

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

**Otimização no aproveitamento de biomassas para a produção de etanol:
fermentação de mosto misto obtido a partir de milho e cana de açúcar**

Ana Paula Maria da Silva

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2023**

Ana Paula Maria da Silva
Engenheira Agrônoma

**Otimização no aproveitamento de biomassas para a produção de etanol:
fermentação de mosto misto obtido a partir de milho e cana de açúcar**
versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **ANTONIO SAMPAIO BAPTISTA**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2023

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

Silva, Ana Paula Maria da

Otimização no aproveitamento de biomassas para a produção de etanol: fermentação de mosto misto obtido a partir de milho e cana de açúcar / Ana Paula Maria da Silva -- versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2023.
61 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Mosto misto 2. Hidrolisado de milho 3. Cana-de-açúcar 4. *Lactobacillus* 5. Leveduras 6. Feixe de elétrons I. Título

Aos meus amados e cuidadosos pais

Minha mãe Maria Helena da Silva,

Adeilton Vitor da Silva,

E a minha zelosa irmã

Anne Rafaele da Silva,

E ao meu amado esposo Gustavo Theodoro Peixoto,

A todo o amor e apoio.

DEDICO!

A ti oh Deus,

Agradeço por todos os tropeços que sofri para chegar até aqui,

E sempre me amparar nos momentos difíceis,

E mostrar o caminho quando não pude ver.

(Autoria própria)

AGRADECIMENTOS

- A Deus por sempre ter me iluminado e me dado serenidade e sabedoria em todos os momentos da minha vida.
- Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ-USP) pela oportunidade em ingressar na pós-graduação.
- À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.
- À SINOCHEN Petróleo Brasil Ltda e a ANP pelo fomento da pesquisa.
- A Fernanda C. Firmino pela doação da levedura.
- Ao Antonio Sampaio Baptista, pela orientação, pela amizade, por sempre estar disposto a me ajudar e por todos os conselhos. Para mim, um exemplo e inspiração como pessoa e profissional.
- Aos colegas do Laboratório de Tecnologia Sucroenergética e Bioenergia, pelos momentos de descontração e risadas, e por toda ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.
- A Liandra Spinello e Victor Domingues da Cunha Peixoto, por terem me ajudado em diversas etapas experimentais, sem vocês tudo seria bem mais difícil.
- A Layna Amorim pelo auxílio nas correções e amizade.
- Aos meus pais Del e Cema pelo amor, confiança e pela educação que me proporcionaram. Agradeço por serem exemplos de dedicação e perseverança.
- Ao Prof. Dr. Gildemberg Amorim Leal Junior (Jupará), pelos ensinamentos, conselhos, durante todos os anos de graduação.
- A Profa. Dra. Simone Possedente de Lira, que como coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, sempre me deu o apoio necessário e conselhos amigáveis.
- Aos amigos, Guilherme Nacata, Arthur Belarmino, Gustavo Valani, Jacson Ferreira, Laecio Sampaio, Priscila Barbosa, Ligia Broglio, Guilherme Torezan, Raissa Dantas, Thiago Viana pela amizade, pelos ótimos momentos compartilhados, pelo apoio em momentos difíceis, pelo incentivo, por todas as lembranças maravilhosas que trago comigo, por sempre acreditarem na minha capacidade e estimularem a coragem em mim para enfrentar as minhas dificuldades. Amizade para a vida toda!

- À minha tia Cícera, a minha prima Marceliana e ao meu primo Marcelo pelo apoio, preocupação, amor e pelas orações.
- À todas as pessoas que Piracicaba me proporcionou conhecer e amar, cada uma com sua particularidade.
- Por fim, agradeço a todos que colaboraram de forma direta ou indiretamente para este trabalho e para minha formação e que eventualmente eu tenha esquecido de mencioná-los, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
Referências	13
2 EFICIÊNCIA FERMENTATIVA DE CEPAS INDUSTRIAIS DE LEVEDURAS EM MOSTO MISTO.....	15
Resumo	15
2.1 Introdução	15
2.2 Materiais e Métodos.....	17
2.2.1 Microrganismos	17
2.2.2 Preparo do mosto misto constituído por hidrolisado de milho e caldo cana	17
2.2.3 Tratamento com irradiação ionizante	18
2.2.4 Design experimental	18
2.2.5 Determinação de ácidos orgânicos, carboidratos, glicerol e etanol por HPLC ..	19
2.2.6 Rendimento fermentativo	19
2.3 Resultados e Discussão	20
2.3.1 Influência da cepa de levedura sobre o consumo de carboidratos e açúcares residuais.....	20
2.3.2 Influência da cepa de levedura sobre o consumo de ácidos orgânicos.....	21
2.3.3 Influência da cepa de levedura sobre o consumo de glicerol	23
2.3.4 Influência da cepa de levedura sobre a produção de etanol	24
2.4 Conclusão.....	26
Referências.....	26
3 EFEITO DA CONTAMINAÇÃO POR <i>Lactobacillus</i> SOBRE PARÂMETROS DA FERMENTAÇÃO DE MOSTO MISTO	31
Resumo	31
3.1 Introdução	31
3.2 Materiais e Métodos.....	34
3.2.1 Microorganismos	34
3.2.2 Preparo do mosto misto constituído por hidrolisado de milho e caldo cana	34
3.2.3 Tratamento com irradiação ionizante	35

3.2.4	Design experimental	35
3.2.5	Determinação de compostos por HPLC.....	36
3.2.6	Rendimento fermentativo.....	36
3.3	Resultados e Discussão	36
3.3.1	Influência da contaminação bacteriana sobre o consumo de glicose e frutose...36	
3.3.2	Influência da contaminação bacteriana sobre os ácidos orgânicos	38
3.3.3	Efeito da contaminação bacteriana sobre a produção de glicerol	43
3.3.4	Efeito da contaminação bacteriana sobre o potencial de hidrogênio	45
3.3.5	Efeitos da contaminação de <i>Lactobacillus</i> na viabilidade celular	48
3.3.6	Efeitos da contaminação de lactobacillus na concentração final de etanol e sobre o rendimento	49
3.4	Conclusão	51
	Referências	51
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	61

RESUMO

Otimização no aproveitamento de biomassas para a produção de etanol: fermentação de mosto misto obtido a partir de milho e cana de açúcar

O Brasil desempenha um papel importante na produção de biocombustíveis globalmente, resultado de diversas ações e políticas públicas ao longo do tempo que visam aumentar sua participação na matriz energética. Entre essas iniciativas, destacam-se os mandatos de adição obrigatória de biocombustíveis (etanol e biodiesel) aos derivados de petróleo, os mecanismos de diferenciação tributária entre fontes renováveis e fósseis, as linhas de financiamento específicas e, mais recentemente, a implementação da Política Nacional dos Biocombustíveis (RenovaBio) e do Programa Combustível do Futuro. A busca por otimizações de processos que possam diminuir a dependência por combustíveis fósseis, é importante para alcançarmos tais metas ambientais, econômicas e sociais. Por essas razões, o propósito desta tese foi investigar o impacto do mosto combinado (milho e cana-de-açúcar) nos parâmetros de fermentação, tanto em relação à cepa de levedura quanto à contaminação por *Lactobacillus*. Para esclarecer esse objetivo, o primeiro capítulo teve a intenção de examinar a influência da cepa de levedura no mosto combinado. Como resultado, foi possível observar que a Cepa *Thermosacc* apresentou um desempenho superior à cepa Pedra-2 nas condições experimentais analisadas. Em contraste, o segundo capítulo buscou investigar o efeito da contaminação bacteriana nos parâmetros de fermentação no mosto combinado. Como resultado, foi constatado que a contaminação teve um impacto negativo no metabolismo das leveduras, resultando principalmente na redução da produção de etanol, no aumento do desvio de carboidratos para a produção de ácidos orgânicos, na diminuição do pH do meio de fermentação e na redução do rendimento da fermentação alcoólica, como também, diminui o consumo dos açúcares fermentáveis, resultando em quantidades significativas de açúcares residuais, além de afetar diretamente a formação de glicerol e ter um efeito negativo na viabilidade celular.

Palavras-chave: *Thermosacc*, Pedra-2, Hidrolisado de milho

ABSTRACT

Optimization in the use of biomass for ethanol production: fermentation of mixed must obtained from corn and sugar cane

Brazil plays an important role in global biofuel production, resulting from various actions and public policies over time aimed at increasing its share in the energy matrix. Among these initiatives, notable ones include mandatory blending mandates for biofuels (ethanol and biodiesel) with petroleum derivatives, differentiated tax mechanisms between renewable and fossil sources, specific financing lines, and more recently, the implementation of the National Biofuels Policy (RenovaBio) and the Fuel of the Future Program. The pursuit of process optimizations that can reduce dependence on fossil fuels is important for achieving these environmental, economic, and social goals. For these reasons, the purpose of this thesis was to investigate the impact of mixed wort (corn and sugarcane) on fermentation parameters, both in relation to yeast strains and contamination by *Lactobacillus*. To clarify this objective, the first chapter aimed to examine the influence of yeast strains on the mixed wort. As a result, it was possible to observe that the *Thermosacc* strain outperformed the Pedra-2 strain under the analyzed experimental conditions. In contrast, the second chapter sought to investigate the effect of bacterial contamination on fermentation parameters in the mixed wort. As a result, it was found that contamination had a negative impact on yeast metabolism, resulting primarily in reduced ethanol production, increased diversion of carbohydrates towards organic acid production, decreased fermentation medium pH, and reduced alcohol fermentation yield. It also decreases the consumption of fermentable sugars, resulting in significant amounts of residual sugars, as well as directly affecting glycerol formation and having a negative effect on cell viability.

Keywords: *Thermosacc*, Pedra-2, Corn hydrolysate

1 INTRODUÇÃO

Em virtude das mudanças climáticas, surge a necessidade de encontrarmos combustíveis renováveis que possam substituir por completo os combustíveis fósseis, por questões ambientais, econômicas, sociais e geopolíticas. Diversas políticas públicas ocorrem para incentivar e fomentar tais iniciativas, como a Lei 13.576/2017, que criou a Política Nacional de Biocombustíveis, chamada de RenovaBio (BRASIL, 2017), a qual estabelece metas nacionais anuais de descarbonização para o setor de combustíveis, de forma a aumentar a produção e a participação de biocombustíveis na matriz energética de transportes do país (BARROS; WOODY, 2020; GRASSI; PEREIRA, 2019).

Nesse cenário, o bioetanol, principal produto do setor sucroenergético brasileiro, se destaca. Estimulando a busca de otimização e desenvolvimento de novas e já existentes tecnologias, com reflexo no aumento do rendimento e diminuindo as perdas sem elevar os custos de produção. A diversificação de matérias primas para a produção de bioetanol é de suma importância para alcançar tais objetivos, visto que a sazonalidade de determinada matéria prima limita estas iniciativas (GAROMA; BEN-KHALED; BEYENE, 2012).

A simbiose industrial surge para suprir a necessidade dos processos, otimizando e aperfeiçoando pra maiores rendimentos, economia e sustentabilidade (CHERTOW, 2000). A simbiose industrial, processo pelo qual resíduos, subprodutos ou matérias-primas de uma indústria se tornam matérias-primas para outro processo produtivo e, o biorrefinamento, são fundamentais para aprimoramento da Economia Circular, integrando aspectos socioeconômicos e ambientais, além do bem-estar da comunidade (CHERTOW, 2000). Os principais benefícios são a redução dos custos operacionais e de insumos, os aumentos da produtividade de material e energia, a redução da exposição às volatilidades do mercado e a melhoria do desempenho ambiental - com vantagens de diferenciação de mercado. Como também, as estratégias permitem a criação de novos mercados, auxiliando no aperfeiçoamento para biorrefinarias mais complexas e oportunizando o reconhecimento da indústria de biocombustíveis como parte integrante do uso sustentável de recursos em um nível social mais amplo; Gerando coprodutos de custo competitivo e insumos para: alimentos, rações, insumos, produtos de base biológica e geração de bioenergia; refletindo em impactos positivos (CHERTOW, 2007).

As principais matérias primas para a produção de bioetanol, são a cana-de-açúcar (Brasil) e o milho (Estados Unidos da América). No Brasil, o milho tem duas safras, a principal ocorre durante o verão e logo após esta época, chamada safrinha, ocorre depois do verão, a principal

vantagem o milho proveniente da safrinha pode ser estocado em silos (BARROS; WOODY, 2020).

O etanol advindo do milho é extremamente próspero para o mercado brasileiro, em virtude do crescimento das usinas de processamento de cereal, corroborando para geração de empregos, destinação lucrativa para o excedente do milho, aumento da oferta de etanol, assim sendo, redução dos preços ao consumidor final, com também a cogeração de DDG, fundamental para a alimentação animal (NASTARI, 2018).

Os processos de produção de etanol são similares, ambos por fermentação, utilizando *S. cerevisiae* (ZAMORA, 2009). Em relação ao milho, ocorre a necessidade da quebra das longas moléculas (por meio de hidrolise enzimáticas) de amido em açúcar simples (glicose), sendo necessário o emprego de mais tecnologia para a produção (BARROS; WOODY, 2020). O processo do mosto misto contribui para a redução do consumo de água, por meio da adição do caldo de cana-de-açúcar no processo (SICA et al., 2021).

No que se refere a colheita da cana-de-açúcar varia de local para local, mas geralmente no final da estação seca, onde ocorre o maior acúmulo de açúcares na planta. A cana colhida não pode ser armazenada, sendo necessário o processamento imediato. Em contrapartida o milho apresenta colheita variada em função da época de chuvas, produzindo por um tempo maior. A rotatividade das duas matérias-primas permite otimizar os recursos e fabricar etanol o ano todo, diminuindo a sazonalidade dos valores de etanol hidratado. Sendo uma opção na maioria das indústrias brasileiras são “usinas flex”, as quais processam milho e cana (DE FREITAS; KANEKO, 2011).

Para o produtor de etanol a partir do milho, contabilizamos as contribuições dos subprodutos e, na produção pela cana-de-açúcar, a receita obtida através da cogeração de energia. Contudo na indústria do milho, ocorre um excedente proveniente do processo de sacarificação do milho, enquanto na cana não é necessário pois há sacarose disponível. A rentabilidade do milho é de 380 L de etanol e de cana-de-açúcar de 70 L, a área explorada é menor a cana. No Brasil, cada hectare gera de 60 a 120 toneladas de cana, dependendo da fertilidade e do cultivo. Quanto a produção de milho, gera 3 toneladas de milho, já nos E.U.A. produz cerca de 10 toneladas. Em comparação na redução de gases do efeito estufa na produção e combustão comparada com combustíveis fósseis, a cana-de-açúcar teve redução de 66% enquanto que o etanol de milho reduziu 12% (CHUM et al., 2013).

O balanço energético da cana-de-açúcar equivale a 8,4, já o milho equivale a 1,3, cinco vezes menor. O balanço de energia para converter milho em energia é negativo (1:1,29), ou seja, para cada 1Kcal de energia fornecida pelo etanol de milho, foi necessário 29% a mais de

energia (1,29Kcal) para produzi-lo. O balanço energético da cana-de-açúcar é positivo (1:3,24), ou seja, cada 1 Kcal investida tem 3,24 Kcal de retorno. O etanol de milho reduz em 16% as emissões gases poluentes (em comparação com a gasolina), enquanto o de cana reduz em 44% (GOLDEMBERG, 2007; MACEDO; SEABRA; SILVA, 2008; THATIPAMALA; ROHANI; HILL, 1992).

Pelos motivos expostos acima, o estudo de hidrolisado a partir de milho com a adição de mosto de cana-de-açúcar (processo misto) na substituição da água no processo, é de grande importância visto todas as vantagens que ambos os processos apresentam, a junção dos processos será vantajosa nos aspectos socioeconômico ambiental. A partir dos pontos supracitados, este estudo teve como objetivo estudar os fatores que influenciam a eficiência na fermentação a partir de hidrolisado de milho e suas variações. Os resultados serão apresentados em capítulos.

A finalidade *primeiro* do capítulo foi o efeito da composição do mosto misto sobre cepas de leveduras em relação ao consumo de glicose e frutose, produção de ácidos orgânicos, formação de glicerol, produção de etanol e rendimento.

O objetivo do *segundo* capítulo foi determinar o impacto da contaminação bacteriana sobre os parâmetros fermentativos em mosto misto, como a formação de ácidos orgânicos (succinato, acetato e lactato), a variação do potencial hidrogênico, o consumo de glicose e frutose, formação de glicerol e implicação sobre a viabilidade celular e o impacto na produção de etanol e rendimento fermentativo.

Referências

- BARROS, S.; WOODY, K. **Corn Ethanol Production Booms in Brazil**Usda. [s.l: s.n.].
- CHERTOW, M. R. Industrial symbiosis: Literature and taxonomy. **Annual Review of Energy and the Environment**, v. 25, n. June, p. 313–337, 2000.
- CHERTOW, M. R. “Uncovering ” Industrial Symbiosis. **Journal of Industrial Ecology**, v. 11, n. 1, 2007.
- CHUM, H. L. et al. A comparison of commercial ethanol production systems from Brazilian sugarcane and US corn. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 6, n. 3, p. 246–256, 2013.
- DE FREITAS, L. C.; KANEKO, S. Ethanol demand under the flex-fuel technology regime in Brazil. **Energy Economics**, v. 33, n. 6, p. 1146–1154, 2011.
- GAROMA, T.; BEN-KHALED, M.; BEYENE, A. Comparative resource analyses for ethanol produced from corn and sugarcane in different climatic zones. **International Journal of Energy Research**, v. 33, n. 4, p. 23–40, 2012.

GOLDEMBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 808–810, 2007.

GRASSI, M. C. B.; PEREIRA, G. A. G. Energy-cane and RenovaBio: Brazilian vectors to boost the development of Biofuels. **Industrial Crops and Products**, v. 129, n. July 2018, p. 201–205, 2019.

MACEDO, I. C.; SEABRA, J. E. A.; SILVA, J. E. A. R. Green house gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, n. 7, p. 582–595, 2008.

NASTARI, P. M. **Etanol de milho tem futuro no Brasil** Agroanalysis. [s.l: s.n.].

SICA, P. et al. Effects of energy cane (*Saccharum spp.*) juice on corn ethanol (*Zea mays*) fermentation efficiency: Integration towards a more sustainable production. **Fermentation**, v. 7, n. 1, 2021.

THATIPAMALA; ROHANI, R. S.; HILL, G. A. Effects of high product and substrate inhibitions on the kinetics and biomass and product yields during ethanol batch fermentation. **Biotechnol Bioeng**, v. 40, n. 2, p. 289–97, 1992.

ZAMORA, F. Wine chemistry and biochemistry. In: POLO, M. C. (Ed.). . **Wine Chemistry and Biochemistry**. Tarragona: [s.n.]. p. 1–735.

2 EFICIÊNCIA FERMENTATIVA DE CEPAS INDUSTRIAIS DE LEVEDURAS EM MOSTO MISTO

Resumo

A busca por otimizações de processos que possam diminuir a dependência por combustíveis fósseis, é importante para alcançarmos as metas ambientais, econômicas e sociais firmadas no COP-26. Por esses motivos, o objetivo deste estudo foi investigar a influência do mosto misto (hidrolisado de milho e caldo de cana-de-açúcar) sobre parâmetros fermentativos. Como resultados, as cepas apresentaram comportamento distinto, onde, a *Thermosacc* foi mais eficiente no consumo dos principais carboidratos no meio (glicose e frutose) apresentando inicialmente 151,17 g L⁻¹ de A.R.T. e finalizando com 22,9 g L⁻¹ de A.R. Enquanto que a *Pedra-2* apresentou o seguinte comportamento, onde A.R.T. inicial de 158,02 g L⁻¹ e A.R. de 79,33 g L⁻¹. Tais resultados, talvez sejam devido a *Thermosacc* ser uma cepa industrial utilizada na fermentação a partir de hidrolisado de milho, enquanto que a *Pedra-2* é empregada na indústria produtora de etanol a partir de cana-de-açúcar. Nesse estudo, a cepa *Thermosacc* foi a maior produtora de succinato com 3,2 g L⁻¹ em 48 h, já a cepa *Pedra-2* teve a maior concentração em 54 h de fermentação com 2,3 g L⁻¹. Quanto a produção de acetato, a *Thermosacc* produziu 1,6 g L⁻¹ em 54 h, enquanto que a *Pedra-2* produziu 1,6 g L⁻¹ em 48 h. Na fermentação inoculada com a *Thermosacc*, houve a produção de lactato em 34 h foi de 0,3 g L⁻¹ e mantendo essa concentração até 54 h de fermentação, enquanto que a *Pedra-2* em 22 h apresentou 0,4 g L⁻¹ até o final da fermentação. A cepa *Thermosacc* a partir de 10 h com 0,9 g L⁻¹ até 1,6 g L⁻¹ de acetato em 54 h, já a cepa *Pedra-2* os valores de 1,1 g L⁻¹ se mantiveram nas 34 h iniciais e em 48 h de fermentação, produziu 1,6 g L⁻¹ chegando 1,2 g L⁻¹ de acetato em 54 h. Nas primeiras 4 h de fermentação a cepa *Thermosacc*, produziu cerca de 5,60 g L⁻¹ de glicerol chegando a 17,1 g L⁻¹ em 48 h sua concentração máxima, enquanto que a *Pedra-2* nas primeiras 4 h de fermentação produziu cerca de 4,97 g L⁻¹ de glicerol chegando a 15,7 g L⁻¹ em 48 h. Nas primeiras 4 h de fermentação, a *Thermosacc* produziu cerca de 11 g L⁻¹ de etanol chegando a 114 g L⁻¹ em 54 h sua concentração máxima, enquanto que a *Pedra-2* nas primeiras 4 h de fermentação produziu cerca de 9 g L⁻¹ de glicerol chegando a 86 g L⁻¹ em 54 h. A cepa *Thermosacc* alcançou rendimento máximo de 69% em 54 h de fermentação, já a fermentação inoculada com a cepa *Pedra-2*, apresentou rendimento máximo de 52%. Conclui-se neste estudo que a levedura *Thermosacc* é mais viável em relação aos parâmetros fermentativos-

Palavras chaves: *Thermosacc*, *Pedra-2*, hidrolisado de milho

2.1 Introdução

O interesse pelo desenvolvimento de sistemas produtivos sustentáveis tem aumentado nas últimas décadas, surgindo assim um esforço global para acelerar a transição energética, promovendo a economia circular e de baixo carbono em diversos setores. Neste sentido, as

atenções ambientais, econômicas e geopolíticas de diversos países estão voltadas para fontes alternativas de energia, dentre as quais, o bioetanol se destaca como uma importante estratégia (BOTHAST; SCHLICHER, 2005; LIM; BALSARI; HUNG, 2022).

A produção de bioetanol a partir de milho no Brasil, chama a atenção pela velocidade de expansão e pelos volumes de incentivos e investimentos. A tecnologia ainda é uma novidade em solo brasileiro, cujos impactos são pouco conhecidos. Lavouras de segunda safra permitem uma maior produção por área, melhor proteção do solo e a otimização dos recursos das fazendas. A adoção e aprimoramento desse pacote tecnológico levou à rápida expansão dos volumes produzidos de grãos no Centro Oeste do Brasil, que não foi acompanhada por sistemas de escoamento logístico. Como resultado, observou-se o acúmulo de estoques e a necessidade de acionar políticas para manutenção de preços (NASTARI, 2018; SILVA et al., 202AD).

Na cadeia produtora de etanol a partir de hidrolisado de milho, é possível observar as mais diversificadas formas de economia dos recursos naturais e reaproveitamento eficiente do uso da terra, como a expansão da área de eucalipto que aumenta os estoques de carbono. Em comparação com outros usos antrópicos da terra, como a coprodução de DDGs, que desloca o uso de insumos utilizados para a produção de ração animal então existente, dentre eles, a soja que tem maiores estoques de carbono quando comparados com lavouras anuais (GOLDEMBERG, 2007; MACEDO; SEABRA; SILVA, 2008).

Os principais microrganismos responsáveis pela bioconversão de açúcares em bioetanol, são as leveduras *S. cerevisiae*. As quais baseia-se na capacidade das leveduras de catabolizar moléculas de seis carbonos, como a glicose, em dois componentes de carbono, como o etanol, sem prosseguir para o produto final de oxidação, que é o CO₂. Sendo usadas devido a capacidade de >90,0% de rendimento teórico, apresentam tolerância ao etanol (>40,0g/L), produtividade de etanol (>1,0g/L/h), crescimento em meios simples e baratos e caldo de fermentação não diluído com resistência a inibidores e retardar contaminantes da condição de crescimento (MOHD AZHAR et al., 2017; PARAPOULI et al., 2020).

As cepas de leveduras são determinadas por suas características morfológicas, fisiológicas e genéticas, incluindo a reprodução sexuadas (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011; SEO et al., 2020; ZHAO; BAI, 2009).

As linhagens de leveduras industriais diferem muito em relação aos mais diversos fatores estressantes, como variação do pH, etanol, variação de temperatura, nutrientes e vitaminas, ácidos orgânicos dentre outros fatores (BASSO; BASSO; ROCHA, 2016).

Em virtude do que foi exposto, o intuito do trabalho foi investigar a capacidade fermentativa de cepas de leveduras em mosto misto sobre os parâmetros fermentativos, consumo de carboidratos, açúcares residuais, formação de ácidos orgânicos, glicerol, etanol e influência sobre o rendimento fermentativo.

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Microrganismos

Foi utilizada a linhagem de *S. cerevisiae* como PEDRA-2, linhagem comercial de produção de etanol (tradicionalmente na indústria de produção de etanol a partir de cana-de-açúcar no Brasil), comercializada pela LNF (*Latin American Company*).

A linhagem Thermosacc (*Lallemand Biofuels & Distilled Spirits*) linhagem comercial de produção de etanol de *S. cerevisiae* (tradicionalmente utilizada na indústria de etanol a partir de milho nos Estados Unidos), comercializada pela LNF (*Latin American Company*).

2.2.2 Preparo do mosto misto constituído por hidrolisado de milho e caldo cana

O milho, de um fornecedor local, Piracicaba – SP, foi moído em moinhos tipo martelo, Marca Marconi, até atingir granulometria ≤ 2 mm, para obter o tamanho adequado da moagem e o xarope de cana diluído contendo 90 g L⁻¹ de A.R.T. - açúcares redutores totais, como substituto da água, obtido da Usina Granelli (Fazenda São Benedito, SP-Brasil). Desse modo foi possível obter mosto misto, formado a partir de milho e cana-de-açúcar como fontes de açúcares (matérias-primas). Após a moagem foi realizada uma suspensão do material particulado com xarope diluído. Para tal, foram adicionadas 0,444 kg de milho por litro de xarope diluído. Esta suspensão teve o pH ajustado para 5,8 e, em seguida, foi submetida ao aquecimento, no reator de hidrólise até atingir a temperatura de 85 °C. Nesta condição, foi adicionada enzima α -amilase (lote NWP00339, Novozymes) na concentração de 0,1% (m/m), mantendo a suspensão sob agitação constante de 80 rpm, na temperatura de 85 °C, durante 150 minutos, até a completa dextrinização do amido da suspensão. A suspensão de amido dextranizada teve o pH ajustado para 5,0, posteriormente, resfriada até 65 °C. Utilizando um trocado de calor com “água fria”. Na sequência, foi adicionado a enzima amiloglicosidase (lote NAN10028, Novozymes), na concentração de 0,1% (m/m) e a mistura foi mantida sob

constante agitação 80 rpm a 65 °C por 150 minutos. Finalmente, todo o material hidrolisado foi submetido à centrifugação, para a remoção da fração sólida. A fração líquida remanescente foi utilizada para o preparo do mosto, a qual passou pelo processo de concentração por evaporação, para que a concentração dos açúcares por meio atingisse 442,51 g L⁻¹ de açúcares redutores totais, para posteriormente ser diluído a concentração desejada.

Essa composição mista do mosto juntamente com a interação com a contaminação bacteriana é o diferencial desse estudo.

2.2.3 Tratamento com irradiação ionizante

Os mostos foram irradiados em processo em batelada simples, acondicionando as amostras em recipientes tipo Pyrex[®]. No acelerador de Elétrons Industrial, tipo Dynamitron – Job 188, modelo DC 1500/25/4, fabricado pela empresa RDIRadiation Dynamics Incorporation[®], localizado no Centro Tecnológico de Radiações (CTR), do Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares (IPEN – CNEN SP). Os mostos foram acondicionados no Pirex[®] de modo que a espessura da camada de mosto tratada foi de 2,2 mm, controlada pelo volume das amostras que foram expostas à radiação, com densidade de 1,1 g/cm³ sob a dose de 20 kGy, utilizado-se a energia de 1,037 MeV com corrente de feixe de 4,12 mA, velocidade da bandeja sobre a esteira rolante de 6 m/min, dose por cada passada em 5kGy / passada, 4 passadas totalizando a dose de 20,02 kGy.

2.2.4 Design experimental

Foi realizada análise qualitativa para o tratamento estatístico dos resultados. Os ensaios de fermentação foram conduzidos em dois biorreatores Infors HT, modelo Labfors 3. No Biorreator 1, foi inoculado com a cepa Thermosacc. Enquanto que o Biorreator 2 foi inoculado com a cepa Pedra-2. Antes da inoculação das leveduras nos biorreatores, foi realizada a ativação metabólica da levedura, que consistiu em pesar 60 gramas de levedura, previamente reidratada em Erlenmeyer contendo 150 mL de mosto (150 g A.R.T por litro) esterilizado por feixe de elétrons sob agitação constante a 80 rpm por 30 min em temperatura ambiente. Posteriormente, dando início ao processo fermentativo, aos biorreatores foram adicionados o restante do mosto (850 mL de mosto - 150 g de A.R.T. por litro) em câmara de fluxo laminar para evitar contaminações. Em seguida foram acoplados ao sistema e inoculados com as leveduras reidratadas e bactérias para o respectivo reator, totalizando 1 L de mosto com agitação de 100 rpm por 4 horas sob 30 °C ±2. Decorridas as 4 h do início da

fermentação, teve início o processo de batelada alimentada com vazão de 41,66 mL h⁻¹ (12,5 g ART h⁻¹ ou 300 g de ART L⁻¹) totalizando 1 L após 24 h. Após o término da alimentação, totalizando 54 h de fermentação, após a qual as amostras foram retiradas e analisadas para etanol e lactato, acetato e succinato utilizando cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC).

2.2.5 Determinação de ácidos orgânicos, carboidratos, glicerol e etanol por HPLC

O vinho delevedurado foi destinado para as análises de ácidos orgânico e etanol. Uma alíquota de 100 µl de uma amostra de fermentação + 900 µl água ultra pura (10x), foi analisada usando coluna de troca iônica HPX-87H (Bio-Rad) sob temperatura de 60 ° C, com 5 mM de H₂SO₄ como a fase móvel, a taxa de fluxo de 0,6 mL min⁻¹.

2.2.6 Rendimento fermentativo

O cálculo do rendimento fermentativo foi realizado com base na equação estequiométrica de Gay-Lussac para fermentação alcoólica, em que o 100% de rendimento ocorre quando há formação de 2 Mol de etanol a partir de 1 Mol de glicose, ou seja, a partir de 180 gramas de glicose podem ser formadas 92 g de etanol. Isto significa que a partir de 100 gramas de açúcares redutores totais podem ser produzidos no máximo 51,11 g (64,75 mL) de etanol. Dessa forma, o rendimento fermentativo foi calculado a partir da concentração de açúcares redutores totais presentes nos mostos e as concentrações de etanol presentes nos vinhos de levedurados de cada tratamento. Assim, o rendimento fermentativo foi calculado de acordo com a Equação 1:

$$\text{Equação 1 - Rendimento teórico} \quad Rt = \frac{\text{g de etanol obtidos no vinho}}{(\text{A.R.T. do mosto} * 64,75)} * 100$$

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Influência da cepa de levedura sobre o consumo de carboidratos e açúcares residuais

Cepas de leveduras apresentam comportamentos fermentativos distintos, o que as torna tão peculiares em converter açúcares em etanol e outros subprodutos de interesse para os mais diversos segmentos da indústria (DELLA-BIANCA et al., 2013).

Na figura 3 está o consumo de carboidratos e a concentração de açúcares residuais pela cepa *Thermosacc*® e *Pedra-2* durante as fermentações em mosto misto. Sendo assim, as cepas estudadas nesse trabalho apresentaram comportamento distinto, onde, a *Thermosacc* foi mais eficiente no consumo dos principais carboidratos no meio (glicose e frutose) apresentando inicialmente 151,17 g L⁻¹ de A.R.T. e finalizando com 22,9 g L⁻¹ de A.R. Enquanto que a *Pedra-2* apresentou o seguinte comportamento, onde A.R.T. inicial de 158,02 g L⁻¹ e A.R. de 79,33 g L⁻¹. Tais resultados, ocorreram devido a *Thermosacc* ser uma cepa industrial utilizada na fermentação a partir de hidrolisado de milho, enquanto que a *Pedra-2* é empregada na indústria produtora de etanol a partir de cana-de-açúcar.

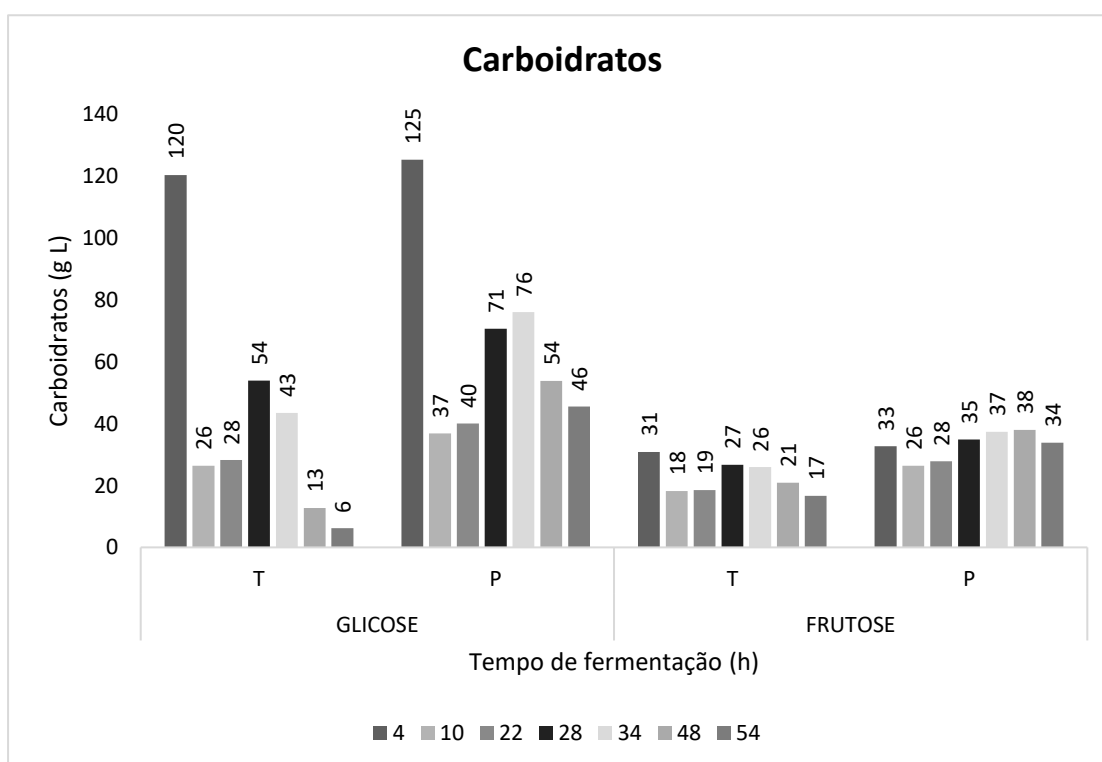


Figura 1 - Consumo de carboidratos pela cepa *Thermosacc*® e *Pedra-2* durante as fermentações.

Uma das principais causas de fermentações lentas ou paradas e altos teores de açúcares residuais em fermentações deve-se a fermentação da frutose.

A glicose e frutose tem transportadores em comum e atualmente foram identificados 20 genes que codificam proteínas relacionadas ao transporte dessas hexoses (BISSON, 1999; REIFENBERGER; BOLES; CIRIACY, 1997). Esse sistema de transporte apresenta maior afinidade com a glicose do que a frutose, mas o V_{max} com os dois açúcares é semelhante. A etapa de transporte e a etapa de fosforilação são possíveis causas da discrepância na fermentação G/F (MCCANN et al., 1987).

A diferença no comportamento das cepas de leveduras como fermentadoras, podem estar associadas a sensibilidade do etanol e/ou a taxa diferente de utilização de nitrogênio (BERTHELIS et al., 2004).

Açúcares fermentescíveis como a glicose e a frutose, desencadeiam o processo de repressão catabólica induzida pelo carbono ou pelo nitrogênio que atuam como vias de regulação, além das vias de sinalização e de sensoriamento de nutrientes, ocorrendo as integrações dessas vias o qual cria um sistema complexo de regulação e sinalização (GANCEDO, 1998; GASCH; WERNER-WASHBURNE, 2002; PETER; DÜRING; AHMED, 2006; SCHNEPER; DÜVEL; BROACH, 2004; SWINNEN et al., 2011).

Ainda não é bem definido e entendido a discrepância de G/F e a base molecular da utilização diferencial de G/F em *S. cerevisiae* (BERTHELIS et al., 2004). Sendo assim uma explicação para a fermentação obtida nesse trabalho, no qual a cepa *Thermosacc* foi mais eficiente na fermentação G/F do que a cepa *Pedra-2*.

2.3.2 Influência da cepa de levedura sobre o consumo de ácidos orgânicos

Na figura 4 se encontra a produção de ácidos orgânicos produzidos pela cepa *Thermosacc*® e *Pedra-2* durante as fermentações em mosto misto. Nesse estudo, a cepa *Thermosacc* foi a maior produtora de succinato com 3,2 g L⁻¹ em 48 h, já a cepa *Pedra-2* teve a maior concentração em 54 h de fermentação com 2,3 g L⁻¹. Já na produção de acetato, a *Thermosacc* produziu 1,6 g L⁻¹ em 54 h, enquanto que a *Pedra-2* produziu 1,6 g L⁻¹ em 48 h. Esses ácidos orgânicos são produzidos naturalmente pelas leveduras, variando as concentrações em relação a cepa de levedura (ALVES, 1994; BASSO; ALVES; AMORIM, 1997). A variação do principal ácido produzido pela levedura, ácido succínico, é de 0,2 a 1,7 g L⁻¹ na fase exponencial, de acordo com HEERDE; RADLER, (1978). Tal informação, indica que a produção desse metabólito pelas leveduras em fermentações provenientes de

mosto misto, a partir de açúcares do amido do milho e do xarope da cana-de-açúcar, sofrem algum tipo de estresse, visto que ocorreu o aumento da produção desse metabolito. L. BERTOLINI et al., (1996) relatou que cerca de $1,23 \text{ g L}^{-1}$ de ácido succínico aumentou a acidez titulável em 50%. Apesar dessa informação, a produção e a influência do ácido succínico na fermentação não são elucidadas em relação a função fisiológica, porém pode ser associada a função ecológica, onde a excreção ocorre devido a um possível controle microbiano de contaminantes (BASSO; ALVES; AMORIM, 1997).

Já o lactato é um ácido orgânico indicador de contaminação, visto que é produzido por bactérias do gênero *Lactobacillus* (NARENDRANATH et al., 1997). Na fermentação inoculada com a *Thermosacc* houve a produção em 34 h $0,3 \text{ g L}^{-1}$ e mantendo essa concentração até 54 h de fermentação, enquanto que a Pedra-2 em 22 h apresentou $0,4 \text{ g L}^{-1}$ até o final da fermentação. Tais concentrações baixas de ácido láctico pode ser um indicativo de que as fermentações não tiveram contaminação bacteriana significativa, ao ponto de influenciar a produção desse ácido e os parâmetros fermentativos. Visto que *S. cerevisiae* também produz lactato, ácidos isovalérico e isobutírico, ácidos gordos entre outros, mas apenas em baixas concentrações (ZAMORA, 2009), sendo uma possível explicação para os valores de lactato encontrado nesse trabalho.

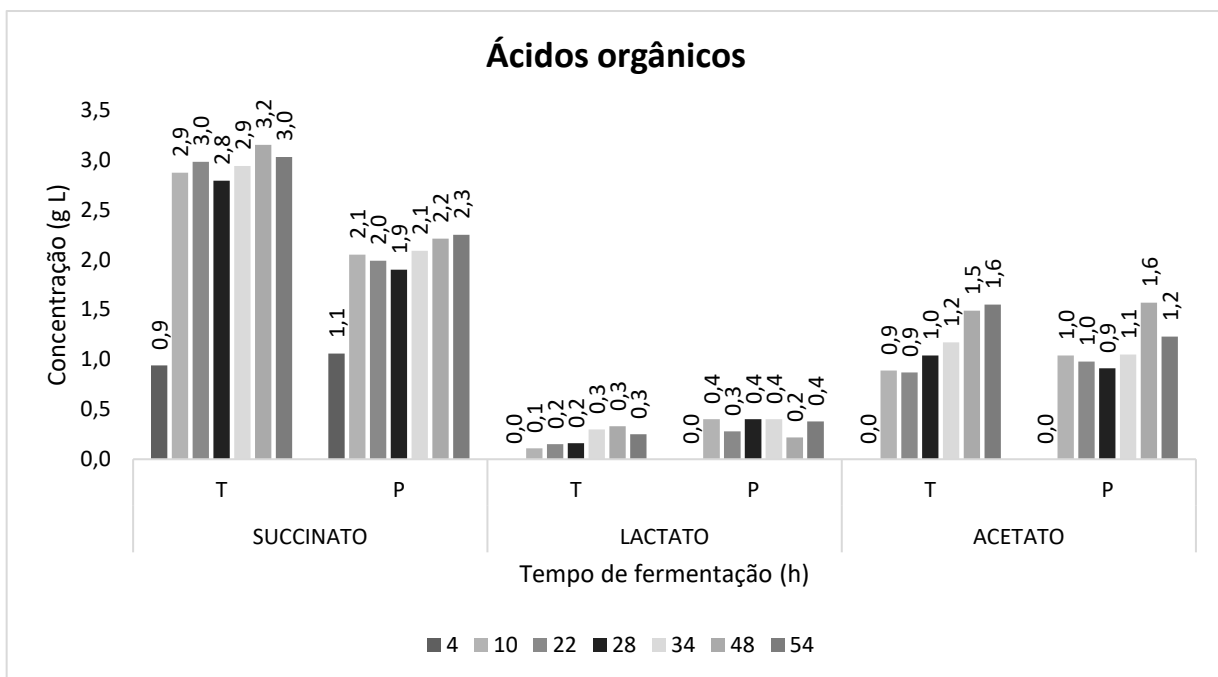


Figura 2 - Produção de ácidos orgânicos pela cepa *Thermosacc*® e Pedra-2 durante as fermentações.

O acetato excretado no meio fermentativo apresentou teores variáveis para as duas cepas de leveduras no substrato testado, como resultado a concentração de acetato foi crescente na fermentação inoculada com a cepa Thermosacc a partir de 10 h com $0,9 \text{ g L}^{-1}$ até $1,6 \text{ g L}^{-1}$ em 54 h, já a cepa Pedra-2 os valores de $1,1 \text{ g L}^{-1}$ se mantiveram nas 34 h iniciais e em 48 h de fermentação produziu $1,6 \text{ g L}^{-1}$ chegando $1,2 \text{ g L}^{-1}$ de acetato em 54 h. A levedura produz acetato no processo oxidativo, a partir do acetaldeído (AMARANTE, 1986; NAGAMATSU et al., 2021). A inibição de crescimento de leveduras e/ou produção de etanol é a partir de 5 g L^{-1} , de acordo com (ENDO et al., 2008; KLINKE; THOMSEN; AHRING, 2004). A concentração de acetato no meio é dependente da intensidade do crescimento microbiano, sendo o acetato metabolizado exclusivamente pelas leveduras que o reabsorvem ao final do processo fermentativo, alterando assim a sua concentração final (ALVES, 1994; GUTIERREZ; AMORIM; BASSO, 1991). Esse dado corrobora com o obtido nesse trabalho, onde houve a diminuição da concentração de acetato na fermentação inoculada com Pedra-2.

2.3.3 Influência da cepa de levedura sobre o consumo de glicerol

O glicerol é um importante subproduto tanto do crescimento celular quanto da fermentação etanólica em *S. cerevisiae* (ALVES, 1994; BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008). A produção deste metabólito foi avaliada durante os experimentos de fermentação das duas linhagens no mosto misto.

Na figura 5 está a produção de glicerol produzidos pela cepa Thermosacc® e Pedra-2 durante as fermentações em mosto misto. Nas primeiras 4 h de fermentação a Thermosacc produziu cerca de $5,60 \text{ g L}^{-1}$ de glicerol chegando a $17,1 \text{ g L}^{-1}$ em 48 h sua concentração máxima, enquanto que a Pedra-2 nas primeiras 4 h de fermentação produziu cerca de $4,97 \text{ g L}^{-1}$ de glicerol chegando a $15,7 \text{ g L}^{-1}$ em 48 h.

O glicerol formado no processo fermentativo está diretamente correlacionado com a cepa de levedura devido a ser uma característica genética, crescimento da levedura, pressão osmótica do meio e formação de ácidos orgânicos, além de condições ambientais como aumento da temperatura, variação no pH e concentração de açúcares e sais no meio (GUTIERREZ; AMORIM; BASSO, 1991; OMORI et al., 1995). Cerca de até 4% da fonte de açúcar é destinada a síntese desse poliálcool em fermentações industriais (NISSEN et al., 2000). Quando processos oxidativos se desenvolvem por causa da produção de biomassa ou formação de ácidos orgânicos, reflete no aumento da produção de NADH que utiliza o poder

reduzidor na síntese do glicerol (BASSO; AMORIN, 1996). O glicerol tem implicações como protetor sob várias condições estressantes (LI et al., 2009), sendo sua síntese e acúmulo intracelular importantes para que a célula recupere a pressão de turgor perdida durante os estresses (ATTFIELD, 1997).

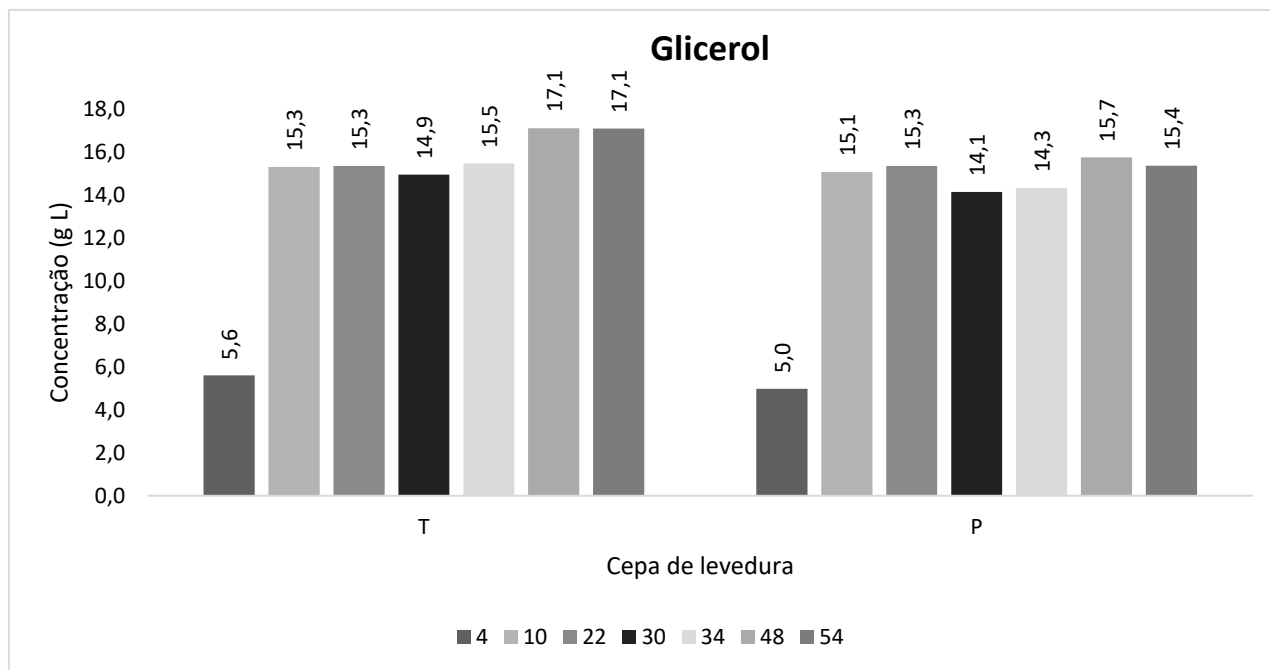


Figura 3 - Produção de glicerol pela cepa Thermosacc® e Pedra-2 durante as fermentações.

2.3.4 Influência da cepa de levedura sobre a produção de etanol

Devido as leveduras serem agentes ativos e responsáveis pela fermentação alcoólica, a escolha da linhagem adequada é essencial para o sucesso da fermentação (BELINATO et al., 2019; MOREIRA et al., 2015).

O etanol é o principal composto formado no processo fermentativo, porém devido a suas características desnaturantes passa a ser tóxico para a célula de levedura a partir de uma certa concentração no meio (KUBOTA et al., 2004).

Na figura 6 está a produção de etanol produzidos pela cepa Thermosacc® e Pedra-2 durante as fermentações em mosto misto. Nas primeiras 4 h de fermentação a Thermosacc produziu cerca de 11 g L⁻¹ de etanol chegando a 114 g L⁻¹ em 54 h sua concentração máxima, enquanto que a Pedra-2 nas primeiras 4 h de fermentação produziu cerca de 9 g L⁻¹ de glicerol chegando a 86 g L⁻¹ em 54 h.

A produção de etanol está diretamente relacionada com o consumo de carboidratos disponíveis e assimiláveis pelas leveduras. Sendo assim, a geração de etanol sofre a influência

da relação G/F como também ad formação de glicerol, visto que a via de síntese desse polioli se forma na mesma via de síntese do etanol, como um desvio, competindo com este pela utilização do poder redutor do NADH, motivo pelo qual sua produção é inversamente proporcional a do etanol, causando queda na eficiência fermentativa (BASSO; AMORIN, 1996).

Diversos autores relatam que, as cepas de *S. cerevisiae* industriais apresentam comportamento fermentativo distintos em relação aos parâmetros fermentativos, tais comportamentos estão atrelados as variações metabólicas expressas em diferentes condições dos processos (MOREIRA et al., 2015).

De acordo com FERREIRA (2002), concentrações superiores a 8%(v/v) de etanol interfere no crescimento celular, redução da taxa de viabilidade e refletindo na capacidade fermentativa das leveduras, corroborando com os resultados obtidos nesse trabalho onde os perfis fermentativos foram distintos de acordo com cada cepa de levedura.

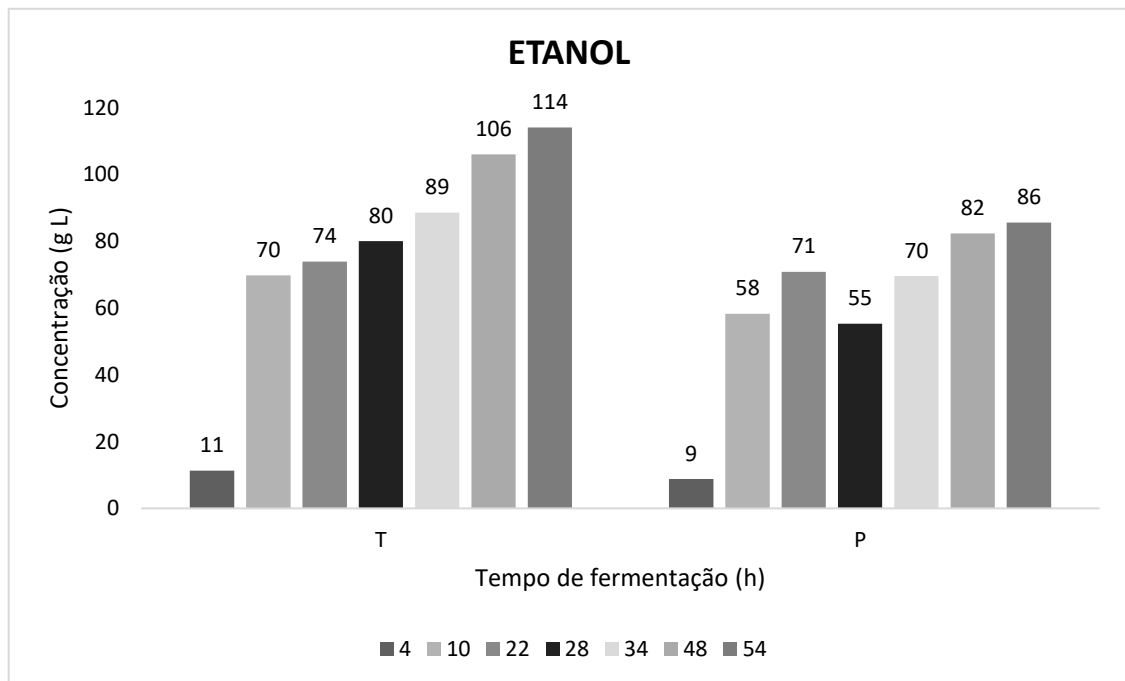


Figura 4 - Produção de etanol pela cepa Thermosacc® e Pedra-2 durante as fermentações.

Um bom rendimento fermentativo é considerado de 90 a 92% de rendimento estequiométrico, ocorrendo pequenos desvio dos carboidratos para multiplicação celular e subprodutos (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001). Em virtude dos poucos dados na literatura sob condições semelhantes a esse trabalho que utilizou mosto misto e duas cepas de levedura,

é de suma importância a constatação desses dados, que possibilitará outras investigações e correções dos dados.

Na tabela 1, esta os rendimentos fermentativos das fermentações de Thermosacc e Pedra-2, onde é possível observar maior rendimentos na fermentação inoculada com a cepa Thermosacc que alcançou rendimento máximo de 69% em 54 h de fermentação, já a fermentação inoculada com a cepa Pedra-2 apresentou rendimento máximo de 52%. Tais rendimentos foram influenciados pelos parâmetros relatados nos tópicos anteriores.

Tabela 1 - Produção de etanol e rendimento fermentativo pela levedura Thermosacc® e Pedra-2 durante as fermentações em mosto misto.

Tempo de fermentação (h)	Concentração de etanol (g L ⁻¹)		Rendimento fermentativo (%)		Açúcares redutores totais (g L ⁻¹)	
	Thermosacc	Pedra-2	Thermosacc	Pedra-2	Thermosacc	Pedra-2
4	11,3	8,8	7	5	151,17	158,02
10	69,8	58,3	48	33	44,69	63,22
22	73,9	70,9	42	35	46,77	67,93
28	80,1	55,3	53	42	80,52	105,53
34	88,6	69,6	45	43	69,35	113,38
48	106,1	82,3	64	50	33,71	91,78
54	114,1	85,6	69	52	22,9	79,33

2.4 Conclusão

A levedura Thermosacc é mais viável em relação aos parâmetros fermentativos e rendimento do que a Pedra-2, provavelmente devido a ser uma cepa desenvolvida para fermentação de fontes amiláceas, que é predominante no mosto misto, o qual a água foi substituída por xarope de cana-de-açúcar.

Referências

ALVES, D. M. G. **FATORES QUE AFETAM A FORMAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS BEM COMO OUTROS PARÂMETROS DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA.** [S.L.] UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 1994.

AMARANTE, J. O. **VINHOS E VINÍCOLAS DO BRASÍLIA PAULOSUMMUS EDITORIAL LTDA**, , 1986.

ATTFIELD, P. V. STRESS TOLERANCE: THE KEY TO EFFECTIVE STRAINS OF INDUSTRIAL BAKER'S YEAST. **NATURE BIOTECHNOLOGY**, V. 15, N. 13, P. 1351–1357, 1997.

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. ETHANOL FERMENTATION TECHNOLOGIES FROM SUGAR AND STARCH FEEDSTOCKS. **BIOTECHNOLOGY ADVANCES**, V. 26, N. 1, P. 89–105, 2008.

BASSO, L. C. .; AMORIN, H. V. HABILIDADE FERMENTATIVA DE LEVEDURAS ISOLDAS DO PROCESSO INDUSTRIAL. **RELATÓRIO ANUAL DE PESQUISAS EM FERMENTAÇÃO ALCÓLICA**, V. 16, N. 01, P. 52–76, 1996.

BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G.; AMORIM, H. V. THE ANTIBACTERIAL ACTION OF SUCCINIC ACID PRODUCED BY YEAST DURING FERMENTATION. **REVISTA DE MICROBIOLOGIA**, V. 28, P. 77–82, 1997.

BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. ETHANOL PRODUCTION IN BRAZIL: THE INDUSTRIAL PROCESS AND ITS IMPACT ON YEAST FERMENTATION. IN: **BIOFUEL PRODUCTION-RECENT DEVELOPMENTS AND PROSPECTS**. MARCO AURE ED. [S.L: S.N.]. V. IP. 13.

BELINATO, J. R. ET AL. MICROBIAL METABOLOMICS: INNOVATIONS AND APPLICATIONS. **QUÍMICA NOVA**, V. 42, N. 5, P. 546–559, 2019.

BERTHEL, N. J. ET AL. DISCREPANCY IN GLUCOSE AND FRUCTOSE UTILISATION DURING FERMENTATION BY SACCHAROMYCES CEREVISIAE WINE YEAST STRAINS. **FEMS YEAST RESEARCH**, V. 4, N. 7, P. 683–689, 2004.

BISSON, L. F. **STUCK AND SLUGGISH FERMENTATIONS**. [S.L.] UNIVERSITY OF CALIFORNIA, DAVIS, 1999.

BOTHAST, R. J.; SCHLICHER, M. A. BIOTECHNOLOGICAL PROCESSES FOR CONVERSION OF CORN INTO ETHANOL. **APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY**, V. 67, N. 1, P. 19–25, 2005.

DELLA-BIANCA, B. E. ET AL. WHAT DO WE KNOW ABOUT THE YEAST STRAINS FROM THE BRAZILIAN FUEL ETHANOL INDUSTRY? **APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY**, V. 97, N. 3, P. 979–991, 2013.

ENDO, A. ET AL. GENOME-WIDE SCREENING OF THE GENES REQUIRED FOR TOLERANCE TO VANILLIN, WHICH IS A POTENTIAL INHIBITOR OF BIOETHANOL FERMENTATION, IN SACCHAROMYCES CEREVISIAE. **BIOTECHNOLOGY FOR BIOFUELS**, V. 1, P. 1–6, 2008.

FERREIRA, L. V. **ESTUDO DA FERMENTAÇÃO ALCÓLICA EM FRASCOS AGITADOS**. [S.L.] UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, 2002.

GANCEDO, J. M. YEAST CARBON CATABOLITE REPRESSION. **MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS**, V. 62, N. 2, P. 334–361, 1998.

GASCH, A. P.; WERNER-WASHBURNE, M. THE GENOMICS OF YEAST RESPONSES TO ENVIRONMENTAL STRESS AND STARVATION. **FUNCTIONAL AND INTEGRATIVE GENOMICS**, V. 2, N. 4–5, P. 181–192, 2002.

GOLDEMBERG, J. ETHANOL FOR A SUSTAINABLE ENERGY FUTURE. **SCIENCE**, V. 315, N. 5813, P. 808–810, 2007.

GUTIERREZ, L. E.; AMORIM, H. V.; BASSO, L. C. **INIBIDORES DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICASOCIEDADE DOS TÉCNICOS AÇUCAREIROS E ALCOOLEIROS DO BRASIL - STAB**. [S.L: S.N.].

HEERDE, E.; RADLER, F. METABOLISM OF THE ANAEROBIC FORMATION OF SUCCINIC ACID BY *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. **ARCHIVES OF MICROBIOLOGY**, V. 117, N. 3, P. 269–276, 1978.

KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B.; AHRING, B. K. INHIBITION OF ETHANOL-PRODUCING YEAST AND BACTERIA BY DEGRADATION PRODUCTS PRODUCED DURING PRE-TREATMENT OF BIOMASS. **APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY**, V. 66, N. 1, P. 10–26, 2004.

KUBOTA, S. ET AL. EFFECT OF ETHANOL ON CELL GROWTH OF BUDDING YEAST: GENES THAT ARE IMPORTANT FOR CELL GROWTH IN THE PRESENCE OF ETHANOL. **BIOSCIENCE, BIOTECHNOLOGY AND BIOCHEMISTRY**, V. 68, N. 4, P. 968–972, 2004.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. DEFINITION, CLASSIFICATION AND NOMENCLATURE OF THE YEASTS. **THE YEASTS**, V. 1, P. 3–5, 2011.

L. BERTOLINI ET AL. HIGHER ALCOHOL PRODUCTION BY CRYOTOLERANT *SACCHAROMYCES* STRAINS. **AMERICAN JOURNAL OF ENOLOGY AND VITICULTURE**, V. 47, 1 JAN. 1996.

LI, F. ET AL. AN INNOVATIVE CONSECUTIVE BATCH FERMENTATION PROCESS FOR VERY HIGH GRAVITY ETHANOL FERMENTATION WITH SELF-FLOCCULATING YEAST. **APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY**, V. 84, N. 6, P. 1079–1086, 2009.

LIM, A. M. Y.; BALSARI, S.; HUNG, K. K. C. COP 26, CLIMATE CHANGE, AND EMERGENCY MEDICINE: WHAT MUST WE DO? **HONG KONG JOURNAL OF EMERGENCY MEDICINE**, V. 29, N. 2, P. 69–71, 2022.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. PRODUÇÃO DE ETANOL. IN: BLUCHER, E. (ED.). **BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL: PROCESSOS FERMENTATIVOS E ENZIMÁTICOS**. V. 3.

MACEDO, I. C.; SEABRA, J. E. A.; SILVA, J. E. A. R. GREEN HOUSE GASES EMISSIONS IN THE PRODUCTION AND USE OF ETHANOL FROM SUGARCANE IN BRAZIL: THE 2005/2006 AVERAGES AND A PREDICTION FOR 2020. **BIOMASS AND BIOENERGY**, V. 32, N. 7, P. 582–595, 2008.

MCCANN, A. K. ET AL. AN UNUSUAL HEXOSE-ATP-KINASE WITH TWO CATALYTIC SITES AND A ROLE IN CARBON CATABOLITE REPRESSION IN THE YEAST *SCHWANNIOMYCES OCCIDENTALIS*. **JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY**, V. 133, N. 2, P. 381–389, 1987.

MOHD AZHAR, S. H. ET AL. YEASTS IN SUSTAINABLE BIOETHANOL PRODUCTION: A REVIEW. **BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS REPORTS**, V. 10, N. FEBRUARY, P. 52–61, 2017.

MOREIRA, C. S. ET AL. ANÁLISE DOS PARÂMETROS MORFOFISIOLÓGICA DE LINHAGENS DE LEVEDURAS INDUSTRIAIS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL. **CIÊNCIA E NATUREA**, V. 37, N. 3, 2015.

NAGAMATSU, S. T. ET AL. ETHANOL PRODUCTION PROCESS DRIVING CHANGES ON INDUSTRIAL STRAINS. **FEMS YEAST RESEARCH**, V. 21, N. 1, P. 1–10, 2021.

NARENDRANATH, N. V. ET AL. EFFECTS OF LACTOBACILLI ON YEAST-CATALYZED ETHANOL FERMENTATIONS. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, V. 63, N. 11, P. 4158–4163, 1997.

NASTARI, P. M. **ETANOL DE MILHO TEM FUTURO NO BRASILAGROANALYSIS.**

NISSEN, T. L. ET AL. OPTIMIZATION OF ETHANOL PRODUCTION IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* BY METABOLIC ENGINEERING OF THE AMMONIUM ASSIMILATION. **METABOLIC ENGINEERING**, V. 2, N. 1, P. 69–77, 2000.

OMORI, T. ET AL. HIGH GLYCEROL PRODUCING AMINO ACID ANALOGUE-RESISTANT *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* MUTANT. **JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING**, V. 80, N. 3, P. 218–222, 1995.

PARAPOULI, M. ET AL. **SACCHAROMYCES CEREVISIAE AND ITS INDUSTRIAL APPLICATIONS.** [S.L: S.N.]. V. 6

PETER, G. J.; DÜRING, L.; AHMED, A. CARBON CATABOLITE REPRESSION REGULATES AMINO ACID PERMEASES IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* VIA THE TOR SIGNALING PATHWAY. **JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, V. 281, N. 9, P. 5546–5552, 2006.

REIFENBERGER, E.; BOLES, E.; CIRIACY, M. KINETIC CHARACTERIZATION OF INDIVIDUAL HEXOSE TRANSPORTERS OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* AND THEIR RELATION TO THE TRIGGERING MECHANISMS OF GLUCOSE REPRESSION. **EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY**, V. 245, N. 2, P. 324–333, 1997.

SCHNEPER, L.; DÜVEL, K.; BROACH, J. R. SENSE AND SENSIBILITY: NUTRITIONAL RESPONSE AND SIGNAL INTEGRATION IN YEAST. **CURRENT OPINION IN MICROBIOLOGY**, V. 7, N. 6, P. 624–630, 2004.

SEO, S. O. ET AL. ANTI-CONTAMINATION STRATEGIES FOR YEAST FERMENTATIONS. **MICROORGANISMS**, V. 8, N. 2, P. 1–13, 2020.

SILVA, H. J. T. DA ET AL. ASPECTOS TÉCNICOS E ECONÔMICOS DA PRODUÇÃO DE ETANOL DE MILHO NO BRASIL (2020). **REVISTA DE POLÍTICA AGRÍCOLA**, V. 29, N. 4, P. 142–159, 202AD.

SWINNEN, S. ET AL. IDENTIFICATION OF NOVEL CAUSATIVE GENES IN AN INDUSTRIALLY IMPORTANT TRAIT USING POOLED SEGREGANT WHOLE-GENOME SEQUENCE ANALYSIS. **MOLECULAR CELL**, P. 1–31, 2011.

ZAMORA, F. WINE CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY. IN: POLO, M. C. (ED.). . **WINE CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY**. TARRAGONA: [S.N.]. P. 1–735.

ZHAO, X. Q.; BAI, F. W. MECHANISMS OF YEAST STRESS TOLERANCE AND ITS MANIPULATION FOR EFFICIENT FUEL ETHANOL PRODUCTION. **JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY**, V. 144, N. 1, P. 23–30, 2009.

3 EFEITO DA CONTAMINAÇÃO POR *Lactobacillus* SOBRE PARÂMETROS DA FERMENTAÇÃO DE MOSTO MISTO

Resumo

Na fermentação alcoólica, os *Lactobacillus* constituem os principais grupos de microrganismos contaminantes do processo produção de biocombustíveis e bebidas, causando prejuízos globais de bilhões de dólares por ano. Por esses motivos, os objetivos deste estudo foram investigar os efeitos da contaminação por *Lactobacillus* sobre a produção de etanol, utilizando *Saccharomyces cerevisiae*, em mosto misto obtido a partir de hidrolisado de milho e caldo de cana, influenciando os teores de lactato, acetato, succinato e pH. Para tal foi realizado uma contaminação induzida com *Lactobacillus*, denominados (R2) e mostos não contaminados pelas bactérias lácticas, chamado de (R1). No tratamento sob as condições do R2 foi observado as concentrações mínimas e máximas de cada elemento respectivamente, como succinato 0,2 a 2,9 g L⁻¹ produzido pelas leveduras, lactato 0,5 a 8,3 g L⁻¹ e acetato 0,2 a 3,3 g L⁻¹ principais ácidos indicadores de contaminantes por *Lactobacillus* apresentando variação no pH entre 4,7 a 3,5. Por outro lado, no mosto não contaminado (R1) foi observado concentrações de succinato 0,2 a 1,3 g L⁻¹, lactato 0 a 0,5 g L⁻¹ e acetato 0 a 0,9 g L⁻¹ com variação no pH 4,8 a 4,4. Como decorrência desses resultados a produção de etanol foi afetada diretamente pela produção de ácidos orgânicos e a variação do pH. De modo que, nas fermentações submetidas ao R2 a contaminação bacteriana afetou negativamente a produção de etanol, que atingiu a produção aproximadamente 73 g L⁻¹. Em contrapartida, na fermentação realizada sob as condições do R1 foi observada a concentração de 93 g L⁻¹ de etanol. No tratamento sob as condições do mosto não contaminado (R1) foi observado as concentrações máximas e mínimas de cada parâmetro, respectivamente, glicose de 94,44 a 0,20 g L⁻¹; frutose 22,25 a 0,59 g L⁻¹; glicerol 12 a 3 g L⁻¹; viabilidade celular de 84,5 para 53,3% redução dos valores após 45 h de fermentação. Por outro lado, no mosto contaminado (R2) foi observado concentrações de glicose de 88,67 a 9,46 g L⁻¹; frutose de 21,05 a 6,40 g L⁻¹; glicerol de 12 a 3 g L⁻¹ e a viabilidade celular de 85,7 a 18,8%. Conclui-se que, em mosto misto, elaborado a partir de milho e caldo de cana, os impactos da contaminação sobre os parâmetros de fermentação (ácidos orgânicos, pH, teor de etanol, rendimento e produtividade) são semelhantes àqueles observados em mostos de fonte única de carbono (milho ou cana), como também afeta diretamente o consumo de glicose e frutose, como a produção de glicerol refletindo na viabilidade celular em mosto misto, elaborado a partir de milho e caldo de cana-de-açúcar.

Palavras chave: Hidrolisado de milho, Contaminação, Ácidos orgânicos, pH, Rendimento.

3.1 Introdução

As atenções de muitas nações estão voltadas para impactos ambientais, sociais, econômicos e geopolíticos das tecnologias e produtos gerados. Por esses motivos, os países estão focando seus esforços em fontes renováveis de energia. Dentre essas, o bioetanol se destaca como uma importante estratégia energética para armazenar parte da energia solar,

utilizada nos processos globais de fotossíntese, como uma fonte liquefeita, fácil de ser armazenada, distribuída e aproveitada (LOPES et al., 2016).

A combinação do processamento de cana e de milho em uma mesma planta, durante todo o ano, sem riscos tecnológicos no processo, pode representar grande avanço para aumentar a eficiência energética da agroindústria mundial (BELLUCO; ALCARDE, 2008; LETÍCIA VECCHI, 2018). Neste sentido, nosso trabalho comprova que é possível a substituição da água no processo de hidrólise do milho, pelo caldo da cana-de-açúcar, sem a diminuição da eficiência na hidrólise e sem irregularidades no processo. Apresentando como vantagens, maior economia e preservação dos recursos hídricos e de áreas agricultáveis. Sendo um meio mais complexo do que o convencional. Foi estabelecido que o crescimento da levedura é mais rápido e a biomassa produzida é maior em meios contendo ingredientes complexos, quando comparado ao crescimento em meio mínimo (THOMAS; HYNES; INGLEDEW, 2002).

O mosto de milho pode amenizar os efeitos dos ácidos orgânicos sobre as leveduras. Na indústria do etanol de milho, é convencionalmente ajustado o pH do mosto para 4,0-4,5 ou até menor que 4,0 (fermentação contínua), como uma tentativa para controlar a contaminação bacteriana. A inibição da levedura por ácidos é maior nesses níveis de pH. O pH intracelular constante é fundamental para o funcionamento normal das enzimas glicolíticas na fase de crescimento das leveduras (GRAVES et al., 2006).

Na indústria de etanol combustível, em ambos os processos, acredita-se que a contaminação bacteriana predominante é pertence ao gênero *Lactobacillus* (que metaboliza carboidratos para o crescimento e produção de energia, levando à formação de ácidos orgânicos, principalmente o ácido lático e o ácido acético (COSTA et al., 2007; Thomas et al., (2001). A presença desses metabólitos bacterianos é a principal causa de redução da eficiência na produção de etanol e perda de rendimentos, pois ocorre desvio constante de carbono disponível para conversão em etanol e competem pelos fatores de crescimento necessários à levedura. Desse modo, os efeitos deletérios da contaminação podem variar em relação aos contaminantes específicos presentes e das condições de cultura empregadas (SKINNER; LEATHERS, 2004).

Para conter a ação dos contaminantes, é muito usual a adição de antibióticos, tais como: penicilina G, estreptomicina, tetraciclina (AQUARONE, 1959; DAY et al., 1954) virginiamicina (HYNES et al., 1997; ISLAM; TOLEDO; HAMDY, 1999) ou suas misturas para ter um amplo espectro de ação. Entretanto, o uso exagerado de antibióticos, pode favorecer o surgimento de bactérias resistentes a esses antibióticos em outras espécies

(animais ou humana) que possam ser alimentados direta ou indiretamente pelas leveduras utilizadas nesses processos (KHACHATOURIANS, 1998). Sendo assim, faz-se necessário adotar alternativas para diminuir o consumo de antibióticos pela indústria de biotecnologia produtora do bioetanol.

Até o momento, não há estudos quantitativos acessíveis acerca do surgimento natural das bactérias na produção comercial de etanol combustível a base de milho.

Por esses motivos, o controle microbiano do substrato por feixes de elétrons é uma estratégia de grande potencial para reduzir a incidência das contaminações em processos biotecnológicos. A radiação provoca na molécula de água a perda de elétrons, produzindo H_2O^+ e e^- , gerando compostos como hidrogênio e radical hidroxila (OH^\cdot), hidrogênio molecular e oxigênio, bem como peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Os radicais OH^\cdot e o H_2O_2 apresentam comportamento mais reativos dessas interações, reagindo com o ácido nucléico e ligando-se quimicamente com a hélice simples em um outro ácido nucléico, bem como se ligando no par de bases da hélice oposta (AL-ASSAF et al., 2016; MOLINS, 2001). As interações podem também ser direta ou indiretamente com outros componentes das células, como membranas, enzimas e plasmídeos. Essas interações são refletidas na taxa de sobrevivência das células danificadas, onde dificultam ou impedem a sobrevivência (MOLINS, 2001).

A radiação não causa perdas na qualidade do material tratado (BHAT; KARIM ALIAS; PALIYATH, 2012). Sendo possível a instalação na linha de produção com a utilização de parte da energia excedente gerada a partir da matéria-prima. A esterilização por feixe de elétrons em mosto possibilitaria a remoção dos processos de controle microbiológicos que são utilizados nas usinas brasileiras produtoras de etanol. Essa ferramenta em potencial, já tem sido utilizada para reduzir a carga microbiana em outros materiais, tais como: grãos de cereais, águas residuárias e soluções açucaradas (BORRELY; DEL MASTRO; SAMPA, 1998; PODADERA, 2007; RELA, 2003).

Neste artigo, estudamos os efeitos dos ácidos orgânicos e a variação do pH sobre a produção de etanol em mosto obtido a partir de hidrolisado de milho e caldo de cana em uma única linha de fermentação.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Microorganismos

A cepa de *S. cerevisiae* usada neste estudo é uma cepa industrial comum nas indústrias de álcool de combustível e bebidas alcoólicas (Thermosacc, Lallemand Biofuels & Distilled Spirits). Os contaminantes utilizados foram: *Lactobacillus plantarum* (código ESALQ 4), *Lactobacillus fermentum* (código ESALQ 3), *Lactobacillus paracasei* (código LAB. 4) e *Lactobacillus reuteri* (código ATC23272), bactérias do gênero *Lactobacillus*, pertencentes a biblioteca de microrganismos do BELa - Bioprocess Engineering Lab/USP, microrganismos escolhidos por serem representantes dos grupos dos contaminantes iniciais e finais do processo, de acordo com FIRMINO et al., 2020.

3.2.2 Preparo do mosto misto constituído por hidrolisado de milho e caldo cana

O milho (de um fornecedor local, Piracicaba - SP) foi moído em moinhos tipo martelo, Marca Marconi, até atingir granulometria ≤ 2 mm para obter o tamanho adequado da moagem e o xarope de cana diluído contendo 90 g L⁻¹ de A.R.T. - açúcares redutores totais, como substituto da água, obtido da Usina Granelli (Fazenda São Benedito, SP-Brasil). Desse modo foi possível obter mosto misto, formado a partir de milho e cana-de-açúcar como fontes de açúcares (matérias-primas). Esta é inovação peculiar deste trabalho para o estudo da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica. Após a moagem foi realizada uma suspensão do material particulado com xarope diluído. Para tal foram adicionadas 0,444 kg de milho por litro de xarope diluído. Esta suspensão teve o pH ajustado para 5,8 e, em seguida, foi submetida ao aquecimento, no reator de hidrólise até atingir a temperatura de 85 °C. Nesta condição, foi adicionada enzima α -amilase (lote NWP00339, Novozymes) na concentração de 0,1% (m/m), mantendo a suspensão sob agitação constante de 80 rpm, na temperatura de 85 °C, durante 150 minutos, até a completa dextrinização do amido da suspensão. A suspensão de amido dextranizada teve o pH ajustado para 5,0, posteriormente, resfriada até 65 °C. Utilizando um trocador de calor com “água fria”. Na sequência, foi adicionado a enzima amiloglicosidase (lote NAN10028, Novozymes), na concentração de 0,1% (m/m) e a mistura foi mantida sob constante agitação 80 rpm a 65 °C por 150 minutos. Finalmente, todo o material hidrolisado foi submetido à centrifugação, para a remoção da fração sólida. A fração líquida remanescente foi utilizada para o preparo do mosto. A fração líquida passou pelo

processo de concentração por evaporação, para que a concentração dos açúcares do meio atingisse $442,51 \text{ g L}^{-1}$ de açúcares redutores totais, para posteriormente ser diluído a concentração desejada.

3.2.3 Tratamento com irradiação ionizante

Os mostos foram irradiados em processo de batelada simples, acondicionando as amostras em recipientes tipo Pyrex[®]. No acelerador de Elétrons Industrial, tipo Dynamitron – Job 188, modelo DC 1500/25/4, fabricado pela empresa RDIRadiation Dynamics Incorporation[®], localizado no Centro Tecnológico de Radiações (CTR), do Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares (IPEN – CNEN SP). Os mostos foram acondicionadas no Pirex[®] de modo que a espessura da camada de mosto tratada foi de 2,2 mm, controlada pelo volume das amostras que foram expostas à radiação, com densidade de $1,1 \text{ g/cm}^3$ sob a dose de 20 kGy, utilizado-se a energia de 1,037 MeV com corrente de feixe de 4,12 mA, velocidade da bandeja sobre a esteira rolante de 6 m/min, dose por cada passada em 5kGy / passada, 4 passadas totalizando a dose de 20,02 kGy.

3.2.4 Design experimental

Foi realizada análise qualitativa para o tratamento estatístico dos resultados. Os ensaios de fermentação foram conduzidos em dois biorreatores Infors HT, modelo Labfors 3. No Biorreator 1, não houve contaminação proposital por *Lactobacillus*, foram inoculadas apenas leveduras. Enquanto que o Biorreator 2 foi realizado a contaminação induzida com *Lactobacillus* e utilizada a levedura como agente de fermentação. Antes da inoculação das leveduras nos biorreatores, foi realizada a ativação metabólica da levedura, que consistiu em pesar 60 gramas de levedura, previamente reidratada em Erlenmeyer contendo 150 mL de mosto (150 g A.R.T por litro) esterilizado por feixe de elétrons sob agitação constante a 80 rpm por 30 min em temperatura ambiente. Posteriormente, dando início ao processo fermentativo, aos biorreatores foram adicionados o restante do mosto (850 mL de mosto - 150 g de A.R.T. por litro) em câmara de fluxo laminar para evitar contaminações. Em seguida foram acoplados ao sistema e inoculados com as leveduras reidratadas e bactérias para o respectivo reator, totalizando 1 L de mosto com agitação de 100 rpm por 4 horas sob $30 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$. Decorridas as 4 h do início da fermentação, teve início o processo de batelada alimentada com vazão de $41,66 \text{ mL h}^{-1}$ ($12,5 \text{ g ART h}^{-1}$ ou $300 \text{ g de ART L}^{-1}$) totalizando 1 L após 24 h. Após o término da alimentação, a fermentação continuou por mais 17 horas, totalizando 45 h

de fermentação, após a qual as amostras foram retiradas e analisadas para etanol e lactato, acetato e succinato utilizando cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC).

3.2.5 Determinação de compostos por HPLC

O vinho delevedurado foi destinado para as análises de etanol e subprodutos da fermentação. Uma alíquota de 100 µl de uma amostra de fermentação + 900 µl água ultra pura (10x), foi analisada usando coluna de troca iônica HPX-87H (Bio-Rad) sob temperatura de 60 ° C, com 5 mM de H₂SO₄ como a fase móvel, a taxa de fluxo de 0,6 mL min⁻¹.

3.2.6 Rendimento fermentativo

O cálculo do rendimento fermentativo foi realizado com base na equação estequiométrica de Gay-Lussac para fermentação alcoólica, em que o 100% de rendimento ocorre quando há formação de 2 Mol de etanol a partir de 1 Mol de glicose, ou seja, a partir de 180 gramas de glicose podem ser formadas 92 g de etanol. Isto significa que a partir de 100 gramas de açúcares redutores totais podem ser produzidos no máximo 51,11 g (64,75 mL) de etanol. Dessa forma, o rendimento fermentativo foi calculado a partir da concentração de açúcares redutores totais presentes nos mostos e as concentrações de etanol presentes nos vinhos delevedurados de cada tratamento. Assim, o rendimento fermentativo foi calculado de acordo com a Equação 1:

$$\text{Equação 2 - Rendimento teórico} \quad R_t = \frac{\text{g de etanol obtidos no vinho}}{(\text{A.R.T.do mosto} * 64,75)} * 100$$

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Influência da contaminação bacteriana sobre o consumo de glicose e frutose

No reator 1 é interessante ressaltar que com a diminuição da concentração de açúcar (glicose e frutose) ocorreu o aumento da concentração de glicerol (figura 11). Uma possível explicação é que a formação de glicerol é aumentada se houver um efeito negativo na reação que converte acetaldeído em etanol. A produção de glicerol a partir da glicose é, portanto, um

neutralizador natural do processo e é aumentada em resposta ao estresse osmótico (KLEIN et al., 2017). Sendo interessante destacar que a concentração de glicose de 94,4 g em apenas 8 h foi para 18,5 g (redução de 75,9 g), enquanto que a frutose saiu de 22,3 g para 15,7 g em 8 h (redução de 6,6 g). Ficando comprovado a preferência da levedura em assimilar glicose primeiramente ao invés da frutose. Já com 45 h de fermentação, restaram apenas 2,0 g de glicose e 0,6 g de frutose. No reator 2 a concentração de glicose de 88,7 g em apenas 8 h foi para 16,4 g (redução de 72,3 g), enquanto que a frutose saiu de 21,1 g para 13,3 g (redução de 7,8g). Possivelmente a contaminação bacteriana causa à levedura uma certa inibição por meio dos ácidos orgânicos produzidas por ela, os quais influenciam diretamente no pH do meio no decorrer da fermentação, atrapalhando a assimilação dos açúcares pela levedura. Sendo assim o reator 2 apresentou concentração de açúcar residual de 9,5 g L⁻¹ de glicose e 6,4 g L⁻¹ de frutose (figura 1), enquanto que o reator 1 apresentou concentração de 0,2 g L⁻¹ de glicose e 0,6 g L⁻¹ de frutose.

Corroborando com os resultados obtidos nesse trabalho, os autores KANDLER; WEISS, 1986, relataram que os fatores de crescimento como nucleotídeos, aminoácidos, vitaminas (biotina e vitamina B12) são essenciais para as atividades metabólicas de *Lactobacillus*. De acordo com Momose e Tonoike (1968), o esgotamento de vitaminas e aminoácidos no meio pelo consumo das bactérias está relacionado a inibição da levedura. Narendranath et al., (1997), relataram que as reduções na atividade metabólica da levedura estão relacionadas com a remoção de fatores essenciais ao crescimento de forma que as taxas de *Lactobacillus* sejam maiores que as taxas de *S. cerevisiae*. Tal fato pode ter contribuído para a diminuição das atividades metabólicas das leveduras e conseqüentemente menor assimilação dos açúcares, resultando em altas concentrações de açúcares residuais (figura 1).

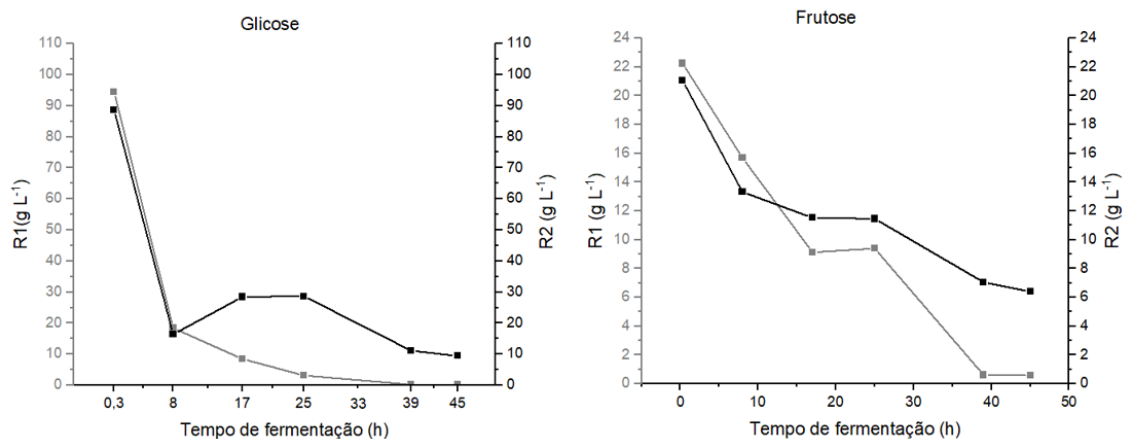


Figura 5 - Consumo de glicose e frutose pela levedura *Themosacc*® durante as fermentações, em mosto não contaminado (R1) e contaminado (R2).

3.3.2 Influência da contaminação bacteriana sobre os ácidos orgânicos

Devido as leveduras sobreviverem em ambientes ácidos isso possibilita a coexistência com bactérias lácticas, provocado pelos ácidos acéticos e lácticos, como também a resistência aos antibióticos, adquirido pelas bactérias (BORAAM et al., 1993). A secreção de diversas substâncias como ácidos orgânicos, álcoois e até compostos mais complexos e derivados do metabolismo secundário acarretam uma relação antagônica entre bactérias e leveduras (WALKSMAN, 1947).

Indicadores bioquímicos de leveduras e bactérias podem refletir mais precisamente as atividades metabólicas nas fermentações, sendo o ácido láctico um dos principais indicadores de contaminação bacteriana, já para a presença das leveduras, o principal indicador é ácido succínico predominantemente, em contrapartida, o ácido acético pode ser produzido por ambos microrganismos (ALVES, 1994; BASSO; ALVES; AMORIM, 1997a).

Com relação aos principais ácidos orgânicos (succínico, láctico e acético) presentes no meio fermentativo, pode-se notar que a produção diferiu entre as fermentações provenientes do mosto não contaminado quando comparada com aquela de mosto contaminado (Figuras 7, 8 e 9). Na Figura 7, pode ser observado que os valores médios de ácido succínico nos mostos contaminados foram maiores que no mosto não contaminado. Isso indica que as leveduras tiveram que aumentar a produção desse metabólito, para se protegerem e se tornarem mais competitivas no meio. Sendo observado que no R1 (não contaminado) os níveis de ácido succínico manteve dentro do esperado durante toda a fermentação. A partir da quarta hora de fermentação, foi observada o aumento na produção de ácido succínico de 0,2 chegando a 1,9 g L⁻¹ às 25 horas de fermentação. Posteriormente a quantidade de ácido succínico decaiu a partir das 25 h se mantendo em 0,8 g L⁻¹ até o fim da fermentação com 45 h. Os resultados encontrados no presente trabalho, corroboram com aqueles descritos por HEERDE & RADLER, (1978), os quais relatam que o ácido succínico é quantitativamente o principal ácido formado pela levedura variando de 0,2 a 1,7g L⁻¹ na fase exponencial. Isso indica que a produção desse metabólito pelas leveduras em fermentações provenientes de mosto misto (a partir de açúcares do amido do milho e do xarope da cana-de-açúcar) não sofrem estresse ao ponto do aumento da produção de succinato e são semelhantes aqueles resultados dos teores deste metabólito obtidos pelas leveduras em fermentações somente com mosto obtido a partir de milho ou de cana-de-açúcar.

No mosto fermentado R2 (contaminado), a produção de ácido succínico foi influenciada pela contaminação bacteriana. Isto pode ser notado, pois até 1h30min de fermentação teve

comportamento semelhante ao R2 com produção de $0,2 \text{ g L}^{-1}$, porém a partir de 2 h apresentou aumento da produção de 1 g L^{-1} chegando até $2,9 \text{ g L}^{-1}$ às 27 h de fermentação, posteriormente a quantidade de ácido decaiu a partir das 39 h se mantendo em 2 g L^{-1} até o fim da fermentação com 45 h. O ácido succínico é um dos ácidos mais importantes que se desenvolve durante a fermentação devido ao metabolismo da levedura, com concentrações médias de aproximadamente $0,5 - 1,5 \text{ g L}^{-1}$ no vinho (HEERDE; RADLER, 1978).

Segundo Song; Lee (2006), o ácido succínico é um dos principais responsáveis pelo aumento da acidez titulável durante a fermentação. Trabalhos como o de BERTOLINI et al., (1996), relataram que o $1,23 \text{ g L}^{-1}$ de ácido succínico foi a causa do aumento de 50% na acidez titulável.

Segundo Basso; Alves; Amorim (1997), 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.

A produção de ácidos orgânicos (lactato e acetato) ou a competição por nutrientes são possíveis causas do efeito inibitório que *Lactobacillus* exercem sobre as *Saccharomyces*, resultando na diminuição da produção de etanol (NARENDRANATH et al., 1997). Contudo, diversos pesquisadores relataram que tais mecanismos não podem explicar completamente o fenômeno dessa inibição.

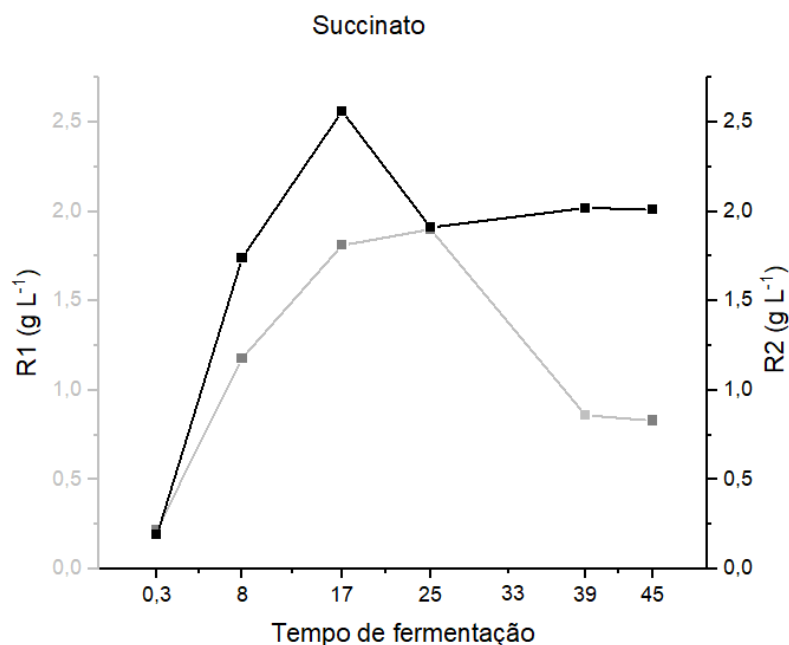


Figura 6 - Produção de succinato pela levedura *Thermosacc*® durante as fermentações, em mosto não contaminado (R1) e contaminado (R2).

A presença de ácido láctico, principal produto do metabolismo das bactérias lácticas, foi detectado em ambos os meios fermentativos com diferença significativa nas concentrações. Na Figura 8, podem ser observadas as concentrações médias de ácido láctico de $0,4 \text{ g L}^{-1}$ no mosto não contaminado e $6,1 \text{ g L}^{-1}$ no mosto contaminado. No tratamento conduzido no Biorreator R1 (não contaminado) os níveis de lactato no mosto se mantiveram na faixa de $0,2$ a $0,5 \text{ g L}^{-1}$ até o fim da fermentação com 45h. Estes níveis são considerados aceitáveis, conforme relatado Basso; Alves; Amorim (1997). Por outro lado, no mosto da fermentação conduzida no R2 é interessante ressaltar que a produção de lactato foi influenciada pela contaminação bacteriana. A partir do início do processo fermentativo foi possível verificar aumento gradual na concentração de lactato no meio de cultivo, no qual após 4 h do início da fermentação já havia formado $2,9 \text{ g L}^{-1}$ de lactato. Esse aumento foi constante e depois de 45h de fermentação a concentração desse metabólito foi de $8,3 \text{ g L}^{-1}$. Nesta concentração de ácido láctico no meio, já pode começar a acontecer a inibição da fermentação.

Maiorella; Blanch; Wilke (1984), relataram que a inibição da fermentação começa a ocorrer na faixa de 10 a 40 g L^{-1} de ácido láctico. Em fermentações utilizando a levedura *S. cerevisiae*, verificaram reduções de até 80% na produção de massa celular quando a concentração de ácido láctico no meio era de 38 g L^{-1} .

A ação do ácido láctico é evidenciada no trabalho de GRAVES et al., (2006), onde o efeito na produção máxima de etanol foi de 4% c/v no pH 4 em meio fermentativo (aproximadamente 2.36% de ácido dissociado). Enquanto que o ácido acético não é influenciado pelo pH, onde pode ocorrer a aceleração da produção de etanol em níveis baixos, em torno de $\leq 0,2\%$.

Em fermentações de multiestágio, o modo de ação do ácido láctico na produção de etanol por *S. cerevisiae* em pH 6, não pode ser explicado totalmente ao nível de inibição, visto que somente 0,01% do ácido láctico seria não dissociado, ao mesmo tempo que 3,4% ácido láctico não dissociado era preciso para chegar a uma diminuição de 50% no número de leveduras, de acordo com Bayrock; Ingledew (2004).

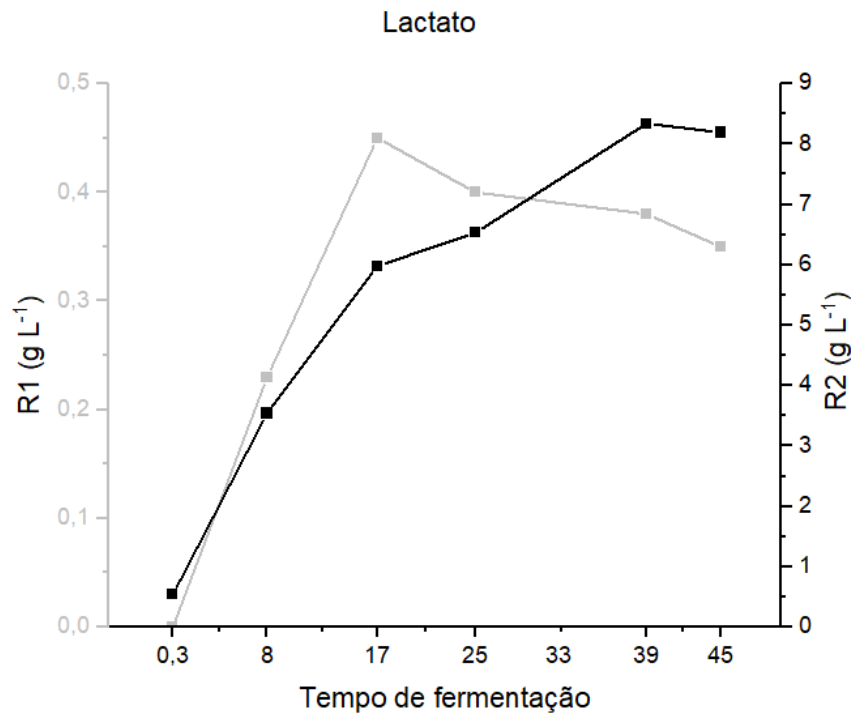


Figura 7 - Produção de lactato pela levedura *Thermosacc*® durante as fermentações, em mosto tratado com feixes de elétrons (R1) e mosto contaminado (R2).

No que tange a produção de ácido acético na fermentação, seja oriundo de leveduras ou das bactérias contaminantes foram observadas diferenças significativas entre as fermentações conduzidas sob as condições do Tratamento R1 quando comparada com o Tratamento R2 (Figura 9). Durante o período de 45 h de fermentação, as produções de ácido acético variaram de concentrações entre 0,2 e 0,9 g L⁻¹ no tratamento sem contaminação (Tratamento R1). Por outro lado, nas fermentações conduzidas nas condições do Tratamento R2 (meio contaminado), a partir do início do processo fermentativo foi possível observar o aumento gradual nas concentrações de acetato no mosto. Quatro horas após o início da fermentação foi verificada a concentração de 1,3 g L⁻¹ de acetato. Entretanto, após 45 horas de fermentação a concentração deste metabólito atingiu o teor de 3,3 g L⁻¹. Esta concentração de acetado foi 3,66 vezes maior do que a observada ao término da fermentação conduzida sob as condições do Tratamento R1, onde o meio de cultivo foi tratado com o feixe de elétrons. Isso indica a grande produção de ácido acético pelas bactérias contaminantes. Em relação a presença de ácido acético na fermentação sem contaminação, a qual deve ser atribuída às leveduras, não há consenso geral sobre a função desse metabólito produzido pelas leveduras e a influência sobre a produção de etanol.

Cfissio et al., 1987, relataram que a forma não dissociada do ácido acético se difunde nas células de levedura onde se dissocia, induzindo uma acidificação do citosol. As células reprimidas pela glicose são impermeáveis ao ânion que é capturado dentro das células e acumulado. Quando a concentração da forma não dissociada é igual em ambos os lados da membrana plasmática é alcançado o equilíbrio (GIANNATTASIO et al., 2013; MOLLAPOUR; PIPER, 2006).

O crescimento e a sobrevivência das leveduras são influenciados pelos nutrientes e outros componentes não nutricionais presentes nos meios complexos, como também a habilidade no tamponamento extra que o mosto de milho pode ofertar para a levedura em suportar o estresse ocasionado pelos ácidos (NARENDRANATH et al., 1997). Possivelmente o meio complexo como o mosto de milho, possibilita menor efeitos inibitórios dos ácidos láctico e acético em comparação com um meio mínimo (HYNES et al., 1997).

GRAVES et al., (2006), relataram que na fermentação de mosto de hidrolisado de milho, onde a produção de etanol foi completamente inibida em todos os mostos com pH 4 na presença de ácido acético em concentrações $\pm 0,8\%$ p/v. Corroboram com os resultados encontrados nesse trabalho, onde o pH variou entre 4,7 para 3,8 no mosto contaminado, sendo assim uma possível explicação para a baixa produção de etanol, que em comparação com o mosto não contaminado o pH variou entre 4,8 a 4,3 obtendo maiores valores de etanol.

Com base nesses argumentos, pode-se supor que ácido acético, láctico juntamente com o etanol, podem agir de forma sinérgica no metabolismo e crescimento das leveduras, refletindo diretamente na diminuição do rendimento alcoólico. Além disso, considerando que os maiores teores de ácidos orgânicos na fermentação são produzidos pelas bactérias homos e heteros (CHERUBIN, 2003). No nosso trabalho, infere-se que o rendimento da fermentação foi diretamente afetado, o que resultou em redução significativa deste atributo durante a fermentação.

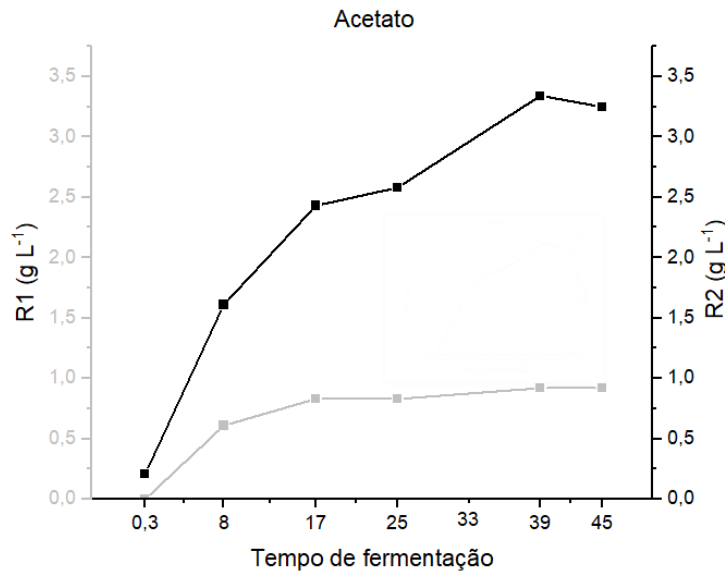


Figura 8 - Produção de acetato pela levedura *Thermosacc*® durante as fermentações, em mosto não contaminado (R1) e contaminado (R2).

3.3.3 Efeito da contaminação bacteriana sobre a produção de glicerol

A linhagem de levedura influencia diretamente a produção de glicerol durante a fermentação alcoólica, como também o pH, a temperatura e a concentração de sacarose, de acordo com (GUTIERREZ; AMORIM; BASSO, 1991).

Os resultados aqui apresentados demonstraram que em virtude da redução da concentração de açúcar no reator 1 e acréscimo proporcional da concentração de etanol foi possível observar o aumento da produção de glicerol pelas leveduras e a influência na viabilidade celular. Segundo (ALVES, 1994; DRA et al., 2000; LIMA; BASSO; AMORIM, 2001), no decorrer da fermentação alcoólica, cerca de 2 a 8 % do açúcar consumido pela levedura pode ser convertido a glicerol por meio de um desvio da fosfodiidroxiketona da glicólise. Sendo que a contaminação bacteriana no presente trabalho não influenciou a produção de glicerol, mas sim, o consumo do açúcar no meio e a baixa concentração de açúcar residual, onde o R1 apresentou menor concentração de 3,05 e máxima de 14,49 g L⁻¹ enquanto o R2 apresentou menor concentração de 2,99 e máxima de 12,42 g L⁻¹, com variação entre 0,1 a 3,5 g L⁻¹ na geração de glicerol (figura 12). Uma possível explicação, é que o glicerol pode ser utilizado como única fonte de carbono sob condições anaeróbicas e pode tratar-se, por outro lado, de um subproduto quando a glicose ou outros açúcares

facilmente fermentescíveis é convertido a etanol (KLEIN et al., 2017). Ainda no mesmo trabalho, os autores relataram que o acúmulo de glicerol é fundamental na restauração das funções biológicas normais da célula no decorrer da osmorregulação, provavelmente não sendo o responsável pela sobrevivência ao estresse osmótico (KLEIN et al., 2017).

Corroborando com o trabalho de Klein et al., (2017) , o estudo de ERASMUS et al. (2003) constatou que a adaptação metabólica da levedura *S. cerevisiae* em condições estressantes a altas concentrações de açúcares, conferiu a síntese de glicerol a finalidade de “válvula de segurança” liberando rapidamente carboidratos á levedura em situações adversas juntamente com a trealose e glicogênio.

A função do consumo de NADH na formação de glicerol é entendida como sendo a manutenção do balanço redox citosólico, compensando as reações celulares que produzem NADH (CRONWRIGHT; ROHWER; PRIOR, 2002; KLEIN et al., 2017). A produção de glicerol a partir da glicose é, portanto, um neutralizante redox natural do processo (BASSO, 2004).

Os resultados aqui apresentados mostraram que a contaminação bacteriana do mosto misto com diferentes *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. paracasei* e *L. reuteri*) durante a fermentação alcoólica resultaram na rápida perda da viabilidade da levedura após a exaustão dos açúcares fermentáveis apesar da sobra de açúcares residuais e o aumento da concentração de glicerol no meio não contaminado em relação ao contaminado. Parte dos resultados do presente trabalho foram controversos ao estudo dos autores ThomasS; Hynes; Ingledew, (2001), onde notaram a diminuição na produção de etanol, aumento do desvio de carboidrato para a produção de glicerol e ácidos, queda da viabilidade celular, redução na formação de massa celular da levedura e inibição no desenvolvimento da bactéria em fermentação com mosto a base de milho em batelada com cultura mista contaminada com *L. fermentum*.

Segundo D'amore; Stewart, (1987), o etanol gerado na fermentação desempenha diversos modos de ação complexos e muitos mecanismos são propostos sobre a levedura, podendo influenciar na multiplicação e viabilidade celular, desnaturação e inibição de enzimas, assim como em danos na membrana plasmática alterando a sua permeabilidade. O mecanismo de inibição é complexo e muitos modelos são propostos.

Até o momento, a influência dos metabolitos produzidos por bactérias na produção de glicerol por leveduras é desconhecida. A observação sugere que pode haver tal relação. Nesse sentido, não está claro se as condições nutricionais alteradas devido os contaminantes causam a inibição da produção de glicerol ou se a levedura diminuiu sua produção para combater o

"estresse" causado pelos produtos do metabolismo bacteriano. Sendo necessário mais estudos nesse sentido.

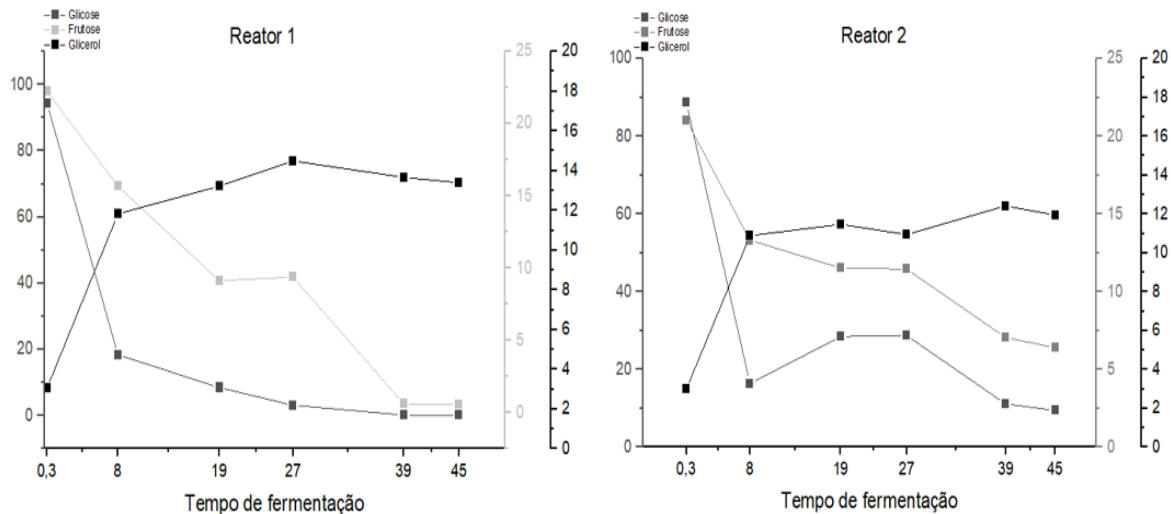


Figura 9 - Consumo de glicose e frutose sobre a produção de glicerol pela levedura *Themosacc*® durante as fermentações, em mosto não contaminado (R1) e contaminado (R2).

3.3.4 Efeito da contaminação bacteriana sobre o potencial de hidrogênio

O pH é influenciado por diversos fatores, principalmente pelos ácidos orgânicos gerados durante a fermentação por bactérias e leveduras (BAYROCK; INGLEDEW, 2004; BAYROCK; MICHAEL INGLEDEW, 2001; THOMAS; HYNES; INGLEDEW, 2002). Na Figura 10, pode ser observada a variação de pH durante a fermentação. Os resultados demonstram que foram encontradas diferenças significativas nos valores de H das fermentações conduzidas sob as condições do R1 (não contaminado), que variaram de 4,84 (pH inicial) ao pH 4,44 no final da fermentação (em 45 h) quando comparadas com as fermentações conduzidas nas condições do R2 (contaminado), os valores de pH variaram de 4,67 (pH inicial) até 3,8 (pH no final da fermentação, após 45 h). Esta redução mais acentuada dos valores de pH durante a fermentação pode ser atribuída às bactérias contaminantes do processo, devido à formação de ácidos orgânicos. Isso indica que além da análise de acidez, a análise do pH pode ser um parâmetro importante para verificar a produção de ácidos orgânicos durante a fermentação e a possível presença de agentes contaminantes. No Biorreator 2 com a presença de contaminantes *Lactobacillus*, a diminuição do pH foi diretamente proporcional ao aumento da produção dos ácidos orgânicos (Figura 4). Nas primeiras 4 horas de fermentação, houve rápida queda no pH de 4,7 para 3,8, onde manteve

pequena variação de 3,5 a 3,7 durante toda a fermentação por 45h. Já no Biorreator 1, a variação do pH nas primeiras 4 h foi de 4,8 para 4,3, onde se manteve durante toda a fermentação de 45 h.

A variação do pH está diretamente associada ao efeito dos ácidos orgânicos sobre as células de leveduras e a influência na produção de etanol. Trabalhos como o de BAYROCK; INGLEDEW (2004) e BAYROCK; MICHAEL INGLEDEW (2001) demonstrou que se o pH ou a temperatura mudassem, possibilitaria que *Lactobacillus* superassem as *Saccharomyces* provocando perda do produto final ou fermentação presa. Para elucidar esse conceito, os autores mantiveram por 3 dias o pH 6 do meio fermentativo, com isso houve o aumento da população de lactobacilos aumentando 4,4 logs e a população de *Saccharomyces* diminuiu 83%. A concentração de etanol diminuiu 44% e os níveis de ácido láctico aumentaram de 0,41% w/v para 2% c/v.

A presença de ácidos orgânicos (acético, láctico e succínico) na fermentação possivelmente seja uma explicação para a redução do pH, visto que o ácido acético na sua forma indissociada, difunde-se através da membrana plasmática para o interior da célula da levedura. No citosol, os valores de pH mais elevados que no meio externo propiciam a dissociação de espécies do ácido da sua forma molecular para a forma iônica, liberando prótons que provocam a diminuição do pH citosólico, conseqüentemente, podendo trazer danos à célula, causados pela acidificação do citoplasma. Essas alterações na fisiologia celular, também refletem diretamente no rendimento da fermentação para a produção de etanol (CASEY et al., 2010; JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2003; JÖNSSON; MARTÍN, 2016; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

Para contornar a acidificação do pH citosólico, ocasionada pela dissociação do ácido no interior da célula, duas proteínas presentes na célula são essenciais: ATPases da membrana plasmática (PM-ATPase) e ATPases vacuolares (V-ATPase), responsáveis por retirar H⁺ do citoplasma. Contudo, isso resulta no consumo de ATP pela célula (CASEY et al., 2010; GENG; ZHANG; SHI, 2017). Conseqüentemente, menos moléculas de ATP estarão disponíveis para a formação de biomassa, resultando em células com menor vitalidade para realizar a fermentação, de modo que, aumenta o tempo da fermentação, diminui a viabilidade das leveduras e reduz a produtividade de etanol. Concentrações muito altas de H⁺ no interior da célula promovem demandas muito elevadas de ATP, isso impossibilita a célula evitar acidificação do pH citosólico e gera danos celulares subsequentes, incluindo perturbação do gradiente eletroquímico, diminuição da síntese de DNA e RNA e até morte celular programada (GIANNATTASIO et al., 2013; LUDOVICO et al., 2001). Além dos efeitos

nocivos da alteração de pH intracelular (descritos anteriormente), o excesso de acetato (a base conjugada) também pode interferir negativamente no metabolismo celular, inibindo a atividade da enzima enolase na via glicolítica, aumentando a pressão de turgor e gerando estresse oxidativo (BELLISSIMI et al., 2009; SWINNEN et al., 2014). Com o aumento do pH, ocorre a dissociação dos ácidos fracos, o que leva a diminuição da concentração da forma indissociada do ácido e eleva a concentração da base conjugada. Teoricamente, a toxicidade provocada pelo ácido acético é maior em pH mais baixo, quando o número de moléculas indissociadas é maior, do que em pH alto (HENTGES, 1967).

O comportamento da variação do pH, em função dos ácidos orgânicos, produzidos durante a fermentação do mosto misto foi semelhante ao relatado pelos autores infracitados, utilizando mosto de fonte única de matéria-prima, seja amido ou açúcares fermentescíveis (mono ou dissacarídeos). Isso indica que após a hidrólise do amido e pela presença de enzimas que realizam a inversão dos açúcares (maltose e sacarose em glicose), as reações de catabolismo e anabolismo pelas células das leveduras e das bactérias contaminantes são semelhantes nos diferentes tipos de mostos aqui discutidos, evidenciando a influência do pH sobre os *Lactobacillus* e sua intervenção na produção de etanol em fermentação com mosto misto.

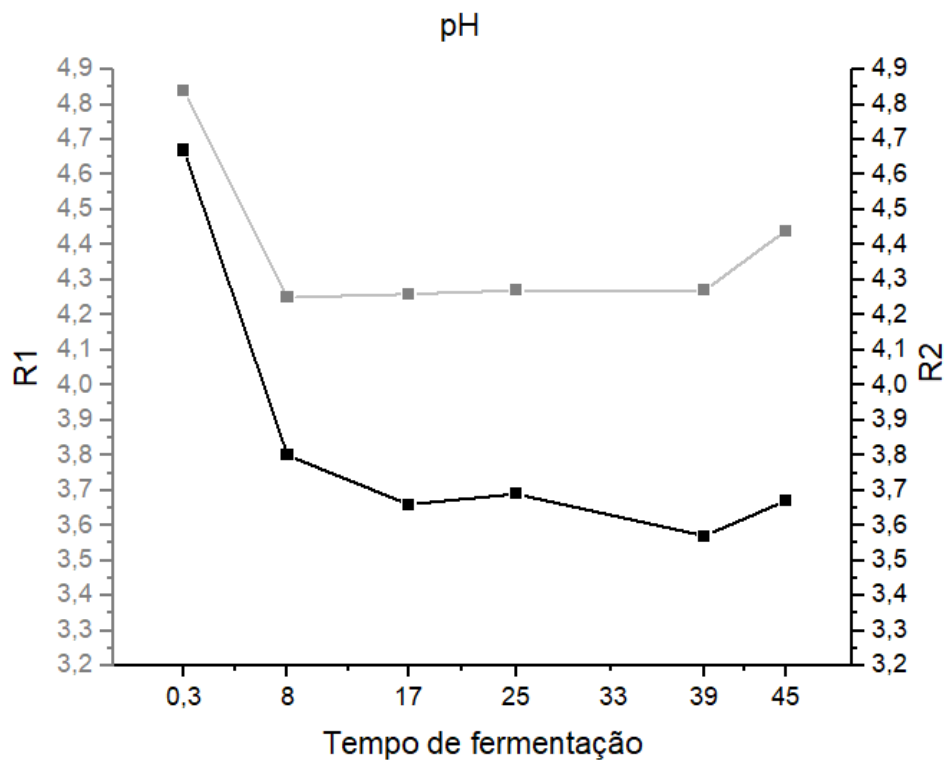


Figura 10 - Variação do pH durante a fermentação pela levedura Thermosacc®, em mosto não contaminado (R1) e contaminado (R2).

3.3.5 Efeitos da contaminação de *Lactobacillus* na viabilidade celular

Em relação a viabilidade celular, até às 4 h iniciais foi semelhante nos dois tratamentos, onde R1 apresentou 68,6% e R2 apresentou 63,1 %, a partir de 15 h de fermentação com o aumento gradual de ácidos orgânicos no meio, foi possível observar a diminuição da viabilidade do R2 – 43,8% enquanto que o R1 - 68,4%, a constatação da influência negativa da contaminação sobre a viabilidade celular é destacada com 45 h onde apresentou viabilidade de 18,8%, afetando a fermentação a tal ponto que foi necessário encerra-la devido à baixa viabilidade, enquanto que o R1 apresentava 53,3% (figura 13). Sendo assim, foi comprovada a intervenção na redução do rendimento fermentativo de forma negativa. Trabalhos como os de YOKOYA, 1991; BEVAN, BOND, 1971 corroboram com a influência negativa da contaminação, visto que eles estudaram a queda na viabilidade ou morte das leveduras pelos compostos tóxicos lançados no meio pelas bactérias, principalmente os ácidos lácticos e acéticos. Segundo Ferguglia (1997), ocorre diminuição na viabilidade de 97% para 55% após 12 h de cultivo misto de *S. cerevisiae* x *L. fermentum*. A presença de bactérias contaminantes acarreta o desvio de carboidratos para a geração de glicerol e ácidos orgânicos refletindo na diminuição da viabilidade celular em 55% e diminuição de biomassa em fermentações em batelada de mosto a partir de milho provocando decréscimo de 22% na produção de etanol, de acordo com Thomas; Hynes; Ingledew, (2001).

Trabalhos como o de Alexandre; Charpentier, (1998); Huang et al., (1996), corroboram com a nossa pesquisa onde, afirmam que *Lactobacillus* e leveduras são antagônicos, e que outros fatores, além dos ácidos orgânicos podem provocar a inibição do crescimento de levedura e perda de viabilidade.

Diversos produtos do metabolismo dos *Lactobacillus* prejudicam o crescimento e a viabilidade das leveduras, como também variados mecanismos de inibição foram propostos (ALEXANDRE; CHARPENTIER, 1998; EDWARDS et al., 1999; JAMES E. RASMUSSEN et al., 1995; PAMPULHA; LOUREIRO-DIAS, 1989, 1990, 2000; PONS; RAJAB; ENGASSER, 1986), porém, tem poucos trabalhos que relatam o efeito da inibição dos lactobacilos durante o curso da fermentação alcoólica pela levedura.

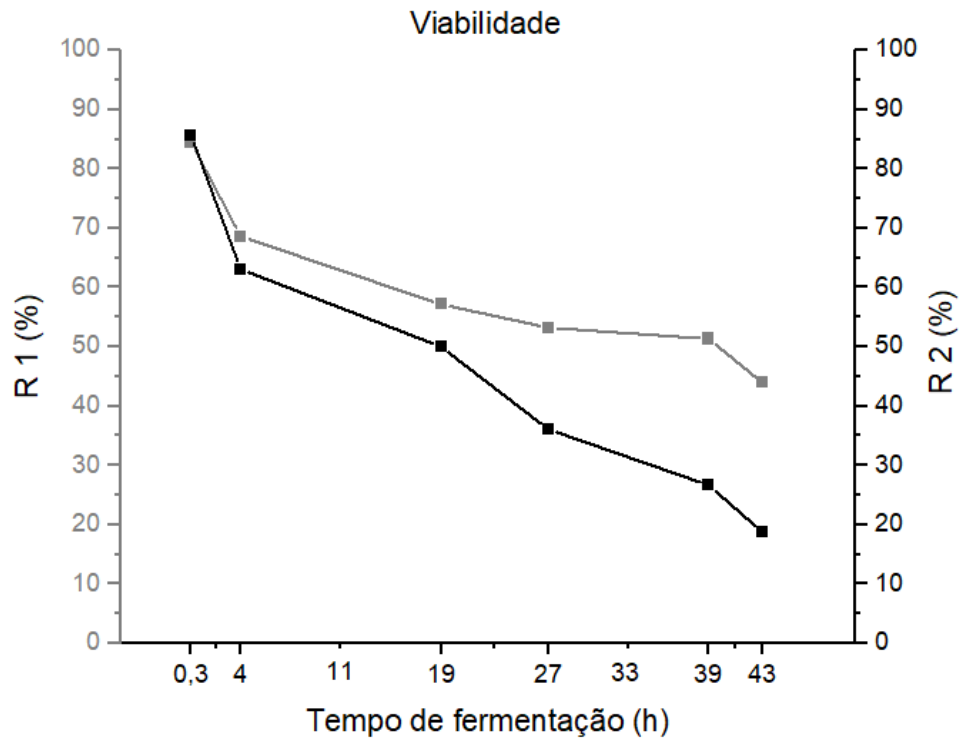


Figura 11 - Perfil de viabilidade celular da levedura Themosacc® durante as fermentações, em mosto não contaminado (R1) e contaminado (R2).

3.3.6 Efeitos da contaminação na concentração final de etanol e no rendimento

Foi observado diferenças significativas no teor de etanol final produzido pelas leveduras na presença e na ausência de contaminantes (Tabela 11) no mosto misto. Foi possível observar que desde o início da fermentação o mosto contaminado com *Lactobacillus* (R2), apresentava redução na produção de etanol em comparação à fermentação conduzida nas condições do biorreator (R1), não contaminado, refletindo na redução do rendimento. Essas diferenças podem estar relacionadas com a produção de lactato e acetato pelas bactérias, e o succinato pelas leveduras, sendo que parte dos carboidratos e nutrientes foram desviados para a produção dos ácidos orgânicos ao invés de utilizados para a produção de etanol. Já no Biorreator R1 (sem contaminação), durante a fermentação foi observada menor produção dos ácidos e maior produção na concentração final de etanol. Possivelmente, em virtude de não terem ocorridos desvios de açúcares para as rotas metabólicas de produção de ácidos orgânicos por bactérias. Durante o período de 45 h de fermentação, as concentrações de etanol variaram entre 6 e 93 g L⁻¹ no tratamento sem contaminação (Tratamento R1), proporcionando o rendimento no final da fermentação de 76,8%. Por outro lado, nas fermentações conduzidas nas condições do Tratamento R2 (meio contaminado), a partir do

início do processo fermentativo foi possível observar a produção de etanol variando 5 e 77 g L⁻¹ com rendimento fermentativo final de 63,8%.

Na literatura científica são escassos os estudos detalhados sobre os efeitos dos ácidos orgânicos na produção de etanol a partir de hidrolisado de milho. Os poucos que frequentemente usam hidrolisado de milho, mostram efeito protetor do meio mais complexo devido ao aumento da capacidade tampão, de acordo com os seguintes autores GRAVES et al., (2006, 2007); THOMAS; HYNES; INGLEDEW, (2002).

Inoculação prévia de *Lactobacillus* por 24h antes da fermentação com *Saccharomyces*, reduziu em 22% a produção de etanol (THOMAS; HYNES; INGLEDEW, 2001), sendo todo o açúcar consumido. Ainda os mesmos autores reportaram que a perda dessa magnitude não poderia ser explicada em termos de açúcares sendo desviados para o crescimento bacteriano, produção de ácido acético ou ácido láctico, ou pelo aumento da síntese de glicerol sozinho.

Autores como NGANG et al., (1990), demonstraram que na presença de 10 g L⁻¹ de ácido láctico durante a fermentação ocorre a inibição de cerca de 50% do crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*, enquanto o *Lactobacillus casei* sp. usado no estudo foi capaz de produzir apenas 2.5 g L⁻¹, em uma fermentação a partir de melaço de beterraba.

Os *Lactobacillus* afetam diretamente as fermentações de diversas formas, e muitos trabalhos ainda serão necessários para compreender de forma detalhada como afetam a fermentação, bem como as melhores estratégias para conter essas infecções crônicas (BECKNER; IVEY; PHISTER, 2011).

A contaminação bacteriana pode causar perdas de até 55% do valor teórico do rendimento em etanol (ALCARDE, 2000 apud AMORIM et. al., 1981). De acordo com ALCARDE, (2000) apud ALTERTHUM et. al., (1984), contaminação de bacteriana que atinge valores de 10⁸ a 10⁹ células mL⁻¹. podem afetar a fermentação podendo promover perdas nos rendimentos nas ordens de 14 a 90%. Estes resultados também foram observados por Neto (1995), quando verificou que a contaminação bacteriana na faixa de 10⁸ a 10⁹ células/mL levou a queda de 14 a 90% do rendimento teórico, como também 10⁷ a 10⁸ células/mL acarretou uma queda de 10 a 40% no rendimento.

A indústria considera um rendimento fermentativo excepcional, quando o mesmo equivale 90 a 92% do rendimento estequiométrico, havendo pequeno desvio dos açúcares para multiplicação celular e formação de subprodutos. Considerando uma contaminação bacteriana significativa da fermentação, este rendimento cai consideravelmente (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001). De forma semelhante aos resultados reportados pela literatura em fermentações utilizando mostos de fonte única de açúcares, neste estudo foi observado que a

contaminação bacteriana influenciou diretamente o rendimento da fermentação de mosto misto de hidrolisado de milho e xarope de cana-de-açúcar (tabela 2). Isto significa que independente da origem dos açúcares utilizados para a elaboração do mosto, a contaminação bacteriana afeta negativamente o rendimento da fermentação alcoólica. De modo que é essencial o desenvolvimento de processos e estratégias de controle de contaminantes na fermentação alcoólica para evitar esses prejuízos para indústria.

Tabela 2 - Produção de etanol e rendimento fermentativo pela levedura *Thermosacc*® durante as fermentações, em mosto não contaminado (R1) e contaminado (R2).

Tempo de fermentação (h)	Concentração de etanol (g L ⁻¹)		Rendimento fermentativo (%)		Açúcares redutores totais (g L ⁻¹)	
	Reator 1	Reator 2	Reator 1	Reator 2	Reator 1	Reator 2
0,3	5,0	5,5	4,2	4,6	116,7	109,7
8	48,5	47,5	40,2	39,4	34,1	29,7
25	79,7	63,2	66,1	52,4	19,7	49,9
39	92,7	77,0	76,8	63,8	0,8	18,2
45	89,2	72,8	74,0	60,4	0,8	15,9

3.4 Conclusão

A contaminação por *Lactobacillus* em fermentação de mosto misto (hidrolisado de milho e xarope de cana-de-açúcar) pode ter agido negativamente no metabolismo das leveduras, resultando principalmente em diminuição na produção de etanol, no aumento do desvio de carboidratos para a produção de ácidos orgânicos, na redução no pH do meio fermentativo e diminuição do rendimento da fermentação alcoólica.

Referências

- AL-ASSAF, S. et al. **The radiation chemistry of polysaccharides**. IAEA Library Cataloguing in Publication Data, 2016. v. 124
- ALCARDE, A. R. **Efeito da radiação gama em alguns parametros microbiologicos e bioquimicos da fermentação alcoolica**.
- ALEXANDRE, H.; CHARPENTIER, C. **Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must**. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 20, n. 1, p. 20–27, 1998.

ALVES, D. M. G. **Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica.** Universidade de São Paulo, 1994.

AMARANTE, J. O. **Vinhos e vinícolas do Brasil.** São Paulo. Summus Editorial Ltda, , 1986.

AMORIM, H. V.; LEÃO, R. M. **Fermentação alcoólica, ciência e tecnologia.** Piracicaba. FERMENTEC, 2005.

AQUARONE, E. Penicillin and tetracycline as contamination control agents in alcoholic fermentation of sugar cane molasses. *Applied microbiology*, v. 8, p. 263–268, 1959.

ATTFIELD, P. V. Stress tolerance: The key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nature Biotechnology*, v. 15, n. 13, p. 1351–1357, 1997.

AUESUKAREE, C. **Molecular mechanisms of the yeast adaptive response and tolerance to stresses encountered during ethanol fermentation.** *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2017.

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

BALAT, M.; BALAT, H. **Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel.** *Applied Energy*, v. 86, n. 11, p. 2273–2282, 2009.

BARROS, S.; WOODY, K. Corn Ethanol Production Booms in Brazil Usda.

BASÍLIO, A. C. M. et al. Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. *Current Microbiology*, v. 56, n. 4, p. 322–326, 2008.

BASSO, L. C. ; AMORIN, H. V. Habilidade fermentativa de leveduras isoladas do processo industrial. **Relatório Anual de Pesquisas em Fermentação Alcoólica**, v. 16, n. 01, p. 52–76, 1996.

BASSO, L. C. ; ALVES, D. M. G. ;; AMORIM, H. V. DE. The antibacterial action of succinic acid formation by yeast during fermentation. *Revista de Microbiologia*, v. 28, n. 1, p. 77–82, 1997a.

BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation. In: **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects.** Marco Aure ed. v. ip. 13.

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

BAYROCK, D. P.; MICHAEL INGLEDEW, W. Application of multistage continuous fermentation for production of fuel alcohol by very-high-gravity fermentation technology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 27, n. 2, p. 87–93, 2001.

BECKNER, M.; IVEY, M. L.; PHISTER, T. G. **Microbial contamination of fuel ethanol fermentations.** *Letters in Applied Microbiology*, v. 53, n. 4, p. 387–394, 2011.

BELINATO, J. R. et al. **Microbial metabolomics: Innovations and applications**. Quimica Nova, v. 42, n. 5, p. 546–559, 2019.

BELLISSIMI, E. et al. **Effects of acetic acid on the kinetics of xylose fermentation by an engineered, xylose-isomerase-based saccharomyces cerevisiae strain**. FEMS Yeast Research, v. 9, n. 3, p. 358–364, 2009.

BELLUCO, A. E. DE S.; ALCARDE, A. R. Cana e milho: métodos distintos convergem ao etanol. **Visão agrícola**.

BERTHELIS, N. J. et al. Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. **FEMS Yeast Research**, v. 4, n. 7, p. 683–689, 2004.

BERTOLINI, L. et al. Higher Alcohol Production by Cryotolerant *Saccharomyces* Strains. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 47, n. 3, p. 343–345, 1996.

BHAT, R.; KARIM ALIAS, A.; PALIYATH, G. Use of Electron Beams in Food Preservation. **In: Progress in Food Preservation**. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2012. v. 17p. 343–372.

BISSON, L. F. **STUCK AND SLUGGISH FERMENTATIONS**. University of California, Davis, 1999.

BORAAM, F. et al. Lactic acid bacteria and yeast associated with traditional Moroccan sour-dough bread fermentation. **Sciences des Aliments** (France), v. 13, n. 3, p. 501–509, 1993.

BORRELY, S. I.; DEL MASTRO, N. L.; SAMPA, M. H. O. Improvement of municipal wastewaters by electron beam accelerator in Brazil. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 52, n. 1–6, p. 333–337, 1998.

BOTHAST, R. J.; SCHLICHER, M. A. **Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol**. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 67, n. 1, p. 19–25, 2005.

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

CASEY, E. et al. **Effect of acetic acid and pH on the cofermentation of glucose and xylose to ethanol by a genetically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae***. FEMS Yeast Research, v. 10, n. 4, p. 385–393, 2010.

CHERTOW, M. R. “Uncovering” Industrial Symbiosis. **Journal of Industrial Ecology**, v. 11, n. 1, 2007.

CHERTOW, M. R. Industrial symbiosis: Literature and taxonomy. **Annual Review of Energy and the Environment**, v. 25, n. June, p. 313–337, 2000.

CHERUBIN, R. A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2003.

CHUM, H. L. et al. A comparison of commercial ethanol production systems from Brazilian sugarcane and US corn. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 6, n. 3, p. 246–256, 2013.

CRONWRIGHT, G. R.; ROHWER, J. M.; PRIOR, B. A. Metabolic control analysis of glycerol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 9, p. 4448–4456, 2002.

D'AMORE, T.; STEWART, G. G. **Ethanol tolerance of yeast. Enzyme and Microbial Technology**, v. 9, n. 6, p. 322–330, 1987.

DAY, W. H. et al. Antibiotics as Contamination-Control Agents In Grain Alcohol Fermentations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 2, n. 5, p. 252–258, 1954.

DE FREITAS, L. C.; KANEKO, S. Ethanol demand under the flex-fuel technology regime in Brazil. **Energy Economics**, v. 33, n. 6, p. 1146–1154, 2011.

DE OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Evaluation of bacterial contamination in a fed-batch alcoholic fermentation process. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 697–699, 1994.

DE SOUZA DIAS, M. O. et al. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. **Environmental Development**, v. 15, p. 35–51, 2015.

DELLA-BIANCA, B. E. et al. What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 3, p. 979–991, 2013.

DRA, P. et al. **Total De Células N. Microbiologia** (Madrid), p. 3–4, 2000.

EDWARDS, C. G. et al. Implication of Acetic Acid in the Induction of Slow/Stuck Grape Juice Fermentations and Inhibition of Yeast by *Lactobacillus* sp. **American Society for Enology and Viticulture**, v. 50, p. 204–210.

ENDO, A. et al. Genome-wide screening of the genes required for tolerance to vanillin, which is a potential inhibitor of bioethanol fermentation, in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 1, p. 1–6, 2008.

ENTIAN, K. D. Glucose repression: a complex regulatory system in yeast. **Microbiological sciences**, v. 3, n. 12, p. 366–371, dez. 1986.

FERREIRA, L. V. **Estudo da fermentação alcoólica em frascos agitados**. Universidade Estadual de Campinas, 2002.

FIRMINO, F. C. et al. Characterization of microbial communities in ethanol biorefineries. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 47, n. 2, p. 183–195, 2020.

GANCEDO, J. M. Yeast Carbon Catabolite Repression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 2, p. 334–361, 1998.

GAROMA, T.; BEN-KHALED, M.; BEYENE, A. Comparative resource analyses for ethanol produced from corn and sugarcane in different climatic zones. **International Journal Of Energy Research**, v. 33, n. 4, p. 23–40, 2012.

GENG, P.; ZHANG, L.; SHI, G. Y. Omics analysis of acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 5, p. 1–8, 2017.

GIANNATTASIO, S. et al. Molecular mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* stress adaptation and programmed cell death in response to acetic acid. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. FEB, p. 1–7, 2013.

GOLDEMBERG, J. **Ethanol for a sustainable energy future**. *Science*, v. 315, n. 5813, p. 808–810, 2007.

GRASSI, M. C. B.; PEREIRA, G. A. G. Energy-cane and RenovaBio: Brazilian vectors to boost the development of Biofuels. **Industrial Crops and Products**, v. 129, n. July 2018, p. 201–205, 2019.

GRAVES, T. et al. Effect of pH and lactic or acetic acid on ethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 6, p. 469–474, 2006.

GRAVES, T. et al. Interaction effects of lactic acid and acetic acid at different temperatures on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 5, p. 1190–1196, 2007.

GUTIERREZ, L. E.; AMORIM, H. V.; BASSO, L. C. **Inibidores da fermentação alcoólica**. Sociedade Dos Técnicos Açucareiros E Alcooleiros Do Brasil - STAB.

HANSEN, A. C.; ZHANG, Q.; LYNE, P. W. L. Ethanol-diesel fuel blends - A review. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 3, p. 277–285, 2005.

HEERDE, E.; RADLER, F. Metabolism of the anaerobic formation of succinic acid by *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Microbiology**, v. 117, n. 3, p. 269–276, 1978.

HENTGES, D. J. Influence of pH on the inhibitory activity of formic and acetic acids for *Shigella*. **Journal of bacteriology**, v. 93, n. 6, p. 2029–2030, 1967.

HOHMANN, S. An integrated view on a eukaryotic osmoregulation system. **Current Genetics**, v. 61, n. 3, p. 373–382, 2015.

HOHMANN, S.; MAGER, W. Yeast stress response. **Topics in Current Genetics**.

HUANG, Y.-C. et al. Relationship Between Sluggish Fermentations and the Antagonism of Yeast by Lactic Acid Bacteria. **American Society for Enology and Viticulture**, v. 47, p. 1–10.

HYNES, S. H. et al. Use of virginiamycin to control the growth of lactic acid bacteria during alcohol fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 284–291, 1997.

ISLAM, M.; TOLEDO, R.; HAMDY, M. K. Stability of virginiamycin and penicillin during alcohol fermentation. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 17, n. 5, p. 369–376, 1999.

JAMES E. RASMUSSEN, E. S. et al. Acetic Acid as a Causative Agent in Producing Stuck Fermentations. **American Society for Enology and Viticulture**, v. 46, n. 2, p. 278–280, [s.d.].

JÖNSSON, L. J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N.-O. New developments in microwave histoprocessing. **American Biotechnology Laboratory**, v. 21, n. 12, p. 40, 2003.

JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. **Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects**. *Bioresource Technology*, v. 199, p. 103–112, 2016.

KHACHATOURIANS, G. G. **Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria**. *Cmaj*, v. 159, n. 9, p. 1119, 1998.

KLEIN, M. et al. Glycerol metabolism and transport in yeast and fungi: established knowledge and ambiguities. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 878–893, 2017.

KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B.; AHRING, B. K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 1, p. 10–26, 2004.

KUBOTA, S. et al. Effect of ethanol on cell growth of budding yeast: Genes that are important for cell growth in the presence of ethanol. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 68, n. 4, p. 968–972, 2004.

L. BERTOLINI et al. Higher Alcohol Production by Cryotolerant *Saccharomyces* Strains. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 47, 1 jan. 1996.

LETÍCIA VECCHI. Produção de etanol de milho e seus subprodutos na alimentação de bovinos. Disponível em: <<https://www.scotconsultoria.com.br/noticias/artigos/49779/producao-de-etanol-de-milho-e-seus-subprodutos-na-alimentacao-de-bovinos.htm>>. Acesso em: 23 nov. 2021.

LI, F. et al. An innovative consecutive batch fermentation process for very high gravity ethanol fermentation with self-flocculating yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 6, p. 1079–1086, 2009.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de Etanol. In: BLUCHER, E. (Ed.). **Biocnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. v. 3.

LOPES, M. L. et al. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**. Elsevier Editora Ltda, , 1 dez. 2016.

LUDOVICO, P. et al. ***Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid**. *Microbiology*, v. 147, n. 9, p. 2409–2415, 2001.

MACEDO, I. C.; SEABRA, J. E. A.; SILVA, J. E. A. R. Green house gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, n. 7, p. 582–595, 2008.

MACEDO, L. C. H. **Álcool Etílico - Da Cachaça Ao Cereal**. ICONE ed.

- MAIORELLA, B. L.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. Economic evaluation of alternative ethanol fermentation processes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, n. 9, p. 1003–1025, 1984.
- MCCANN, A. K. et al. An unusual hexose-ATP-kinase with two catalytic sites and a role in carbon catabolite repression in the yeast *Schwanniomyces occidentalis*. **Journal of General Microbiology**, v. 133, n. 2, p. 381–389, 1987.
- MITCHELL, D. A.; BEROVIČ, M.; KRIEGER, N. Solid-State Fermentation Bioreactors. **Springer Berlin**, Heidelberg, 2006.
- MOLINS, R. A. Food Irradiation: Principles and Applications. **John Wiley & Sons**, 2001.
- MOLLAPOUR, M.; PIPER, P. W. Hog1p mitogen-activated protein kinase determines acetic acid resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 8, p. 1274–1280, 2006.
- MOREIRA, C. S. et al. Análise Dos Parâmetros Morfofisiológica De Linhagens De Leveduras Industriais Com Potencial Biotecnológico Para a Produção De Etanol. **Ciência e Natura**, v. 37, n. 3, 2015.
- MUSSATTO, S. I. et al. **Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production**. *Biotechnology Advances*, v. 28, n. 6, p. 817–830, 2010.
- MUTTON, M. J. R. et al. Interaction between the production of ethanol and glycerol in fed-batch bioreactors. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 389–394, 2019.
- NAGAMATSU, S. T. et al. Ethanol production process driving changes on industrial strains. **FEMS Yeast Research**, v. 21, n. 1, p. 1–10, 2021.
- NARENDRANATH, N. V. et al. Effects of lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 11, p. 4158–4163, 1997.
- NASTARI, P. M. Etanol de milho tem futuro no Brasil. **Agroanalysis**.
- NGANG, J. J. E. et al. Applied Microbiology Biotechnology Inhibition of beet molasses alcoholic fermentation by lactobacilli. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 33, p. 490–493, 1990.
- NISSEN, T. L. et al. Optimization of ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering of the ammonium assimilation. **Metabolic Engineering**, v. 2, n. 1, p. 69–77, 2000.
- NOBRE, T. D. E. P. Nobre, 2005.
- OMORI, T. et al. High glycerol producing amino acid analogue-resistant *Saccharomyces cerevisiae* mutant. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, n. 3, p. 218–222, 1995.
- OURA, E. Reaction Products of Yeast Fermentations. **Process Biochemistry**, v. 12, n. 3, p. 19–35, 1977.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 25–33, 2000.

PAMPULHA, M. E.; LOUREIRO-DIAS, M. C. Activity of glycolytic enzymes of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of acetic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 3, p. 375–380, 1990.

PAMPULHA, M. E.; LOUREIRO-DIAS, M. C. Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 5–6, p. 547–550, 1989.

PAMPULHA, M. E.; LOUREIRO-DIAS, M. C. Energetics of the effect of acetic acid on growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 184, n. 1, p. 69–72, 2000.

PANCHAL, C. J.; STEWART, G. G. **The Effect Of Osmotic Pressure On The Production And Excretion Of Ethanol And Glycerol By A Brewing Yeast Strain*** By. *J. Inst. Brew.*, v. 86, p. 207–210, 1980.

PEREIRA, F. B. et al. Cell recycling during repeated very high gravity bio-ethanol fermentations using the industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain PE-2. **Biotechnology Letters**, v. 34, n. 1, p. 45–53, 2012.

PIDDOCKE, M. P. et al. Physiological characterization of brewer's yeast in high-gravity beer fermentations with glucose or maltose syrups as adjuncts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 3, p. 453–464, 2009.

PIERCE, J. . The Committee approved the slide culture technique for measurement of yeast viability. When highly viable samples are under examination they recommend the methylene blue staining technique as an alternative rapid procedure. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 76, p. 442–443, 1970.

PODADERA, P. **Estudo das propriedades do açúcar líquido invertido processado com radiação gama e feixe de elétrons**. Universidade de São Paulo, 2007.

PONS, M. N.; RAJAB, A.; ENGASSER, J. M. Influence of acetate on growth kinetics and production control of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose and ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 193–198, 1986.

QIU, Z.; JIANG, R. Improving *Saccharomyces cerevisiae* ethanol production and tolerance via RNA polymerase II subunit Rpb7. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2017.

REIFENBERGER, E.; BOLES, E.; CIRIACY, M. Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. **European Journal of Biochemistry**, v. 245, n. 2, p. 324–333, 1997.

RELA, P. R. **Desenvolvimento De Dispositivo De Irradiação Para Tratamento De Efluentes Industriais Com Feixe De Elétrons**. Universidade de São Paulo, 2003.

RODRIGUES-POUSADA, C.; NEVITT, T.; MENEZES, R. **The yeast stress response.** v. 272

SCHIMZ, K. L.; HOLZER, H. Rapid decrease of ATP content in intact cells of *Saccharomyces cerevisiae* after incubation with low concentrations of sulfite. **Archives of Microbiology**, v. 121, n. 3, p. 225–229, 1979.

SICA, P. et al. Effects of energy cane (*Saccharum* spp.) juice on corn ethanol (*Zea mays*) fermentation efficiency: Integration towards a more sustainable production. **Fermentation**, v. 7, n. 1, 2021.

SKINNER, K. A.; LEATHERS, T. D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 401–408, 2004.

SONG, H.; LEE, S. Y. Production of succinic acid by bacterial fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 3, p. 352–361, 2006.

SWINNEN, S. et al. The fraction of cells that resume growth after acetic acid addition is a strain-dependent parameter of acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 4, p. 642–653, 2014.

THATIPAMALA; ROHANI, R. S.; HILL, G. A. Effects of high product and substrate inhibitions on the kinetics and biomass and product yields during ethanol batch fermentation. **Biotechnol Bioeng**, v. 40, n. 2, p. 289–97, 1992.

THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Effect of lactobacilli on yeast growth, viability and batch and semi-continuous alcoholic fermentation of corn mash. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 5, p. 819–828, 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**, v. 68, n. 4, p. 1616–1623, 2002.

WALKSMAN, S. A. **Microbial antagonism and antibiotic substances.** New York: The Commonwealth Fund, v. 64, n. 5, p. 433, 1947.

WATERS, P. et al. Influence of the metabolic state on the tolerance of *Pichia kudriavzevii* to heavy metals. **Quimica Nova**, v. 16, n. 4, p. 1–4, 2016.

YAZDANI, S. S.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 213–219, 2007.

ZABED, H. et al. Bioethanol production from fermentable sugar juice. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

ZAMORA, F. Wine chemistry and biochemistry. **In: POLO, M. C. (Ed.).** Wine Chemistry and Biochemistry. Tarragona: p. 1–735.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O mosto misto juntamente com o método de esterilização por feixe de elétrons, surge para suprir a necessidade dos processos, otimizando pra maiores rendimentos, economia e sustentabilidade. O qual possibilita o biorrefinamento sendo essencial para o aprimoramento da Economia Circular, integrando aspectos socioeconômicos e ambientais, além do bem-estar da comunidade. Com base nisso e em tudo discutido nos capítulos apresentados neste trabalho, concluimos que:

- i. Leveduras utilizadas tradicionalmente em fermentação a partir de hidrolisado de milho, adaptam-se melhor ao mosto misto;
- ii. A contaminação bacteriana afeta negativamente a fermentação do mosto misto e seus parâmetros fermentativos, consumo dos carboidratos, como a produção de glicerol refletindo na viabilidade celular em mosto misto, elaborado a partir de milho e caldo de cana-de-açúcar.