	0,001	0,001	0,001	0,016	0,010
Média	0,016	0,015	0,015	0,023	0,015	0,001	0,005	0,001	0,011	0,009
BG-1 + 432	0,014	0,026	0,014	0,012	0,011	0,001	0,013	0,001	0,001	0,001
	0,014	0,014	0,016	0,032	0,031	0,001	0,001	0,001	0,018	0,015
	0,021	0,013	0,011	0,033	0,014	0,010	0,001	0,001	0,020	0,001
Média	0,017	0,018	0,013	0,026	0,019	0,004	0,005	0,001	0,013	0,006



Tabela 23 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre os teores residuais de açúcares (%), expressos como glicose e frutose no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura BG-1

Tratamento	GLICOSE RESIDUAL (%)					FRUTOSE RESIDUAL (%)				
	G1	G2	G3	G4	G5	F1	F2	F3	F4	F5
BG-1	0,034	0,021	0,016	0,017	0,016	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
	0,025	0,011	0,017	0,012	0,013	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
	0,022	0,015	0,016	0,015	0,019	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Média	0,027	0,016	0,016	0,014	0,016	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
BG-1 + 025	0,011	0,011	0,008	0,011	0,012	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
	0,017	0,011	0,013	0,012	0,013	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
	0,014	0,011	0,013	0,001	0,011	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Média	0,014	0,011	0,011	0,008	0,012	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
BG-1 + 230	0,017	0,011	0,010	0,013	0,011	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
	0,011	0,013	0,016	0,011	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
	0,015	0,001	0,013	0,009	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Média	0,014	0,008	0,013	0,011	0,004	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
BG-1 + 432	0,012	0,011	0,012	0,010	0,009	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
	0,012	0,012	0,014	0,012	0,015	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
	0,010	0,011	0,009	0,012	0,012	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Média	0,011	0,011	0,011	0,011	0,012	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001

Tabela 24 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a formação de succinato (mM), lactato (mM) e acetado (mM) no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura BG-1

Tratamento	SUCCINATO (mM)					LACTATO (mM)					ACETATO (mM)				
	S1	S2	S3	S4	S5	L1	L2	L3	L4	L5	A1	A2	A3	A4	A5
BG-1	3,25	4,92	4,82	3,99	4,74	6,89	6,84	6,38	6,77	6,41	10,84	10,30	10,19	9,58	9,42
	3,56	4,77	4,83	3,45	4,45	6,73	6,50	6,37	6,78	7,41	10,19	9,82	8,88	9,29	10,62
	3,51	4,79	4,64	4,16	5,06	6,86	6,67	6,14	6,65	13,33	9,95	10,05	9,21	9,30	8,99
Média	3,44	4,83	4,76	3,87	4,75	6,82	6,67	6,30	6,74	9,05	10,33	10,05	9,43	9,39	9,68
BG-1 + 025	3,47	2,81	3,55	3,55	6,21	43,66	63,65	44,51	43,18	52,38	16,40	18,58	13,66	12,92	14,11
	2,89	2,75	3,53	3,52	4,18	44,06	64,58	37,17	34,34	35,08	17,29	19,54	14,27	12,89	11,03
	3,56	2,70	3,42	3,65	4,94	44,81	63,83	40,85	42,05	36,90	16,97	18,79	12,90	12,22	11,26
Média	3,31	2,75	3,50	3,57	5,11	44,18	64,02	40,85	39,86	41,45	16,89	18,97	13,61	12,68	12,13
BG-1 + 230	2,43	4,10	3,85	3,91	4,78	39,08	28,68	30,47	30,97	32,17	26,31	18,41	17,83	17,84	18,79
	2,32	4,04	3,67	4,10	5,21	37,94	27,85	29,59	30,45	31,91	25,57	17,88	17,68	16,56	17,62
	3,31	4,21	3,93	4,60	5,37	38,33	27,94	29,94	30,31	31,65	24,96	16,50	16,05	16,12	16,56
Média	2,69	4,12	3,82	4,20	5,12	38,45	28,16	30,00	30,58	31,91	25,61	17,60	17,19	16,84	17,65
BG-1 + 432	3,55	4,76	4,54	5,44	5,78	33,82	26,85	28,26	29,66	32,41	22,79	14,44	13,94	14,77	17,18
	3,43	4,84	3,65	5,57	5,36	34,68	26,62	24,81	30,51	32,79	23,33	15,80	12,82	15,89	18,14
	3,63	4,69	4,53	4,87	5,57	34,51	26,62	55,70	30,23	48,54	22,34	15,48	14,59	16,46	22,71
Média	3,53	4,76	4,24	5,29	5,57	34,34	26,70	36,26	30,14	37,91	22,82	15,24	13,78	15,70	19,34

Tabela 25 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a formação de glicerol (mM) e manitol (mM) no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura BG-1

Tratamento	GLICEROL (mM)					MANITOL (mM)				
	G1	G2	G3	G4	G5	M1	M2	M3	M4	M5
BG-1	0,557	0,547	0,498	0,473	0,490	0,065	0,076	0,075	0,069	0,069
	0,524	0,519	0,496	0,470	0,523	0,067	0,067	0,068	0,064	0,071
	0,550	0,534	0,467	0,447	0,458	0,069	0,070	0,067	0,062	0,065
Média	0,544	0,533	0,487	0,463	0,490	0,067	0,071	0,070	0,065	0,068
BG-1 + 025	0,503	0,380	0,408	0,424	0,436	0,055	0,014	0,019	0,001	0,014
	0,502	0,386	0,419	0,442	0,462	0,058	0,018	0,031	0,036	0,032
	0,480	0,390	0,432	0,440	0,433	0,055	0,019	0,026	0,021	0,023
Média	0,495	0,386	0,420	0,435	0,444	0,056	0,017	0,026	0,019	0,023
BG-1 + 230	0,494	0,529	0,515	0,529	0,561	0,091	0,084	0,090	0,099	0,113
	0,483	0,526	0,496	0,522	0,575	0,091	0,083	0,089	0,094	0,105
	0,500	0,507	0,485	0,540	0,550	0,092	0,072	0,081	0,092	0,101
Média	0,492	0,521	0,499	0,530	0,562	0,091	0,079	0,087	0,095	0,106
BG-1 + 432	0,513	0,511	0,532	0,573	0,602	0,092	0,079	0,085	0,093	0,103
	0,532	0,548	0,545	0,546	0,625	0,092	0,081	0,087	0,094	0,111
	0,520	0,538	0,529	0,511	0,594	0,093	0,083	0,085	0,093	0,117
Média	0,521	0,532	0,535	0,543	0,607	0,092	0,081	0,086	0,094	0,110

Tabela 26 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a velocidade de fermentação (g de CO<sub>2</sub>) no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura BG-1

Tratamento	Ciclo	VELOCIDADE DE FERMENTAÇÃO (g DE CO <sub>2</sub> )					
		1.5h	3h	4.5h	6h	7.5h	21h
BG-1	1					4,13	4,53
	2	0,68	1,60	2,52	3,46	4,13	4,69
	3	0,51	1,38	2,43	3,39	4,06	4,73
	4	0,43	1,31	2,26	3,26	4,05	4,73
	5	0,58	1,58	2,77	3,57	4,22	4,75
	Média	0,55	1,47	2,50	3,42	4,12	4,69
BG-1 + 025	1					4,25	4,56
	2	0,75	1,77	2,83	3,85	4,31	4,68
	3	0,52	1,49	2,64	3,67	4,19	4,68
	4	0,52	1,55	2,56	3,64	4,26	4,70
	5	0,59	1,72	2,95	3,78	4,25	4,69
	Média	0,59	1,63	2,75	3,73	4,25	4,66
BG-1 + 230	1					4,28	4,57
	2	0,68	1,66	2,58	3,58	4,12	4,63
	3	0,48	1,43	2,49	3,47	4,12	4,68
	4	0,49	1,49	2,37	3,45	4,18	4,74
	5	0,57	1,73	2,81	3,65	4,22	4,67
	Média	0,55	1,58	2,56	3,54	4,18	4,66
BG-1 + 432	1					4,10	4,57
	2	0,64	1,58	2,44	3,46	4,12	4,73
	3	0,42	1,30	2,25	3,27	3,99	4,78
	4	0,45	1,42	2,20	3,25	4,01	4,79
	5	0,62	1,78	2,78	3,59	4,21	4,82
	Média	0,53	1,52	2,41	3,39	4,09	4,74

## Levedura PE-2

Tabela 27 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre o rendimento fermentativo (%), crescimento do fermento (g) e pH no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura PE-2

Tratamento	RENDIMENTO FERMENTATIVO (%)					MÉDIA	PESO DE FERMENTO (g)					pH					
	R1	R2	R3	R4	R5	GERAL	PI	P1	P2	P3	P4	P5	pH1	pH2	pH3	pH4	pH5
PE-2	80,7	83,1	82,5	81,9	83,0		7,58	8,09	8,16	8,22	8,43	8,66	5,03	5,05	5,11	5,14	5,1
	81,0	82,5	82,4	82,5	82,8		7,65	7,49	7,50	7,34	7,24	7,26	5,03	5,07	5,1	5,15	5,08
	80,8	84,9	83,7	84,2	85,0		7,68	8,36	8,21	8,26	7,98	7,77	5,02	5,12	5,15	5,16	5,12
Média	80,8	83,5	82,9	82,9	83,6	82,74	7,64	7,98	7,96	7,94	7,88	7,90	5,03	5,08	5,12	5,15	5,10
PE-2 + 025	79,9	81,6	81,9	81,2	80,9		7,70	8,47	8,48	8,31	8,43	8,54	4,74	4,65	4,76	4,75	4,76
	80,9	83,4	82,4	83,3	83,3		7,63	8,56	8,55	8,17	7,99	7,78	4,73	4,64	4,68	4,67	4,60
	78,5	83,3	81,9	82,6	83,2		7,73	8,70	8,39	8,23	8,14	7,87	4,73	4,63	4,65	4,67	4,61
Média	79,8	82,8	82,1	82,4	82,5	81,90	7,69	8,58	8,47	8,24	8,19	8,06	4,73	4,64	4,70	4,70	4,66
PE-2 + 230	79,7	79,6	78,6	78,5	78,0		7,68	8,21	8,11	8,04	7,83	7,65	4,81	4,75	4,7	4,67	4,56
	82,6	78,1	77,1	76,0	75,5		7,66	6,94	6,84	6,75	6,76	6,88	4,81	4,59	4,46	4,48	4,41
	79,7	78,6	80,2	79,1	78,7		7,70	8,51	8,57	8,46	8,28	8,26	4,78	4,64	4,74	4,71	4,61
Média	80,7	78,7	78,6	77,9	77,4	78,66	7,68	7,89	7,84	7,75	7,62	7,60	4,80	4,66	4,63	4,62	4,49
PE-2 + 432	81,7	80,2	79,9	78,9	78,9		7,63	8,14	8,22	7,93	7,51	7,03	4,85	4,73	4,65	4,62	4,49
	81,7	80,0	79,6	78,1	77,8		7,69	8,32	8,27	7,68	7,23	6,79	4,84	4,72	4,6	4,54	4,44
	79,3	80,2	79,3	78,4	78,0		7,69	8,57	8,49	8,06	7,73	7,50	4,84	4,76	4,67	4,63	4,49
Média	80,9	80,1	79,6	78,5	78,2	79,47	7,67	8,34	8,33	7,89	7,49	7,11	4,84	4,74	4,64	4,60	4,47

Tabela 28 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a viabilidade da levedura (%), taxa de brotamento (%) e os teores de trealose (%) no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura PE-2

Tratamento	VIABILIDADE (%)					BROTAMENTO (%)					TREALOSE (%)	
	V1	V2	V3	V4	V5	BR1	BR2	BR3	BR4	BR5	INICIAL	FINAL
PE-2	99	99	99	93	92	27	19	11	12	15	6,20	9,81
	99	98	98	93	92	18	22	13	18	19	6,20	9,37
	99	98	97	91	91	14	12	11	13	10	6,20	8,70
Média	99	98	98	92	92	20	18	12	14	15	6,20	9,29
PE-2 + 025	100	99	99	94	94	23	21	16	16	17	6,61	8,57
	99	98	97	94	94	16	18	17	12	13	6,61	8,08
	99	98	96	94	92	24	19	15	14	12	6,61	8,01
	Média	99	98	97	94	93	21	20	16	14	14	6,61
PE-2 + 230	99	98	98	97	96	15	38	14	19	15	5,68	8,20
	99	98	91	97	96	17	47	21	8	17	5,68	5,56
	99	97	84	98	95	22	31	17	11	20	5,68	8,39
	Média	99	98	91	97	96	18	39	18	13	18	5,68
PE-2 + 432	99	98	96	96	94	20	32	23	22	29	6,31	7,97
	98	98	89	88	93	16	20	23	34	19	6,31	7,90
	98	98	95	96	92	19	24	31	11	28	6,31	7,99
	Média	98	98	94	93	93	18	25	25	23	25	6,31

Tabela 29 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a contaminação bacteriana observada por contagem ao microscópio ótico ( $10^7$  células.mL<sup>-1</sup>), pelo método do Microplaqueamento em Gotas ( $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>) e sobre a viabilidade bacteriana % no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura PE-2

Tratamento	BACTÉRIAS ( $10^7$ células.mL <sup>-1</sup> )					BACTÉRIAS ( $10^7$ UFC.mL <sup>-1</sup> )					VIABILIDADE BACTERIANA (%)				
	BC1	BC2	BC3	BC4	BC5	BC1	BC2	BC3	BC4	BC5	VB1	VB2	VB3	VB4	VB5
PE-2	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,001	0,001	0,001	0,005	0,139	0	0	0	0	0
	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,001	0,001	0,001	0,003	0,056	0	0	0	0	0
	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,001	0,001	0,001	0,002	0,085	0	0	0	0	0
Média	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,001	0,001	0,001	0,003	0,093	0	0	0	0	0
PE-2 + 025	2,73	8,19	4,09	2,50	1,82	19,00	21,00	15,00	23,00	19,70	15	22	12	4	5
	15,40	7,28	3,64	1,36	0,91	14,70	27,00	22,00	23,30	14,70	50	31	10	3	2
	9,78	3,19	5,23	2,04	1,59	19,00	28,70	23,00	22,30	28,70	41	12	13	3	4
Média	9,30	6,22	4,32	1,97	1,44	17,57	25,57	20,00	22,87	21,03	36	22	11	3	4
PE-2 + 230	1,82	21,20	54,80	88,40	73,50	43,00	67,70	88,30	102,0	112,0	6	60	80	78	87
	3,64	33,50	48,00	76,70	89,20	40,30	104,0	101,0	123,0	99,30	11	67	85	91	92
	23,40	25,40	36,60	45,70	76,90	41,40	79,30	76,30	100,0	123,0	82	78	88	82	94
Média	9,62	26,70	46,47	70,27	79,87	41,57	83,67	88,53	108,33	111,43	33	69	84	84	91
PE-2 + 432	2,24	22,10	47,30	2,50	106,0	36,30	52,00	76,30	93,70	109,0	8	64	86	2	93
	2,27	20,50	58,00	63,70	127,0	26,70	40,70	118,0	102,0	128,0	8	71	83	83	96
	20,00	26,90	53,70	56,90	71,0	33,30	48,00	40,00	93,30	116,0	68	77	86	83	94
Média	8,17	23,17	53,00	41,03	101,33	32,10	46,90	78,10	96,33	117,67	28	71	85	56	94

Tabela 30 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre os teores residuais de açúcares (%), expressos como ART e sacarose no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura PE-2

Tratamento	ART RESIDUAL (%)					SACAROSE RESIDUAL(%)				
	ART1	ART2	ART3	ART4	ART5	SAC1	SAC2	SAC3	SAC4	SAC5
PE-2	0,089	0,053	0,053	0,051	0,048	0,007	0,014	0,010	0,012	0,006
	0,088	0,055	0,048	0,056	0,048	0,007	0,015	0,007	0,015	0,007
	0,089	0,055	0,048	0,057	0,046	0,008	0,014	0,007	0,019	0,011
Média	0,089	0,054	0,050	0,055	0,047	0,007	0,014	0,008	0,015	0,008
PE-2 + 025	0,057	0,061	0,048	0,048	0,043	0,015	0,025	0,014	0,013	0,010
	0,054	0,058	0,047	0,069	0,043	0,014	0,021	0,014	0,026	0,011
	0,053	0,058	0,044	0,048	0,041	0,015	0,022	0,012	0,014	0,010
Média	0,055	0,059	0,046	0,055	0,042	0,015	0,022	0,013	0,017	0,010
PE-2 + 230	0,119	0,059	0,047	0,053	0,059	0,020	0,020	0,010	0,013	0,019
	0,095	0,068	0,055	0,057	0,054	0,020	0,031	0,018	0,017	0,015
	0,114	0,055	0,047	0,049	0,048	0,020	0,017	0,010	0,010	0,011
Média	0,109	0,061	0,050	0,053	0,053	0,020	0,022	0,013	0,013	0,015
PE-2 + 432	0,117	0,064	0,075	0,059	0,062	0,026	0,025	0,026	0,021	0,017
	0,117	0,059	0,078	0,071	0,058	0,026	0,024	0,027	0,021	0,016
	0,124	0,057	0,079	0,064	0,061	0,030	0,021	0,029	0,018	0,017
Média	0,119	0,060	0,077	0,065	0,060	0,028	0,023	0,027	0,020	0,017



Tabela 31 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre os teores residuais de açúcares (%), expressos como glicose e frutose no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura PE-2

Tratamento	GLICOSE RESIDUAL (%)					FRUTOSE RESIDUAL (%)				
	G1	G2	G3	G4	G5	F1	F2	F3	F4	F5
PE-2	0,013	0,009	0,010	0,010	0,010	0,069	0,029	0,032	0,027	0,031
	0,013	0,010	0,009	0,010	0,010	0,067	0,030	0,031	0,031	0,031
	0,013	0,010	0,010	0,011	0,010	0,068	0,030	0,031	0,026	0,024
Média	0,013	0,010	0,010	0,010	0,010	0,068	0,030	0,031	0,028	0,029
PE-2 + 025	0,008	0,006	0,006	0,007	0,007	0,032	0,029	0,027	0,028	0,026
	0,008	0,006	0,006	0,008	0,007	0,031	0,030	0,026	0,034	0,024
	0,008	0,006	0,006	0,007	0,007	0,030	0,029	0,025	0,026	0,024
Média	0,008	0,006	0,006	0,007	0,007	0,031	0,030	0,026	0,029	0,025
PE-2 + 230	0,011	0,008	0,006	0,007	0,008	0,087	0,030	0,030	0,033	0,031
	0,011	0,007	0,007	0,007	0,008	0,063	0,029	0,030	0,032	0,030
	0,011	0,007	0,006	0,007	0,007	0,082	0,030	0,030	0,032	0,029
Média	0,011	0,007	0,006	0,007	0,008	0,077	0,030	0,030	0,032	0,030
PE-2 + 432	0,011	0,007	0,016	0,004	0,006	0,078	0,031	0,032	0,033	0,039
	0,011	0,003	0,018	0,015	0,006	0,078	0,031	0,032	0,033	0,035
	0,011	0,003	0,018	0,012	0,006	0,080	0,033	0,031	0,034	0,036
Média	0,011	0,004	0,017	0,010	0,006	0,079	0,031	0,031	0,033	0,037

Tabela 32 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a formação de succinato (mM), lactato (mM) e acetato (mM) no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura PE-2

Tratamento	SUCCINATO (mM)					LACTATO (mM)					ACETATO (mM)				
	S1	S2	S3	S4	S5	L1	L2	L3	L4	L5	A1	A2	A3	A4	A5
PE-2	3,03	3,50	3,01	3,29	3,77	3,33	3,06	2,63	2,85	3,18	6,89	3,84	3,60	4,51	4,36
	2,58	2,65	2,75	2,69	2,64	2,92	2,88	2,46	2,54	2,26	6,69	7,39	6,05	6,24	8,01
	2,73	2,48	2,46	2,27	2,52	3,32	2,50	2,47	2,41	2,19	6,26	6,06	5,34	6,29	7,03
Média	2,78	2,87	2,74	2,75	2,98	3,19	2,81	2,52	2,60	2,54	6,61	5,76	5,00	5,68	6,47
PE-2 + 025	2,71	2,18	2,37	2,83	3,17	39,56	45,32	39,85	37,59	37,09	14,53	13,86	10,89	7,80	8,61
	2,82	2,20	1,84	1,96	2,09	40,53	47,74	39,93	45,44	46,91	14,56	15,44	11,98	12,52	12,35
	2,70	2,18	2,08	1,98	2,13	38,07	48,03	44,79	46,06	45,85	12,51	13,71	12,09	11,83	12,34
Média	2,74	2,19	2,09	2,25	2,47	39,39	47,03	41,53	43,03	43,28	13,87	14,34	11,65	10,72	11,10
PE-2 + 230	2,66	2,41	2,07	2,24	2,02	39,34	34,82	34,49	39,05	41,27	24,61	22,55	23,00	26,52	30,42
	2,52	1,65	2,21	2,23	2,21	44,64	47,51	47,75	50,44	51,68	27,06	32,93	35,18	37,73	40,04
	2,37	1,80	2,14	1,73	2,18	42,36	34,81	34,23	36,87	39,01	24,68	22,04	22,30	24,80	26,70
Média	2,52	1,96	2,14	2,07	2,14	42,12	39,04	38,82	42,12	43,98	25,45	25,84	26,82	29,68	32,39
PE-2 + 432	2,88	2,81	2,68	2,87	2,99	33,20	37,77	38,00	41,80	45,73	21,31	22,84	23,49	27,85	31,04
	2,94	2,64	2,80	2,80	2,95	36,13	36,57	39,55	47,07	49,84	21,97	23,37	25,16	32,28	36,01
	2,84	2,55	3,07	2,93	2,77	33,61	35,25	37,84	42,11	45,94	20,60	20,75	22,54	26,33	30,30
Média	2,89	2,67	2,85	2,87	2,90	34,31	36,53	38,46	43,66	47,17	21,29	22,32	23,73	28,82	32,45

Tabela 33 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a formação de glicerol (mM) e manitol (mM) no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura PE-2

Tratamento	GLICEROL (mM)					MANITOL (mM)				
	G1	G2	G3	G4	G5	M1	M2	M3	M4	M5
PE-2	0,457	0,368	0,347	0,341	0,342	0,006	0,008	0,006	0,006	0,006
	0,448	0,325	0,334	0,330	0,304	0,006	0,008	0,005	0,005	0,005
	0,447	0,329	0,328	0,303	0,325	0,006	0,007	0,005	0,005	0,005
Média	0,451	0,341	0,336	0,325	0,324	0,006	0,008	0,005	0,005	0,005
PE-2 + 025	0,410	0,257	0,288	0,356	0,338	0,001	0,001	0,001	0,001	0,015
	0,398	0,252	0,273	0,294	0,303	0,001	0,001	0,005	0,005	0,003
	0,406	0,265	0,273	0,296	0,287	0,001	0,003	0,004	0,004	0,002
Média	0,405	0,258	0,278	0,315	0,309	0,001	0,002	0,003	0,003	0,007
PE-2 + 230	0,434	0,403	0,451	0,445	0,515	0,032	0,032	0,099	0,099	0,156
	0,445	0,522	0,550	0,572	0,597	0,028	0,139	0,247	0,247	0,267
	0,436	0,385	0,451	0,457	0,540	0,026	0,032	0,086	0,086	0,104
Média	0,438	0,436	0,484	0,491	0,551	0,029	0,068	0,144	0,144	0,176
PE-2 + 432	0,416	0,411	0,490	0,456	0,504	0,033	0,041	0,103	0,103	0,169
	0,428	0,411	0,491	0,481	0,510	0,034	0,046	0,175	0,175	0,246
	0,432	0,390	0,456	0,468	0,553	0,033	0,034	0,093	0,093	0,138
Média	0,425	0,404	0,479	0,468	0,522	0,033	0,040	0,124	0,124	0,184

Tabela 34 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a velocidade de fermentação (g de CO<sub>2</sub>) no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura PE-2

Tratamento	Ciclo	VELOCIDADE DE FERMENTAÇÃO (g DE CO <sub>2</sub> )					
		1.5h	3h	4.5h	6h	7.5h	21h
PE-2	1	1,20		4,20	4,58	4,73	4,85
	2	0,90	2,35	3,85	4,56	4,81	5,19
	3	0,93	2,46	3,90	4,65	4,82	5,22
	4	1,09	2,25	3,70	4,52	4,77	4,85
	5	1,02	2,48	3,72	4,54	4,79	5,20
	Média	1,03	2,38	3,87	4,57	4,78	5,06
PE-2 + 025	1	1,38		4,30	4,66	4,81	5,06
	2	0,97	2,52	4,02	4,64	4,82	5,14
	3	0,93	2,79	4,20	4,98	5,14	5,56
	4	1,22	2,48	3,93	4,65	4,86	5,17
	5	1,04	2,54	3,75	4,53	4,80	5,17
	Média	1,11	2,59	4,04	4,69	4,89	5,22
PE-2 + 230	1	1,19		4,19	4,63	4,80	5,12
	2	0,71	1,95	3,19	4,08	4,46	5,00
	3	0,73	2,01	3,32	4,24	4,64	5,16
	4	0,92	2,01	3,26	4,17	4,52	5,03
	5	0,83	2,22	3,33	4,18	4,51	4,95
	Média	0,88	2,05	3,46	4,26	4,58	5,05
PE-2 + 432	1	1,13		4,12	4,62	4,81	5,13
	2	0,96	2,38	3,66	4,40	4,63	5,00
	3	1,16	2,50	3,69	4,46	4,65	5,03
	4	1,09	2,20	3,43	4,22	4,56	5,01
	5	0,85	2,27	3,28	4,09	4,39	4,97
	Média	1,04	2,34	3,64	4,36	4,61	5,03

## Levedura Fleischmann

Tabela 35 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre o rendimento fermentativo (%), crescimento do fermento (g) e pH no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura Fleischmann

Tratamento	RENDIMENTO FERMENTATIVO (%)					MÉDIA	PESO DE FERMENTO (g)					pH					
	R1	R2	R3	R4	R5	GERAL	PI	P1	P2	P3	P4	P5	pH1	pH2	pH3	pH4	pH5
FL	83,5	87,1	86,8	87,7	87,9		7,12	8,10	8,36	8,77	8,72	8,95	4,70	4,85	4,86	4,86	4,84
	84,0	86,8	87,7	89,0	88,0		7,17	8,29	8,68	9,01	8,73	9,24	4,69	4,83	4,88	4,86	4,83
	85,3	87,7	88,0	88,4	87,9		7,14	7,93	8,25	8,60	8,70	9,15	4,73	4,83	4,87	4,85	4,81
Média	84,3	87,2	87,5	88,4	87,9	87,05	7,14	8,11	8,43	8,79	8,72	9,11	3,78	4,84	4,87	4,86	4,83
FL + 025	85,4	85,6	86,4	87,6	87,5		7,14	8,28	9,24	9,3	8,4	8,68	4,51	4,48	4,30	4,16	4,13
	84,2	86,1	87,0	87,6	86,5		7,13	8,88	9,83	9,69	9,09	8,83	4,49	4,54	4,36	4,17	4,09
	84,2	86,0	87,1	87,3	87,0		7,09	8,41	9,01	9,30	8,74	9,04	4,48	4,47	4,34	4,17	4,15
Média	84,6	85,9	86,8	87,5	87,0	86,36	7,12	8,52	9,36	9,43	8,74	8,85	4,49	4,50	4,33	4,17	4,12
FL + 230	84,5	85,9	86,0	85,6	85,0		7,18	8,34	9,23	9,29	9,98	8,91	4,73	4,76	4,66	4,56	4,49
	84,8	85,7	86,2	85,9	85,5		7,18	8,24	9,02	9,12	9,01	8,97	4,74	4,74	4,64	4,56	4,47
	83,6	86,0	85,4	86,3	84,7		7,16	8,32	9,04	9,24	9,36	9,80	4,73	4,76	4,64	4,52	4,47
Média	84,3	85,9	85,9	85,9	85,1	85,41	7,17	8,30	9,10	9,22	9,45	9,23	4,73	4,75	4,65	4,55	4,48
FL + 432	83,5	83,7	83,3	80,2	75,2		7,23	7,86	8,35	8,38	8,16	7,86	4,77	4,67	4,45	4,25	4,08
	83,8	85,2	85,0	82,8	77,9		7,29	8,41	8,92	8,58	8,35	8,21	4,74	4,74	4,54	4,34	4,15
	83,4	85,2	85,8	82,6	79,1		7,2	8,26	8,83	8,58	8,32	8,31	4,73	4,72	4,56	4,35	4,18
Média	83,6	84,7	84,7	81,9	77,4	82,46	7,24	8,18	8,70	8,51	8,28	8,13	4,75	4,71	4,52	4,31	4,14

Tabela 36 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a viabilidade da levedura (%), taxa de brotamento (%) e os teores de trealose (%) no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura Fleischmann

Tratamento	VIABILIDADE (%)					BROTAMENTO (%)					TREALOSE (%)	
	V1	V2	V3	V4	V5	BR1	BR2	BR3	BR4	BR5	INICIAL	FINAL
FL	94	72	70	67	55	23	21	14	17	29	2,58	5,36
	90	70	71	67	62	21	27	22	20	23	2,58	5,28
	83	65	67	66	54	20	17	14	15	23	2,58	4,70
Média	89	69	69	67	57	21	21	17	17	25	2,58	5,11
FL + 025	87	73	68	62	31	18	27	16	22	40	2,58	3,11
	86	80	67	56	37	25	24	18	11	34	2,58	3,64
	84	78	65	58	38	19	13	20	24	26	2,58	4,41
Média	85	77	67	58	36	21	21	18	19	33	2,58	3,72
FL + 230	90	74	65	52	40	28	17	11	21	26	2,58	4,08
	86	77	61	55	44	21	17	14	14	19	2,58	4,37
	87	76	63	66	52	26	19	17	13	47	2,58	4,58
Média	88	76	63	58	45	25	17	14	16	31	2,58	4,34
FL + 432	87	78	70	56	40	18	11	12	21	20	2,58	1,54
	87	77	60	58	45	22	12	10	21	16	2,58	2,41
	84	74	71	57	38	22	12	9	17	21	2,58	2,73
Média	86	76	67	57	41	21	12	11	20	19	2,58	2,23

Tabela 37 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a contaminação bacteriana observada por contagem ao microscópio ótico ( $10^7$  células.mL<sup>-1</sup>), pelo método do Microplaqueamento em Gotas ( $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>) e sobre a viabilidade bacteriana % no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura Fleischmann

Tratamento	BACTÉRIAS ( $10^7$ células.mL <sup>-1</sup> )					BACTÉRIAS ( $10^7$ UFC.mL <sup>-1</sup> )					VIABILIDADE BACTERIANA (%)				
	BC1	BC2	BC3	BC4	BC5	BC1	BC2	BC3	BC4	BC5	VB1	VB2	VB3	VB4	VB5
FL	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0	0	0	0	0
	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0	0	0	0	0
	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0	0	0	0	0
Média	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0	0	0	0	0
FL + 025	9,10	10,90	14,10	12,10	11,10	22,00	23,30	32,30	27,30	28,30	55	79	74	49	34
	6,83	13,20	15,20	14,30	13,20	20,00	29,30	33,50	36,30	38,00	50	60	77	61	44
	8,65	12,30	14,60	9,33	16,80	28,70	20,30	32,30	26,30	43,00	72	73	77	47	44
Média	8,19	12,13	14,63	11,91	13,70	23,57	24,30	32,70	29,97	36,43	59	70	76	52	41
FL + 230	10,90	19,80	25,90	27,30	32,50	34,30	45,30	67,00	84,00	64,70	77	85	91	89	89
	17,30	25,50	22,50	35,70	32,80	39,00	54,30	51,30	59,70	58,70	90	89	85	91	89
	18,00	20,50	27,00	29,40	36,60	33,70	38,30	39,30	60,70	54,00	90	90	91	85	89
Média	15,40	21,93	25,13	30,80	33,97	35,67	45,97	52,53	68,13	59,13	86	88	89	88	89
FL + 432	20,50	21,80	40,30	35,30	62,10	11,00	11,70	12,00	14,30	5,00	86	90	90	91	90
	15,70	20,50	39,40	35,50	57,10	9,67	14,30	14,30	11,30	16,30	87	88	92	84	89
	16,60	20,70	30,70	40,10	59,60	13,70	12,70	8,33	15,00	15,00	86	84	89	86	89
Média	17,60	21,00	36,80	36,97	59,60	11,46	12,90	11,54	13,53	12,10	86	87	90	87	89

Tabela 38 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre os teores residuais de açúcares (%), expressos como ART e sacarose no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura Fleischmann

Tratamento	ART RESIDUAL (%)					SACAROSE RESIDUAL(%)				
	ART1	ART2	ART3	ART4	ART5	SAC1	SAC2	SAC3	SAC4	SAC5
FL	0,033	0,041	0,035	0,076	0,050	0,010	0,038	0,009	0,021	0,019
	0,016	0,071	0,053	0,034	0,047	0,001	0,030	0,048	0,022	0,020
	0,012	0,024	0,040	0,055	0,073	0,001	0,006	0,016	0,028	0,024
Média	0,021	0,045	0,043	0,055	0,057	0,004	0,024	0,024	0,024	0,021
FL + 025	0,042	0,028	0,048	0,053	0,041	0,026	0,025	0,032	0,001	0,038
	0,012	0,064	0,029	0,103	0,035	0,010	0,038	0,026	0,051	0,032
	0,052	0,049	0,069	0,027	0,051	0,020	0,045	0,044	0,009	0,015
Média	0,035	0,047	0,049	0,061	0,042	0,018	0,036	0,034	0,021	0,028
FL + 230	0,027	0,031	0,049	0,071	0,601	0,013	0,027	0,036	0,060	0,025
	0,025	0,022	0,063	0,048	0,021	0,006	0,010	0,047	0,044	0,003
	0,036	0,035	0,041	0,037	0,037	0,025	0,031	0,022	0,033	0,034
Média	0,029	0,029	0,051	0,052	0,220	0,014	0,023	0,035	0,046	0,020
FL + 432	0,057	0,040	0,028	0,013	0,219	0,052	0,037	0,025	0,011	0,040
	0,042	0,003	0,083	0,103	0,188	0,027	0,001	0,019	0,022	0,036
	0,040	0,061	0,014	0,145	0,143	0,021	0,023	0,011	0,073	0,021
Média	0,046	0,035	0,042	0,087	0,183	0,033	0,020	0,018	0,036	0,032



Tabela 39 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre os teores residuais de açúcares (%), expressos como glicose e frutose no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura Fleischmann

Tratamento	GLICOSE RESIDUAL (%)					FRUTOSE RESIDUAL (%)				
	G1	G2	G3	G4	G5	F1	F2	F3	F4	F5
FL	0,022	0,001	0,025	0,032	0,020	0,001	0,001	0,001	0,022	0,010
	0,015	0,016	0,001	0,009	0,013	0,001	0,024	0,001	0,001	0,013
	0,010	0,017	0,023	0,024	0,031	0,001	0,001	0,001	0,001	0,017
Média	0,016	0,011	0,016	0,022	0,021	0,001	0,008	0,001	0,008	0,013
FL + 025	0,014	0,001	0,013	0,024	0,001	0,001	0,001	0,001	0,028	0,001
	0,001	0,001	0,001	0,023	0,001	0,001	0,023	0,001	0,026	0,001
	0,012	0,001	0,022	0,001	0,019	0,019	0,001	0,001	0,016	0,017
Média	0,009	0,001	0,012	0,016	0,007	0,007	0,008	0,001	0,023	0,006
FL + 230	0,013	0,001	0,009	0,007	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
	0,018	0,011	0,013	0,001	0,017	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
	0,009	0,001	0,017	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Média	0,013	0,004	0,013	0,003	0,006	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
FL + 432	0,001	0,001	0,001	0,001	0,036	0,001	0,001	0,001	0,001	0,141
	0,001	0,001	0,031	0,001	0,020	0,012	0,001	0,032	0,078	0,131
	0,018	0,021	0,001	0,007	0,016	0,001	0,016	0,001	0,060	0,106
Média	0,007	0,008	0,011	0,003	0,024	0,005	0,006	0,011	0,046	0,126

Tabela 40 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a formação de succinato (mM), lactato (mM) e acetado (mM) no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura Fleischmann

Tratamento	SUCCINATO (mM)					LACTATO (mM)					ACETATO (mM)				
	S1	S2	S3	S4	S5	L1	L2	L3	L4	L5	A1	A2	A3	A4	A5
FL	5,11	4,80	4,82	4,96	4,91	6,79	5,95	6,41	6,51	6,11	11,01	10,40	10,05	9,81	10,18
	5,28	4,59	4,97	5,08	5,06	6,97	5,74	6,68	6,48	6,46	11,66	10,72	10,80	10,64	10,15
	5,09	4,86	4,72	4,81	4,62	6,42	5,76	6,28	6,15	6,26	11,68	10,40	11,28	11,10	10,56
Média	5,16	4,75	4,83	4,95	4,86	6,72	5,82	6,46	6,38	6,28	11,45	10,51	10,71	10,51	10,30
FL + 025	5,14	3,94	3,80	4,14	3,78	42,61	43,24	60,01	73,18	69,63	16,97	14,43	14,56	14,09	13,18
	4,81	4,32	3,94	4,20	3,96	41,21	39,02	57,23	75,64	74,73	16,31	14,04	14,16	14,18	12,99
	4,55	3,86	3,66	3,83	3,59	44,90	44,78	57,68	71,83	67,26	17,30	14,55	14,31	14,54	13,57
Média	4,83	4,04	3,80	4,06	3,78	42,91	42,35	58,31	73,55	70,54	16,86	14,34	14,34	14,27	13,25
FL + 230	4,86	4,96	4,76	4,80	4,87	30,02	26,48	29,52	33,42	34,76	19,43	17,12	17,58	20,87	23,39
	4,40	4,74	5,07	5,15	4,59	29,08	26,83	30,88	35,08	33,90	19,52	17,56	18,92	22,73	23,30
	4,16	4,76	4,84	4,71	5,23	29,24	26,16	30,31	35,02	34,00	19,37	17,09	18,63	22,41	21,12
Média	4,47	4,82	4,89	4,88	4,90	29,45	26,49	30,23	34,51	34,22	19,44	17,26	18,37	22,00	22,60
FL + 432	3,70	4,55	3,95	3,28	2,81	29,26	30,25	41,95	54,86	69,93	19,55	19,74	26,72	37,50	51,45
	4,64	4,54	4,50	3,53	2,96	29,52	28,32	38,49	49,02	61,87	18,84	17,80	22,90	31,93	43,92
	4,60	4,59	4,32	3,58	3,00	30,01	27,43	36,70	48,46	59,68	18,66	17,31	22,93	30,74	42,21
Média	4,31	4,56	4,26	3,46	2,92	29,60	28,67	39,05	50,78	63,83	19,02	18,28	24,18	33,39	45,86

Tabela 41 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a formação de glicerol (mM) e manitol (mM) no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura Fleischmann

Tratamento	GLICEROL (mM)					MANITOL (mM)				
	G1	G2	G3	G4	G5	M1	M2	M3	M4	M5
FL	0,600	0,492	0,482	0,488	0,518	0,067	0,072	0,063	0,069	0,068
	0,607	0,478	0,575	0,489	0,466	0,066	0,064	0,085	0,079	0,068
	0,595	0,499	0,481	0,489	0,504	0,062	0,061	0,067	0,076	0,068
Média	0,601	0,490	0,513	0,489	0,496	0,065	0,066	0,072	0,074	0,068
FL + 025	0,561	0,448	0,442	0,431	0,416	0,051	0,001	0,001	0,001	0,007
	0,543	0,447	0,435	0,409	0,448	0,048	0,001	0,001	0,001	0,001
	0,557	0,453	0,437	0,421	0,475	0,046	0,011	0,001	0,001	0,001
Média	0,554	0,450	0,438	0,420	0,446	0,048	0,004	0,001	0,001	0,003
FL + 230	0,591	0,537	0,600	0,598	0,659	0,086	0,089	0,097	0,136	0,181
	0,570	0,544	0,589	0,549	0,650	0,079	0,092	0,102	0,142	0,171
	0,611	0,543	0,591	0,607	0,676	0,083	0,076	0,101	0,130	0,144
Média	0,590	0,541	0,593	0,585	0,662	0,083	0,085	0,100	0,136	0,165
FL + 432	0,524	0,549	0,588	0,576	0,676	0,109	0,141	0,248	0,443	0,812
	0,594	0,515	0,596	0,591	0,625	0,104	0,116	0,205	0,365	0,594
	0,579	0,533	0,572	0,524	0,678	0,102	0,117	0,178	0,305	0,632
Média	0,566	0,533	0,585	0,564	0,660	0,105	0,125	0,211	0,371	0,679

Tabela 42 - Estudo comparativo entre os tratamentos sem bactéria, com bactéria homofermentativa (025) e com bactéria heterofermentativa (230) sobre a velocidade de fermentação (g de CO<sub>2</sub>) no transcorrer de 5 ciclos fermentativos empregando-se a levedura Fleischman

Tratamento	Ciclo	VELOCIDADE DE FERMENTAÇÃO (g DE CO <sub>2</sub> )					
		1.5h	3h	4.5h	6h	7.5h	21h
FL	1					4,13	4,53
	2	0,68	1,60	2,52	3,46	4,13	4,69
	3	0,51	1,38	2,43	3,39	4,06	4,73
	4	0,43	1,31	2,26	3,26	4,05	4,73
	5	0,58	1,58	2,77	3,57	4,22	4,75
	Média	0,55	1,47	2,50	3,42	4,12	4,69
FL + 025	1					4,25	4,56
	2	0,75	1,77	2,83	3,85	4,31	4,68
	3	0,52	1,49	2,64	3,67	4,19	4,68
	4	0,52	1,55	2,56	3,64	4,26	4,70
	5	0,59	1,72	2,95	3,78	4,25	4,69
	Média	0,59	1,63	2,75	3,73	4,25	4,66
FL + 230	1					4,28	4,57
	2	0,68	1,66	2,58	3,58	4,12	4,63
	3	0,48	1,43	2,49	3,47	4,12	4,68
	4	0,49	1,49	2,37	3,45	4,18	4,74
	5	0,57	1,73	2,81	3,65	4,22	4,67
	Média	0,55	1,58	2,56	3,54	4,18	4,66
FL + 432	1					4,10	4,57
	2	0,64	1,58	2,44	3,46	4,12	4,73
	3	0,42	1,30	2,25	3,27	3,99	4,78
	4	0,45	1,42	2,20	3,25	4,01	4,79
	5	0,62	1,78	2,78	3,59	4,21	4,82
	Média	0,53	1,52	2,41	3,39	4,09	4,74