

EFEITOS DA VIABILIDADE DA LEVEDURA E DA CONTAMINAÇÃO
BACTERIANA NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

RUDIMAR ANTONIO CHERUBIN

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”,
Universidade de São Paulo, para a
obtenção do título de Doutor em
Agronomia, Área de Concentração:
Microbiologia Agrícola.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Fevereiro – 2003

EFEITOS DA VIABILIDADE DA LEVEDURA E DA CONTAMINAÇÃO
BACTERIANA NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

RUDIMAR ANTONIO CHERUBIN

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. LUIZ CARLOS BASSO

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz",
Universidade de São Paulo, para a
obtenção do título de Doutor em
Agronomia, Área de Concentração:
Microbiologia Agrícola.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Fevereiro - 2003

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

Cherubin, Rudimar Antonio

Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica / Rudimar Antonio Cherubin. - - Piracicaba, 2003.

124 p.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2003.
Bibliografia.

1. Contaminação bacteriana 2. Fermentação alcoólica 3. Levedura
- viabilidade I. Título

CDD 663.13

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

À minha família, dedico

À Ana Paula, ofereço.

AGRADECIMENTOS

Expresso a minha gratidão às pessoas e instituições que contribuíram para a concretização deste trabalho, em especial:

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Basso pela orientação, apoio, confiança, amizade e exemplo profissional e humano.

Ao Curso de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela minha formação acadêmica

À CAPES pela bolsa de estudos e apoio financeiro que permitiram a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Pedro Oliva-Neto pelas sugestões e pela disposição em compartilhar informações e o seu conhecimento.

À equipe técnica do Laboratório: Admir de Campos e Luiz Lucatti e aos colegas, Eder, Mariana Dallaqua, Caminila Cartes, Vanessa Gomes, Juliana Travaigli que foram imprescindíveis durante a execução dos trabalhos práticos.

Aos colegas Silene Paulillo, Samuel M. Gislou da Silva, Rodrigo Carvalho, Fábio Patrick de Freitas, Denise Alves, Denise Aranha e Carlos Eduardo Garcia pelas sugestões e troca de informações e apoio.

Aos Profs. Dr. Antonio Joaquim de Oliveira e Dr. Henrique Viana Amorim pelas sugestões, apoio, e ensinamento compartilhados

À Fermentec S/C Ltda pelo auxílio financeiro destinado a pesquisa.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	ix
SUMMARY.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Importância da Contaminação Bacteriana.....	3
2.2 Principais Espécies de Bactérias Contaminantes em Destilarias.....	5
2.3 Características Morfológicas e Citológicas de <i>L. fermentum</i>	6
2.4 Efeitos da presença de bactérias em Fermentações Industriais.....	8
2.5 Uso de Inibidores na Fermentação Alcoólica.....	11
2.6 Alguns indicadores de estresse na levedura	12
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Determinação de Etanol nos Vinhos Delevurados.....	15
3.2 Determinação de Açúcares nos Caldos, Melaços e Vinhos Delevurados e Glicerol em Vinhos Delevurados.....	15
3.3 Determinação do pH dos Vinhos.....	16
3.4 Determinação do Teor de Levedura nos Vinhos.....	16
3.5 Determinação de Trealose na Levedura.....	16
3.6 Determinação da Viabilidade Celular de Levedura.....	17
3.7 Contagem de Bactérias em Microscópio Ótico.....	17
3.8 Preparo da Solução de Água Peptonada.....	17
3.9 Preparo da Solução de Actidiona.....	18
3.10 Linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	18
3.11 Manutenção das Linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	19
3.12 Preparo do Mosto de Multiplicação de Levedura.....	19

3.13	Multiplicação das Linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	20
3.14	Preparo dos Mostos de Fermentação.....	21
3.15	Bactéria.....	22
3.16	Meio de Cultivo Para Multiplicação e Plaqueamento da Bactéria.....	22
3.17	Solução de Leite Desnatado.....	23
3.18	Manutenção da Cultura Bacteriana.....	24
3.19	Multiplicação da Bactéria.....	24
3.20	Preparo do Inóculo Bacteriano.....	25
3.21	Estimativa da População Bacteriana no Inóculo.....	25
3.22	Microplaqueamento em gotas.....	25
3.23	Cálculo do rendimento fermentativo.....	27
3.24	Delineamento Estatístico.....	28
3.25	Condução dos Experimentos de Fermentação.....	28
3.26	Análises microbiológicas Realizadas durante os ciclos fermentativos.....	29
3.27	Experimento comparativo entre duas metodologias de plaqueamento.....	30
3.27.1	Plaqueamento de cultura de <i>L. fermentum</i> CCT 1407 (Amostra A).....	30
3.27.2	Plaqueamento da cultura mista de <i>S. cerevisiae</i> e <i>L. fermentum</i> CCT 1407 em mosto de fermentação (amostra B).....	30
3.28	Experimentos de fermentação em ciclos fermentativos com as linhagens Fleischmann e PE-2 de <i>S. cerevisiae</i> em Cultura mista com <i>L. fermentum</i> CCT 1407.....	31
3.29	Procedimentos.....	31
3.30	Experimento de fermentação durante 6 ciclos em cultura mista de <i>L. fermentum</i> CCT 1407 com as linhagens Fleischmann e PE-2 de <i>S. cerevisiae</i> submetidas a estresse térmico.....	33
3.31	Procedimentos.....	33
3.32	Efeitos da Contaminação Bacteriana Durante 6 Ciclos Fermentativos Com as Linhagens M-26 e PE-2 de <i>S. cerevisiae</i> Quando em Cultura	

Mista com <i>L. fermentum</i> CCT 1407.....	34
3.33 Procedimentos.....	35
4 RESULTADOS	37
4.1 Plaqueamentos de Cultura de <i>L. fermentum</i> CCT 1407 (Amostra A) e de Cultura Mista de <i>S. cerevisiae</i> e <i>L. fermentum</i> CCT 1407 (amostra B).....	37
4.2 Experimento de Fermentação em Reciclos Fermentativos Com as Linhagens Fleischmann e PE-2 de <i>S. cerevisiae</i> em Cultura Mista Com <i>L. fermentum</i> CCT 1407.....	39
4.3 Experimento de fermentação durante 6 reciclos em cultura Mista de <i>L. fermentum</i> CCT 1407 com as Linhagens Fleischmann e PE-2 de <i>S. cerevisiae</i> submetidas a estresse térmico.....	48
4.4 Experimento comparativo entre as linhagens PE-2 e M-26 de <i>S. cerevisiae</i> em cultura pura e em cultura mista com a Bactéria <i>L. fermentum</i> CCT 1407 durante 6 reciclos fermentativos.....	57
5 DISCUSSÃO.....	67
5.1 Plaqueamentos de Cultura de <i>L. fermentum</i> CCT 1407 (Amostra A) e de Cultura Mista de <i>S. cerevisiae</i> e <i>L. fermentum</i> CCT 1407 (amostra B).....	67
5.2 Experimentos de Fermentação em Reciclos Fermentativos.....	68
5.2.1 Experimento de Fermentação em Reciclos Fermentativos Com as Linhagens Fleischmann e PE-2 de <i>S. cerevisiae</i> em Cultura Mista Com <i>L. fermentum</i> CCT 1407.....	73
5.2.2 Experimento de Fermentação Durante 6 Reciclos em Cultura Mista de <i>L. fermentum</i> CCT 1407 Com as Linhagens Fleischmann e PE-2 de <i>S. cerevisiae</i> Submetidas a Estresse Térmico.....	76
5.2.3 Experimento Comparativo Entre as Linhagens PE-2 e M-26 de <i>S. cerevisiae</i> em Cultura Pura e em Cultura Mista com a Bactéria <i>L. fermentum</i> CCT 1407 Durante 6 Reciclos Fermentativos.....	79
6 CONCLUSÕES.....	82
ANEXOS.....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116

EFEITOS DA VIABILIDADE DA LEVEDURA E DA CONTAMINAÇÃO BACTERIANA NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Autor: RUDIMAR ANTONIO CHERUBIN

Orientador: Prof. Dr. LUIZ CARLOS BASSO

RESUMO

O presente estudo relata a avaliação da metodologia de microplaqueamento em gotas como uma forma alternativa para contagem da bactéria *Lactobacillus fermentum* CCT 1407 em cultura isolada, ou em cultura mista com *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando o meio de cultivo MRS e actidiona como inibidor da levedura. A análise dos resultados revelou que a metodologia de microplaqueamento em gotas foi equivalente ao plaqueamento em profundidade, o qual é a metodologia rotineiramente utilizada. Este trabalho também relata o comportamento das linhagens Fleischmann, PE-2 e M-26 quando em cultivo misto com a bactéria *L. fermentum* CCT 1407 durante seis ciclos fermentativos realizados com mosto composto de 30% de melão e 70% caldo de cana, incubados à temperatura de 32 °C. Foi utilizada a análise de variância para analisar as variáveis e análise sob o esquema parcelas subdivididas no tempo em delineamento blocos ao acaso. Os resultados obtidos mostram que ocorreram reduções de viabilidade nos tratamentos realizados com a linhagem Fleischmann promovendo um estímulo à multiplicação bacteriana, porém, os tratamentos com a linhagem PE-2 apresentaram menores

reduções de viabilidade e o estímulo à multiplicação bacteriana foi menor. Ao comparar a o comportamento das linhagens M-26 e PE-2 durante a fermentação em cultivo misto com *L. fermentum* CCT 1407 não houve diferença estatística significativa, através do teste F, para os seguintes parâmetros: viabilidade celular, rendimento fermentativo, teor alcoólico, massa microbiana e glicerol, sendo detectada diferença significativa para os parâmetros contaminação bacteriana e pH do vinho delevurado. Para o início do experimento comparativo entre as linhagens M-26 e PE-2 foi inoculada a bactéria ($1,5 \cdot 10^6$ UFC.mL⁻¹) e ao final do sexto ciclo as contaminações foram $3,3 \cdot 10^7$ UFC.mL⁻¹ e $6,0 \cdot 10^7$ UFC.mL⁻¹ nos tratamentos realizados com as linhagens M-26 e PE-2, respectivamente. O aumento da contaminação bacteriana estimulou a formação de glicerol. O teor de trealose apresentou relação positiva com a viabilidade sendo considerado um indicador das condições fisiológicas da levedura, independentemente da linhagem avaliada.

EFFECTS OF VIABILITY of YEAST AND BACTERIAL
CONTAMINATION IN ALCOHOLIC FEMENTATION
Saccharomyces cerevisiae

Author: RUDIMAR ANTONIO CHERUBIN

Adviser: Prof. Dr. LUIZ CARLOS BASSO

SUMMARY

The present study reports the evaluation of pour plate method in drops as an alternative to count the bacteria *L. fermentum* CCT 1407 in isolated culture, or in mixed culture with *Saccharomyces cerevisiae*, using the means of cultivation MRS and actidiona as inhibitor of yeast. The analysis of the results revealed that the pour plate method was equivalent to the in depth plate method, which is the methodology most commonly used. This study also presents the behavior of the strain Fleischmann, PE-2 and M-26 when in mixed culture with the bacteria *L. fermentum* CCT 1407 for six fermentative re cycles accomplished with composed must of 30% of molasses and 70% cane broth, incubated to the temperature of 32 °C. The variance analysis was used to analyze the variables. The obtained results show viability reductions in the treatments accomplished with the strain Fleischmann promoting bacterial multiplication, even so, the treatments with the strain PE-2 presented smaller viability reductions and the incentive to the bacterial multiplication was also smaller. When comparing the behavior of the both strains, M-26 and PE-2, during the fermentation in mixed

cultivation with *L. fermentum* CCT 1407 there was no significant statistical difference, according to the results of the test F, for the following parameters: cellular viability, fermentative output, alcohol content, microbial mass, and glycerol. Significant difference was just detected for the parameters of bacterial contamination and pH of the wine. For the beginning of the first fermentative cycle it was inoculated $1,5 \cdot 10^6$ UFC.mL⁻¹ and at the end of the sixth cycle the contamination was $3,3 \cdot 10^7$ UFC.mL⁻¹ and $6,0 \cdot 10^7$ UFC.mL⁻¹ in the treatments accomplished with the strains M-26 and PE-2, respectively. The increase of bacterial contamination stimulated the glycerol formation and the trehalose content-presented positive relationship with the viability being considered an indicator of the physiologic conditions of the yeast, regardless the appraised yeast strains.

1 INTRODUÇÃO

Durante a fermentação alcoólica, etapa do processo de produção de álcool etílico, as leveduras convertem os açúcares presentes no substrato em etanol e gás carbônico. Nesta fase podem ocorrer vários problemas entre os principais merece destaque a contaminação bacteriana.

Devido à temperatura, acidez, concentração de açúcares e de nutrientes, entre outros fatores, que ocorrem durante a fermentação alcoólica há o desenvolvimento de muitos microrganismos como bactérias e várias espécies de leveduras, além da *Saccharomyces cerevisiae* que passam a considerados contaminantes.

Os processos industriais de produção de álcool existentes no Brasil reutilizam o fermento em ciclos fermentativos consecutivos. Durante o processo de centrifugação os microrganismos contaminantes também são reciclados juntamente com o fermento e agravam os problemas associados com a contaminação bacteriana.

Dependendo do nível de contaminação bacteriana podem ser ocasionados problemas como: deterioração da cana, aumento da floculação, redução da viabilidade da levedura, redução de massa de fermento e a formação de produtos indesejáveis que ocasionam consumo de sacarose e de outros nutrientes presentes no mosto. Níveis elevados de contaminação também provocam muitos inconvenientes operacionais, como a dificuldade de centrifugação, aumento do uso de ácido no tratamento de fermento, aumento do tempo de fermentação e elevação de açúcares não fermentados que levam a reduções no rendimento da fermentação alcoólica.

Devido a constante presença de contaminantes durante o processo fermentativo é importante o conhecimento de fatores que possibilitem a

redução dos problemas causados pela contaminação bacteriana, além das práticas usuais de tratamento ácido do creme de levedura e de aplicação de antibióticos.

Para este trabalho foram escolhidas 3 linhagens da levedura *S. cerevisiae*. A linhagem Fleischmann é considerada uma levedura de panificação, comercializada em supermercados, padarias e doçarias. A linhagem PE-2 é comercializada na forma desidratada e utilizada em processos industriais de produção de etanol. A linhagem M-26 também foi isolada de processos industriais e está sendo avaliada por outros grupos de trabalho. Pesquisas anteriores detectaram diferenças fisiológicas entre as linhagens citadas e agora foi avaliada a possibilidade dessas linhagens afetarem com intensidade diferente a contaminação bacteriana durante ciclos fermentativos realizados simulando, na medida do possível, as condições industriais.

O presente projeto teve como objetivos:

- ❖ Avaliar uma metodologia alternativa para a contagem de *Lactobacillus fermentum* CCT 1407 em cultivo misto com *Saccharomyces cerevisiae*.
- ❖ Avaliar a influência de diferentes viabilidades de *S. cerevisiae* sobre a contaminação com *Lactobacillus fermentum* CCT-1407 durante ciclos fermentativos;
- ❖ Avaliar a existência de algum efeito inibidor exercido pelas diferentes linhagens de *S. cerevisiae* sobre a multiplicação da bactéria *L. fermentum* CCT-1407 durante ciclos fermentativos;
- ❖ Determinar os efeitos causados pela presença da bactéria *L. fermentum* CCT 1407 durante ciclos fermentativos em cultura mista realizados.

Os parâmetros analisados foram o rendimento fermentativo, teor alcoólico, concentração de glicerol, trealose e açúcares residuais (somatória de glicose e frutose) nos vinhos, pH do vinho delevurado, velocidade de fermentação, viabilidade celular da levedura, taxa de brotamento da levedura, massa de levedura e a multiplicação bacteriana durante os ciclos fermentativos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMPORTÂNCIA DA CONTAMINAÇÃO BACTERIANA

A presença de microrganismos no processamento de cana-de-açúcar ocorre desde a lavoura até o setor de fermentação, sendo que a contaminação bacteriana presente no caldo de cana e no mosto pode refletir a qualidade da matéria-prima utilizada pois, tanto o caldo de cana quanto o mosto são ótimos substratos para o crescimento de microrganismos devido aos teores de nutrientes orgânicos e inorgânicos, alta atividade de água, pH, além da temperatura que ocorrem nos processos industriais de fermentação. (Gallo, 1990 e Gallo & Canhos, 1991).

Os maiores prejuízos causados pela contaminação bacteriana são a degradação da sacarose e a formação dos ácidos láctico e acético que ocasionam perda de açúcar e intoxicação das leveduras (Oliva-Neto & Yokoya, 1997; Frederick, 1994). Os contaminantes bacterianos presentes nas linhas de caldo, causam perdas de sacarose que variam de 1 Kg.ton⁻¹ de cana quando as condições são satisfatórias até 2,5Kg.ton⁻¹ de cana quando não são adequadas (Yokoya, 1989).

Tilbury et al¹ citado por Gallo (1991) relatam que estudos realizados no Reino Unido, na Índia e na África do Sul indicam que 13 % das perdas causadas pela contaminação bacteriana é devido à inversão, 25 % à atividade de enzimas livres e 62 % ao crescimento bacteriano nas moendas. Yokoya (1989) enfatiza que é possível reduzir entre 17 e 35 % das perdas de

¹ TILBURY et al. Mill sanitation: a fresh approach to biocide evaluation. In: Proc. XVI Congress International Society of Sugar Cane Technology. V, 16., 1977. Proceedings p. 2749-2768.

sacarose devido às conseqüências da presença de microrganismos contaminantes apenas com o uso de práticas adequadas de limpeza e uso correto de agentes antimicrobianos.

Oliva-Neto & Yokoya (1994) encontraram uma relação negativa causada pela presença de *L. fermentum* durante a fermentação alcoólica em processo de batelada alimentada. Através da comparação dos resultados apresentados do 2º e do 17º ciclo fermentativo, foi registrada elevação da contaminação de $1,2 \cdot 10^9$ UFC.mL⁻¹ para $2,3 \cdot 10^9$ UFC.mL⁻¹, houve redução no teor alcoólico no vinho final, o rendimento fermentativo foi reduzido de 92 % para 49 % e a acidez elevou-se de 3,4 g.L⁻¹ para 6,2 g.L⁻¹.

A redução no rendimento fermentativo devido a presença de bactérias lácticas é óbvia pois, quando uma molécula de glicose é convertida em duas de ácido láctico resulta em duas moléculas de etanol que deixaram de serem produzidas pela levedura (Narendranath, 1994). Além disso, cabe citar, muitos nutrientes são desviados para a multiplicação bacteriana e deixam de ser aproveitados pela levedura.

Outro problema causado pela presença de bactérias contaminantes em processos de fermentação alcoólica é a floculação, que ocasiona redução na velocidade de fermentação, além de inconvenientes como entupimento de tubulações, aumento de fundo de dorna, dificuldades de operação das centrífugas devido ao entupimento dos bicos (Serra et al., 1979; Yokoya, 1989; Yokoya & Oliva-Neto, 1991). Além disso, constata-se que a floculação também dificulta o tratamento ácido de creme de levedura, reduz a eficiência das centrífugas e dos antibióticos comumente utilizados.

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

2.2 PRINCIPAIS ESPÉCIES DE BACTÉRIAS CONTAMINANTES EM DESTILARIAS

Durante o processo industrial de produção de etanol ocorre a sobrevivência de microrganismos após o tratamento térmico do caldo, fato que proporciona a contaminação do mosto desde a saída do decantador, passando pelos trocadores de calor, até a chegada às dornas de fermentação, onde há um expressivo aumento da população bacteriana (Alcarde, 1995).

O pH relativamente baixo dos caldos das moendas favorece o crescimento de espécies consideradas acidófilas de gêneros como *Leuconostoc* e *Lactobacillus* (Tilbury et al., 1975). Por outro lado, em outras etapas, as altas temperaturas associadas ao pH favorecem alguns microrganismos termófilos esporulados (MacMaster & Ravno, 1975)

Bactérias dos gêneros *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Leuconostoc* e *Streptococcus* são os contaminantes mais atuantes e geralmente associados aos fracassos da fermentação alcoólica devido à formação de ácido lático e outros ácidos orgânicos, além de estarem associados a floculação (Amorim & Oliveira, 1982; Serra et al., 1979).

Rondini (1985) pesquisou amostras de vinho de dornas em final de fermentação e identificou como as principais bactérias contaminantes presentes: *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. brevis*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Lactobacillus* sp, *Micrococcus lylae*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Planococcus* sp.

Rosales (1989) isolou e identificou microrganismos de amostras de fermento centrifugado, fermento tratado com ácido sulfúrico, mosto, vinho inicial e vinho final proveniente de destilarias e identificou as principais bactérias contaminantes do processo: *Lactobacillus* sp (45,0 %), *Leuconostoc mesenteroides* (14,4 %), *Bacillus* sp (9,5 %), *Acetobacter* sp (7,4 %), *Enterobacter* sp (6,7 %), *Sporolactobacillus* sp (3,6 %), *Micrococcus varians* (1,8 %), *Staphilococcus* sp (1,3 %), *Pseudomonas fluorescens* (1,3 %), *Escherichia coli* (1,3 %), e *Citrobacter* sp (0,5 %).

Segundo Gallo (1990), a contaminação bacteriana predominante e identificada nas amostragens em processos industriais de fermentação alcoólica

mostrou-se Gram-positiva (98,5 %), em forma de bastonetes (85,3 %) e não esporulantes (73,9 %). Os gêneros mais freqüentes nas amostragens foram *Lactobacillus* (59,7 %) e *Bacillus* (26,6 %). Em relação às espécies predominantes destacaram-se *B. coagulans* (15,1 %), *L. fermentum* (15,0 %), *L. helveticus* (14,1 %), *B. stearothermophilus* (6,9 %), *L. plantarum* (5,7 %), *L. animalis* (4,5 %), *L. buchneri* (3,8 %)

Oliva-Neto (1990) realizou análises em amostras de leite de levedura sem tratamento ácido e identificou as espécies predominantes e relatou a presença de *L. fermentum* (62 %), *L. murinus* (9 %), *L. vaccinostercus* (9 %), *L. plantarum* (2 %) e *Leuconostoc* sp (2 %).

A maioria dos trabalhos identificou e tornou evidente a predominância de bactérias Gram-positiva e em forma de bastonetes no processo industrial de fermentação alcoólica com destaque para os gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus* e as espécies *L. fermentum* e *L. helveticus*. Outro microrganismo contaminante com relevante importância, principalmente na produção de açúcar, é o *B. stearothermophilus* pois, a sua resistência ao tratamento térmico dificulta a eliminação durante o processamento.

2.3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E CITOLÓGICAS DE *L. FERMENTUM*

Normalmente o gênero *Lactobacillus* é caracterizado por microrganismos fastidiosos, que exigem substratos complexos com nucleotídeos, aminoácidos, carboidratos e vitaminas, com destaque para pantotenato de cálcio, niacina e tiamina. Desenvolve-se em meio ligeiramente ácido, com pH entre 4,4 e 6,4 e em condições microaerófilas e anaeróbias. Em muitos casos, seu crescimento é estimulado na presença de até 5% de dióxido de carbono. Não possui o ciclo de Krebs e a cadeia respiratória clássica, fator limitante para ambientes com baixas concentrações de oxigênio (Kandler & Weiss, 1986). Com base no metabolismo do gênero foram definidos três grupos, que são:

- ❖ Homofermentativos obrigatórios; através da via Embden-Meyerhof convertem 1 mol de hexoses em 2 moles de ácido láctico e não fermentam pentoses ou glucanato.
- ❖ Heterofermentativos facultativos; realizam fermentação de forma semelhante ao grupo homofermentativo, contudo, algumas espécies produzem outros ácidos em condições limitantes de glicose. Convertem pentoses em ácido láctico e acético via fosfoctolase indutível.
- ❖ Heterofermentativos obrigatórios: convertem 1 mol de hexoses em 1 mol de CO₂, 1 mol de etanol ou de ácido acético, e 1 mol de ácido láctico através da via 6-fosfogluconato. Pentoses são convertidas a ácido láctico e acético.

Segundo Chassy & Thompson (1983) a espécie *L. fermentum* captura sacarídeos e oligossacarídeos com a ajuda de permeases específicas transformando-os em monossacarídeos e são então fosforilados.

Narendranath et al. (1994), citam que as espécies de bactérias lácticas consideradas contaminantes de processos fermentativos de produção de combustível, ou de bebidas alcoólicas destiladas, são tolerantes a temperaturas elevadas, baixo pH e apresentam habilidade de desenvolvimento rápido e comportamento não fastidioso.

Oliveira et al. (1995) referem-se à espécie *L. fermentum* como sendo bastonetes de 0,5 a 0,9 µm de largura e comprimento bastante variável, apresentam-se isolados e aos pares, Gram-positivos, não esporulados e raramente com motilidade. Também apresenta as seguintes características fisiológicas: são anaeróbios facultativos, heterofermentativos, apresentam catalase negativa, com temperatura ótima entre 30 °C e 40 °C e pH ótimo na faixa de 5,5 a 5,9.

Linhagens de *L. fermentum* já foram isolados de produtos lácteos, massas azedas, substratos vegetais em fermentação, vinhos, silagens, água de esgoto e bocas e fezes de ratos e humanos. A espécie *L. fermentum* compreende muitas linhagens e a maior parte delas fermenta frutose, galactose, glicose, gluconato, lactose, maltose, manose, melibiose, rafinose,

ribose e sacarose, porém determinadas espécies também fermentam arabinose, celobiose, trealose e xilose (Kandler e Weiss, 1986).

Guchte (2002) relata que o efeito do ácido láctico sobre a própria bactéria não é conhecido em detalhes, mas é aceito que ocorre a difusão passiva e que o acúmulo intracelular reduz o pH intracelular e então afeta a permeabilidade da membrana. A proporção de ácidos graxos presentes na membrana plasmática da bactéria determina a sua resistência aos estresses causados pela presença de ácidos.

2.4 EFEITOS DA PRESENÇA DE BACTÉRIAS EM FERMENTAÇÕES INDUSTRIAIS.

Durante a fermentação alcoólica ocorrem várias interações entre leveduras e bactérias e muitas pesquisas são realizadas para esclarecer melhor essas interações, principalmente a inibição exercida pelas bactérias sobre o desenvolvimento de leveduras.

As bactérias lácticas exercem um efeito inibidor sobre a levedura em função da pressão osmótica exercida pela presença de ácido láctico no meio de cultivo. O autor cita ainda que a fermentação exerce ação inibidora ao crescimento bacteriano e reduzem os problemas causados pelo ácido láctico (Ngang et al., 1989).

Walker (1988) cita que muitas espécies de bactérias são capazes de secretar inibidores, em especial o *Streptomyces* spp que produz ciclohexamida, cloranfenicol e nistatina, entre outros compostos, e que são utilizados em medicamentos para inibir o crescimento de leveduras.

Quadri (2002) relatou que bactérias lácticas produzem peptídeos com a função de executar a comunicação célula-célula e exercer atividade antimicrobiana. Esta forma de inibição torna evidente que ainda temos muito para conhecer da interação existente entre leveduras e bactérias lácticas.

A contaminação bacteriana é considerada a maior causa da redução na produção de etanol durante a fermentação de meio amiláceos, de

uísque escocês e de mosto de cana, por *S. cerevisiae*. O estímulo no desenvolvimento do *Lactobacillus* sp quando em cultura mista é devido à excreção de nutrientes, da levedura para o meio, como adenina, guanina, ácido aspártico e nicotínico, triptofano, glicina, alanina e lisina (Narendranath et al., 1997,; Chin & Ingledew, 1994).

Oliva-Neto (1997) pesquisou o desenvolvimento de três linhagens de *L. fermentum*, contaminantes isolados de destilarias brasileiras, em meios de cultivo com diferentes composições em aminoácidos e em cultura mista com *S. cerevisiae*. A análise dos resultados demonstrou que uma das linhagens estudadas não se desenvolveu na ausência de algum dos seguintes aminoácidos: fenilalanina, alanina, ácido glutâmico, cistina, prolina, histidina, arginina, treonina, triptofano, serina e metionina. Também evidenciou que todas as linhagens testadas não se desenvolveram em meios ausentes dos aminoácidos leucina, isoleucina e valina, porém todas as linhagens desenvolveram-se quando em cultura mista com a levedura. Portanto, o estímulo ao desenvolvimento bacteriano também é causado pela liberação de aminoácidos e a presença de aminoácidos no meio fermentativo pode ser causada pela autólise das células de leveduras. O desenvolvimento bacteriano é favorecido nos estágios finais do ciclo fermentativo (Oliva-Neto, 1995).

Nang et al. (1992) estudaram a estimulação no desenvolvimento de *L. casei* em cultura mista com *S. cerevisiae* em meio de melaço de beterraba e relataram que o estímulo também ocorre principalmente devido à hidrólise da sacarose em hexoses proporcionando maior facilidade de assimilação dos carboidratos pela bactéria.

Serra et al. (1980) avaliaram as condições de controle de fermentação e determinaram que há uma correlação positiva entre a viabilidade da levedura e o rendimento fermentativo, mostrando a necessidade de controle sobre os fatores que influem na viabilidade celular.

Segundo Oliva-Neto (1995) o controle bacteriano na produção de etanol é imprescindível, pois eleva o custo do produto, portanto justifica-se a necessidade de conhecer os fatores que estimulam a multiplicação bacteriana

durante o processo fermentativo, além de buscar novas tecnologias menos onerosas para o controle do contaminante na fermentação alcoólica.

Na tentativa de controle dos contaminantes da fermentação alcoólica, diversas práticas envolvendo a utilização de agentes antimicrobianos são utilizadas, sendo que a aplicação de ácido sulfúrico no preparo de pé-de-cuba é a prática mais utilizada e possibilita reduções de até 44,56 % na população de bactérias contaminantes (Gallo, 1990). O ácido sulfúrico é largamente utilizado pois além de custo relativamente reduzido também reduz a floculação melhorando a concentração do creme de levedura nas centrifugas

Thomas, et al. (2001) pesquisaram o efeito da cultura mista com *L. fermentum* durante 6 ciclos de fermentação em batelada de mosto a base de milho e relataram que a presença da bactéria ocasionou decréscimo na produção de etanol, aumento do desvio de carboidratos para a produção de glicerol e ácido láctico, queda acentuada da viabilidade da levedura, redução na formação de massa celular de levedura e inibição no desenvolvimento da bactéria. Os autores concluíram que a inibição exercida pela levedura sobre o *L. fermentum* ocasionou redução da formação de ácido láctico e acético pela bactéria. Também relatam que a levedura foi capaz de exercer antibiose suficiente sobre a bactéria para reduzir a contaminação bacteriana.

Ferguglia (1997) relatou queda de 97 % na viabilidade de *S. cerevisiae* após 12 h em cultura mista com *L. fermentum*. Estudando a viabilidade da levedura com adições de cultura da bactéria inativada por autoclavagem (120 °C durante 15 min) relatou redução de 55 % na viabilidade da levedura após 12 h e 98 % após 30 h. Ao analisar os resultados destaca-se a acentuada queda na viabilidade da levedura, entretanto, o autor não detalha o nível de contaminação ao qual a levedura foi exposta.

Os estudos realizados com culturas mistas freqüentemente relatam a ocorrência de reduções e restrições no desenvolvimento da levedura e um estímulo no crescimento das bactérias, porém poucos estudos foram realizados para avaliar os efeitos ocasionados pela atividade da levedura, ou da fermentação alcoólica sobre a atividade da bactéria.

2.5 Uso de Inibidores na Fermentação Alcoólica

A ação inibidora do ácido benzóico na multiplicação da levedura pode ser explicada pela competição com o acetil pela coenzima-A, reduzindo assim a formação de acetil-coenzima-A e bloqueando a atividade da carboxilase pirúvica. Dessa forma, os processos que envolvem a utilização da acetil-coenzima-A ficam prejudicados e ocorre redução na síntese de compostos como os ácidos alfacetoisocapróico, succínico, oxaloacético, aspártico, da leucina e treonina e dos álcoois isoamílico n-propílico (Griffith, 1989 e Gutierrez 1991).

Basso et al. (1997) pesquisaram o uso de $1,2 \text{ mmol.L}^{-1}$ de ácido benzóico em três unidades industriais produtoras de etanol a partir de substrato industrial (caldo de cana e melaço) e constataram aumento na produção de etanol e redução de glicerol e ácido succínico, bem como elevação da contaminação bacteriana. A contaminação foi elevada e inviabilizou o uso industrial do sal pois o aumento no rendimento fermentativo foi relativamente inferior ao aumento de custos, devido à necessidade do uso de antibióticos. Dessa forma, pesquisaram o efeito inibidor de 600 mg.L^{-1} de ácido succínico sobre 11 espécies de bactérias Gram-positivas contaminantes e avaliaram a ação inibidora sobre as espécies estudadas (Tabela 1).

Os autores justificam que a ação inibidora da Fermentação foi exercida não apenas pela acidificação do meio causada pelo ácido orgânico excretado para o meio, mas pelo próprio ânion succinato e ao seu efeito sinérgico com o etanol. Outra ação antibacteriana demonstrada pelo tratamento pode ser atribuída à rápida utilização dos nutrientes pelas leveduras (Basso et al., 1997).

Tabela 1. Ação antibacteriana de seis tratamentos sobre a multiplicação bacteriana após 12 h de incubação a 30 °C. A população bacteriana foi composta com 11 espécies de bactérias Gram-positivas contaminantes de processos fermentativos.

Tratamentos	Inicial		Final		Inibição (%)
	(10 ⁶ .mL ⁻¹)	PH	(10 ⁶ .mL ⁻¹)	pH	
Controle	4	5,00	185	3,11	0
Fermentação	4	5,00	3	3,67	98
Controle de pH (ácido sulfúrico)	4	3,54	107	2,93	42
Ácido succínico (600 mg.L ⁻¹)	4	3,54	69	3,11	63
Etanol (6 % v/v)	4	3,54	51	3,27	72
Ácido succínico + etanol	4	3,54	7	3,56	96

Fonte: Basso et al. (1997)

A porcentagem de inibição foi calculada em relação ao tratamento controle, considerado como zero.

O ácido succínico presente nos vinhos é produzido quase que exclusivamente por leveduras. É considerado o principal ácido produzido pela levedura, pois é aquele sintetizado em maiores quantidades (Alves, 1994). A sua formação é provavelmente resultado do desenvolvimento celular sob condições anaeróbias, pois não há nenhuma razão fisiológica para a sua formação (Oura, 1977).

Segundo Alves (2000) a linhagem Fleischmann produz mais ácido succínico e ácido málico do que a linhagem PE-2 e mesmo que o ácido málico produzido seja reabsorvido, ele contribui para a acidificação do mosto e estes, em efeito sinérgico com o etanol, podem ser os responsáveis pela atividade antibacteriana de leveduras durante a fermentação alcoólica.

2.6 Alguns indicadores de estresse na levedura

O principal indicador de estresse na levedura é a viabilidade celular, sendo que a influência da viabilidade celular sobre a contaminação bacteriana é estudada e os principais fatores envolvidos são a concentração de etanol, a competitividade pelo substrato, a atividade de invertase, o estímulo promovido pela autólise de células e excreção de nutrientes (Ngang et al., 1992; Oliva-Neto & Yokoya, 1997; King & Belman, 1986). Em algumas situações a presença da levedura favorece o desenvolvimento bacteriano, em outros casos a fermentação é considerada um ótimo inibidor da multiplicação bacteriana, seja pela presença do etanol, de ácidos orgânicos ou pela rápida assimilação do substrato (Basso et al. 1997, Thomas et al. 2001, Alves, 2000).

A levedura *S. cerevisiae* é capaz de acumular dois carboidratos de reserva, trealose e glicogênio, quando em condições especiais estes polissacarídeos exercem importante função na manutenção, diferenciação e sobrevivência das leveduras (Panek et al., 1990).

É admitida que a principal função da trealose é a proteção das células durante períodos de estresse, e não de carboidrato de reserva. A proteção é exercida sobre os componentes do citossol quando a levedura é submetida à condições desfavoráveis (Wienken, 1990). A trealose é importante para a manutenção da viabilidade celular da levedura, contudo, é utilizada com carboidrato de reserva durante períodos de não proliferação, quando a sobrevivência da célula depende do nível de trealose e de glicogênio (Thevelein, 1984).

As correlações entre a manutenção da viabilidade e o teor de trealose endógena é observada em linhagens de leveduras osmotolerantes e naquelas que mantém a viabilidade quando armazenadas a temperaturas de 20 a 4 °C (D'Amore et al., 1991). O estudo de 86 leveduras provenientes de 3 destilarias de produção artesanal de cachaça revelou que todos os isolados apresentaram capacidade de produzir invertase e acumular trealose na presença de glicose, além disso foi observada uma forte relação entre o acúmulo de trealose intracelular e a viabilidade celular sob condições de estresse (Pataro 2002).

Depois do etanol, o glicerol é segundo composto formado em maior quantidade pela *S. cerevisiae* durante a fermentação. O glicerol é formado pela redução da di-hidroxiacetona fosfato para glicerol 3-fosfato, concomitantemente com a oxidação do NADH PARA NAD⁺, sendo que o glicerol 3-fosfato é desfosforilado até glicerol. Em condições anaeróbias, a *S. cerevisiae* produz glicerol para manter o balanço de redox para sustentar o processo de glicólise (Oura, 1977 Nordsrtom, 1966).

Walker (1998) cita que o glicerol é o mais efetivo osmoregulador presente em *S. cerevisiae* e ocorre aumento de síntese em situações de estresse osmótico, quando também ocorre aumento da síntese de trealose. O autor cita ainda que a trealose é o mais eficiente sacarídeo na estabilização da membrana plasmática quando a levedura é submetida a um estresse osmótico.

Segundo D'Amore & Stewart (1987) o etanol produzido na fermentação pode reduzir a multiplicação e a viabilidade da levedura. O mecanismo de inibição é complexo e muitos mecanismos são propostos, sendo que incluem a desnaturação e inibição de enzimas e danos na membrana plasmática alterando a sua permeabilidade. Os autores ressaltam que os fosfolípidos presentes na membrana plasmática desempenham um importante papel no mecanismo de tolerância ao etanol. Acréscimos de ácidos graxos insaturados, além disso, fatores como o acúmulo de etanol intracelular, temperatura e pressão osmótica influem sobre a tolerância ao etanol.

Segundo Brosnan et al. (2000) o etanol exerce um efeito estressante sobre a levedura, sendo esse efeito mais pronunciado quando combinado com um choque térmico.

Polonelli & Morace² citados por Walker (1998) relataram que determinadas leveduras com caráter killer secretam compostos que são capazes de inibir o crescimento de diversas bactérias, tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas.

² POLONELLI, L.; MORACE, G. Re-evaluation of the killer phenomenon. Journal of Clinical Microbiology. v.24, p. 866-869, 1986.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Determinação de Etanol nos Vinhos Delevurados

Os vinhos foram centrifugados a 800 g durante 20 min, em seguida, 25 mL de vinho delevurado (sobrenadante) foram transferidos para o interior de um microdestilador Kjeldahl e destilados por arraste em vapor, recolhendo 50 mL de destilado, em balão volumétrico. As amostras destiladas foram transferidas para o densímetro digital, marca ANTON PAAR, modelo DMA 48. As densidades obtidas dos destilados foram convertidas em concentrações de etanol (% v/v) pelo aparelho e a concentração resultante no equipamento foi multiplicada por 2 para compensar a diluição ocorrida durante a destilação (Zago et al., 1996).

3.2 Determinação de Açúcares nos Caldos, Melaços e Vinhos Delevurados e Glicerol em Vinhos Delevurados

Foram determinados através de cromatografia líquida de alta eficiência utilizando cromatógrafo iônico DIONEX, modelo DX300, equipado com coluna CarboPack PA1 e detector baseado na amperometria de pulso com eletrodo de ouro, utilizando como fase móvel solução de NaOH (100 mmol.L⁻¹) sob fluxo de 1 mL.min⁻¹.

3.3 Determinação do pH dos Vinhos

Foram determinados em potenciômetro digital, marca DIGIMED, modelo DPH2 (Zago et al., 1996).

3.4 Determinação do Teor de Levedura nos Vinhos

Foram transferidos 10 mL de vinho bruto para o interior de tubos de centrifuga (marca PYREX, modelo 8080) previamente tarados. Os tubos foram centrifugados a 700 g durante 10 min, em seguida, os sobrenadantes foram descartados e os tubos com as biomassas precipitadas foram pesados. (Zago et al., 1996). Os resultados são expressos em biomassa presente no vinho bruto e apresentados em g.L^{-1} .

3.5 Determinação de Trealose na Levedura

Os teores de trealose foram determinados após a extração seletiva, em duplicata, de 60 mg de massa úmida de levedura com 2 mL de solução de ácido tricloroacético ($0,5 \text{ mol.L}^{-1}$) mantidos em banho de gelo, durante 20 min (Trevelyan & Harrison, 1956a; 1956b), seguido de centrifugação a 1000 g durante 5 min e descarte do sobrenadante. Em seguida, foi realizada a determinação da trealose nos extratos centrifugados, através de reação colorimétrica com antrona (500 mg.L^{-1}) e tiuréia (10 g.L^{-1}) em meio sulfúrico (75 % de ácido sulfúrico p.a. e 25% de água destilada) A determinação da densidade ótica foi realizada a 620 nm em colorímetro Klett-Summerson. As amostras foram comparadas a uma solução padrão de glicose dissolvida em água destilada (210 mg.L^{-1}). Os resultados obtidos foram expressos em g de trealose contida em 100 g de massa seca de levedura (Brin, 1966).

3.6 Determinação da Viabilidade Celular de Levedura

As viabilidades celulares das linhagens de levedura foram determinadas através de microscopia ótica, em microscópio OLYMPUS, modelo BH, em objetiva de 40X, considerando a leitura de células viáveis, não viáveis e brotos viáveis presentes em 160 retículos da câmara de Neubauer espelhada. Foi utilizada solução de eritrosina, em tampão citrato, como corante para distinguir as células viáveis, não coradas, das não viáveis, coradas em rósea (Oliveira et al., 1996).

3.7 Contagem de Bactérias em Microscópio Ótico

Realizada através de microscopia utilizando como corantes solução de Sulfato Azul do Nilo e Azul de Metileno, em solução tampão fosfato, para distinguir bastonetes viáveis (não corados) e não viáveis (corados de azul), sendo somente contados os bastonetes viáveis, em objetiva de imersão (Oliveira et al., 1996). A técnica da microscopia permite uma quantificação menos precisa em relação ao plaqueamento, entretanto, não necessita de período de incubação e fornece resultados em poucos minutos. Devido a menor precisão, os resultados obtidos na contagem de bastonetes foram utilizados como apoio durante a execução dos experimentos e não estão apresentados nesse trabalho, sendo disponibilizado somente os resultados obtidos através de plaqueamento.

3.8 Preparo da Solução de Água Peptonada

A solução foi preparada pela diluição de 1 g de peptona para cada litro de água destilada. Após a diluição, a solução foi transferida para erlenmeyer de 1 L e autoclavada a 121 °C durante 20 min. Essa solução foi utilizada como diluente em diluições seriadas (1:10) de todas as amostras utilizadas para plaqueamento.

3.9 Preparo da Solução de Actidiona

Inicialmente foi preparada uma solução de actidiona, pela diluição de 1 g de actidiona em 1 L de água destilada autoclavada. A solução foi armazenada sob refrigeração (4 °C) por um período de até 3 semanas. Instantes antes de verter o meio de cultivo ágar MRS nas placas de Petri foi adicionado 10 mL da solução de actidiona para cada litro de meio de cultivo ágar MRS liqüefeito, à temperatura de 52 a 54 °C, seguido de agitação manual para homogeneização (Oliveira et al., 1996).

3.10 Linhagens de *S. cerevisiae*

Foram utilizadas três linhagens da levedura *S. cerevisiae*. A linhagem PE-2 foi isolada da Usina da Pedra, localizada no município de Serrana, Estado de São Paulo, e apresenta capacidade de permanência no processo e resistência aos estresses causados pelas condições existentes em unidades industriais de produção de etanol (Basso & Amorim, 1996). A linhagem Fleischmann foi escolhida devido ao seu amplo uso em processos industriais de produção de etanol, apesar da mesma ser considerada uma linhagem recomendada para panificação. A linhagem M-26 foi isolada pelo Prof. Dr. Pedro Oliva-Neto (UNESP/ASSIS) da Usina Nova América, Município de Tarumã, Estado de São Paulo. Essa linhagem foi incluída nos estudos, pois a mesma já havia demonstrado potencial para uso industrial, assim como exercer alguma atividade antibacteriana em testes prévios realizados pelo pesquisador. As linhagens puras foram caracterizadas através de cariotipagem (Basso et al., 1993) e fornecidas pela Coleção de Leveduras do Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ/USP, Piracicaba, SP.

3.11 Manutenção das Linhagens de *S. cerevisiae*

A cultura da levedura foi reativada em tubos de ensaio contendo 5 mL do meio de cultivo "Yeast extract peptone dextrose" (YEPD), os quais foram incubados a 25 °C durante 24 h. Após a reativação, as culturas foram estriadas em tubos de ensaio com o meio de cultura "Yeast extract peptone dextrose ágar" (YEPDA) e transferidos para incubadora, a 32 °C durante 48 h, Passado esse período, os tubos com as culturas estriadas foram mantidos sob refrigeração, a 4 °C, por até 6 meses. Ao final de 6 meses o processo foi repetido. O meio de cultivo YEPDA foi formulado com a seguinte composição (Oliveira et al., 1996):

- Extrato de levedura..... 10 g
- Peptona..... 10 g
- Glicose..... 20 g
- Ágar..... 15 g
- Água destilada..... 1,0 L (q.s.p.)

3.12 Preparo do Mosto de Multiplicação de Levedura

Os mostos de multiplicação foram preparados com melaço industrial (mel final proveniente da Usina Santa Helena, Grupo Cosan, Município de Rio das Pedras, SP) diluído com água até atingir 10 % de açúcares totais (AT) e suplementado de acordo com a Tabela 2. Após a dissolução de todos os componentes, o mosto de multiplicação foi transferido para erlenmeyers e autoclavados (121 °C durante 20 min). Os frascos contendo mosto de multiplicação autoclavado foram armazenados em temperatura ambiente até o momento do uso, período que não excedeu a 7 dias.

Tabela 2. Composição do mosto de multiplicação utilizado na propagação das linhagens de *S. cerevisiae* para a obtenção de biomassa suficiente para o uso nos experimentos de ciclos fermentativos.

Componentes	Quantidade
AT de melão	100,00 g.L ⁻¹
Fosfato de potássio dibásico (K ₂ HPO ₄)	0,87 g.L ⁻¹
Sulfato de amônio ((NH ₄) ₂ SO ₄)	0,66 g.L ⁻¹
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0,49 g.L ⁻¹
Sulfato de manganês (MnSO ₄ .4H ₂ O)	0,02 g.L ⁻¹
Sulfato de zinco (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	0,03 g.L ⁻¹
Uréia (CON ₂ H ₄)	0,03 g.L ⁻¹
Solução alcoólica de ácido linoléico ¹	1,00 mL.L ⁻¹
Água	1,0 L (q.s.p.)

Fonte: Adaptado de Zago (1982)

¹ Solução preparada com 30,0 g de ácido linoléico diluídos em 1 L de álcool etílico.

3.13 Multiplicação das Linhagens de *S. cerevisiae*

As propagações das linhagens de levedura foram realizadas anaerobicamente, à temperatura ambiente (em uma faixa compreendida entre 18 e 28 °C), e em duas etapas. A primeira etapa para reativar as culturas armazenadas (4 °C), foi realizada através da transferência de uma alçada dessa cultura, mantida em tubos de ensaio com o meio de cultivo YEPDA, sob refrigeração, para um erlenmeyer contendo 100 mL de meio YEPD, seguido de incubação à temperatura ambiente durante 24 h (Figura 2).

Na segunda etapa da multiplicação, 100 mL das suspensões das linhagens em YEPD, provenientes da primeira etapa, foram transferidos para

outro frasco contendo 100 mL de mosto de multiplicação e incubadas à temperatura ambiente. Ao final da fermentação tumultuosa do mosto de multiplicação, constatado visualmente através da sedimentação das células, foi adicionado um volume de mosto de multiplicação igual ao volume da suspensão de células dobrando o volume, ou seja foi adicionado 200 mL, seguido de incubação a temperatura ambiente. O procedimento de duplicar o volume com mosto, após o encerramento da fermentação tumultuosa, foi repetido sucessivamente até a obtenção da quantidade de biomassa desejada de cada uma das linhagens. Resultados de testes preliminares indicaram ser possível produzir através deste procedimento, aproximadamente, 20 g de biomassa úmida de levedura para cada litro de mosto de multiplicação.

Após o término da multiplicação, as suspensões das linhagens de *S. cerevisiae* em vinho de multiplicação foram acondicionadas em câmara fria (4 °C) durante o tempo suficiente para ocorrer a decantação das células em suspensão e, em seguida, foram centrifugadas a 800 g durante 20 min (centrífuga International Refrigerated Centrifuge, modelo PR-2). No vinho delevurado (sobrenadante) foi determinado a concentração de glicerol, de açúcares residuais e de etanol. As biomassas (decantado) foram utilizadas nos ensaios fermentativos (Figura 1, anexo A).

3.14 Preparo dos Mostos de Fermentação

Os mostos utilizados para os experimentos de fermentação foram preparados através da mistura de caldo de cana e melaço diluídos. A proporção utilizada foi de 70 % de caldo de cana diluído com água até atingir a concentração de AT desejada e 30 % de melaço, também diluído com água até a mesma concentração de AT. A concentração de AT foi variável para cada experimento e previamente determinada de acordo com o objetivo do experimento. Os mostos de fermentação foram filtrados em algodão hidrófilo, autoclavados a 121 °C durante 20 min. Posteriormente foram resfriados até 4 °C, novamente filtrados em filtro algodão hidrófilo, acondicionado em frascos

plásticos contendo 800 mL de mosto em cada embalagem, congelados e mantidos em congelador a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento do uso.

3.15 Bactéria

Foi utilizada a bactéria *L. fermentum* CCT 1407, sendo a cultura liofilizada fornecida pela Fundação André Tozello, Campinas, SP. Essa bactéria foi isolada de processos fermentativos, se caracteriza por ser não floculenta e resistente às condições de fermentação (Oliva-Neto & Yokoya, 1997).

3.16 Meio de Cultivo Para Multiplicação e Plaqueamento da Bactéria

O meio de cultura MRS utilizado para a multiplicação e plaqueamento da bactéria foi preparado em laboratório de acordo com a composição apresentada na (Tabela 3). Os componentes foram pesados separadamente, transferidos para béquer, diluídos com água destilada, em seguida os meios de cultivo foram transferidos para erlenmeyers, tampados com tampões de algodão e autoclavados a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos. Não houve a necessidade de promover ajustes de pH do meio de cultivo pois o mesmo permanecia entre 6,2 e 6,5, de acordo com as recomendações de De Man et al. (1960). O ágar foi utilizado somente nos meios de cultura destinados para plaqueamentos, na concentração de $15,00\text{ g.L}^{-1}$.

Tabela 3. Composição do meio de cultura MRS utilizado para a multiplicação e plaqueamento da bactéria *L. fermentum* CCT 1407 utilizada como contaminante bacteriano nos experimentos de ciclos fermentativos em cultura mista com *S. cerevisiae*.

Componentes	Concentração (g.L ⁻¹)
Dextrose	20,00
Peptona	10,00
Extrato de carne	10,00
Extrato de levedura	5,00
Acetato de sódio (CH ₃ COONa.3H ₂ O)	5,00
Citrato de amônio bibásico (C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₇)	2,00
Fosfato de potássio dibásico (K ₂ HPO ₄)	2,00
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0,20
Sulfato de manganês (MnSO ₄ .4H ₂ O)	0,05
Tween 80	1,00
Água destilada	1,0 L (q.s.p.)

Fonte: De Man, Rogosa e Sharpe, 1960.

3.17 Solução de Leite Desnatado

A solução de leite desnatado foi preparada através da diluição de leite em pó desnatado comercial (Molico, Nestlé) em água destilada autoclavada na concentração de 90 g.L⁻¹. Após a dissolução do leite em pó, a solução foi transferida para frascos de diluição de leite com capacidade para 100 mL, e acondicionada em autoclave permanecendo sob vapor corrente durante 20 min,

sendo em seguida transferida para a incubadora a 32 °C durante 48 h para a constatação da ausência de desenvolvimento de microrganismos contaminantes avaliado através da acidez do leite e verificação visual ao microscópio ótico, em objetiva de imersão (Garcia³).

3.18 Manutenção da Cultura Bacteriana

A cultura liofilizada da bactéria foi reativada em 10 mL de meio de cultivo MRS a 32 °C durante 24 h, em seguida, 2 mL dessa suspensão foram transferidos para 200 mL de uma solução de leite desnatado e homogeneizados através de agitação.

Em seguida, alíquotas de 2 mL da suspensão bacteriana em solução de leite desnatado foram transferidas, com o auxílio de pipeta autoclavada, para tubos de ensaio autoclavados, tampados com tampões de algodão, os quais foram imediatamente transferidos para congelador e mantidos à temperatura de -18 °C por um período máximo de 6 meses.

3.19 Multiplicação da Bactéria

Um tubo de ensaio (tubo 1) contendo a suspensão de *L. fermentum* CCT 1407 congelada em solução de leite desnatado foi transferido para incubadora a 32 °C para a reativação da cultura durante 24 h (Figura 4). No segundo dia, uma alíquota de 0,25 mL da suspensão ativa presente no tubo 1 foi transferida para outro tubo de ensaio (tubo 2) contendo 5 mL de meio MRS e incubação nas mesmas condições. No terceiro dia, uma alíquota de 0,25 mL da suspensão contida no tubo 2 foi transferida para outro tubo de ensaio (tubo 3) com 5 mL de meio MRS incubada nas mesmas condições. Por fim, no quarto dia toda a suspensão bacteriana presente no tubo 3 (5,25 mL) foi transferida

³ GARCIA, C.E. (FERMENTC S/A Ltda, Piracicaba, SP) Comunicação pessoal, 1999.

para um erlenmeyer (frasco 4) contendo 300 mL de meio de cultivo MRS, seguido de incubação a 32 °C durante 20 h (Figura 2, anexo A).

3.20 Preparo do Inóculo Bacteriano

Após a multiplicação da cultura bacteriana, o volume de 300 mL da suspensão (frasco 4) foi centrifugada a 800 *g* durante 20 min (centrífuga International Refrigerated Centrifuge, modelo PR-2), e a biomassa decantada foi ressuspensa em água destilada autoclavada. O procedimento de centrifugação e ressuspensão em água foi repetido por mais duas vezes (centrífuga FANEM, modelo Excelsa Baby), a 1.000 *g* durante 20 min. Após a 4ª centrifugação, as suspensões bacterianas foram ressuspensas em água destilada autoclavada e utilizadas como inóculo nos experimentos de fermentação.

3.21 Estimativa da População Bacteriana no Inóculo.

Foi preparada uma curva de calibração (Figura 3, anexo A) para, através da equação obtida, converter a leitura turbidimétrica das suspensões bacterianas do inóculo em unidades formadoras de colônias.mL⁻¹ (UFC.mL⁻¹). Para isso foram preparadas várias diluições de suspensões bacterianas e após a determinação da densidade ótica das amostras, a 620 nm em espectrofotômetro (Bausch & Lomb, modelo Spectronic 88), foram realizados os plaqueamentos em profundidade das suspensões bacteriana em meio de cultivo ágar MRS, com actidiona seguido incubação a 32 °C durante 48 h.

O preparo do inóculo foi realizado com cultura incubada a 32 °C durante 20 a 22 h pois, experimentos preliminares indicaram que nesse momento, praticamente, a totalidade dos bastonetes presentes na suspensão era viável.

3.22 Microplaqueamento em gotas

A contagem de bactérias (UFC.mL⁻¹) foi realizada conforme a metodologia proposta por Silva et al (1996). Os procedimentos estão sucintamente descritos a seguir:

As placas de Petri foram preparadas 72 h antes do plaqueamento das amostras. O preparo consistiu em verter aproximadamente 7 mL do meio de cultivo ágar MRS liquefeito, com solução de actidiona, a temperatura de 52 – 54 °C nas placas de Petri. As placas foram então transferidas para uma incubadora a 32 °C onde permaneceram até a momento do plaqueamento. Nesse período, de aproximadamente 72 h, ocorria a desidratação parcial do meio de cultura, fato importante para a absorção das gotas de amostras depositadas sobre a superfície do meio de cultivo (Figura 4, anexo A). A incubação foi realizada a 32 °C devido a disponibilidade de equipamentos no laboratório.

O microplaqueamento em gotas foi realizado em câmara de fluxo laminar, onde também foram realizadas diluições seriadas das amostras utilizando água peptonada, na concentração de 1g.L⁻¹, como diluente.

Em seguida, as placas de Petri foram identificadas e no fundo da placa foi feita uma marcação, em linha reta, separando a placa em duas partes iguais, sendo que cada uma dessas partes da placa foi utilizada para o plaqueamento de diluições distintas.

Após as diluições seriadas das amostras, foi pipetado 12 µL das amostras diluídas e cuidadosamente depositado sobre a superfície do meio de cultura. Esse procedimento foi repetido 5 vezes para cada diluição, sendo que cada gota foi considerada uma repetição, portanto, foram realizadas 5 repetições para cada diluição de cada amostra, sendo que em cada placa foram plaqueadas duas diluições.

Depois da deposição das gotas sobre o meio de cultura parcialmente desidratado, as placas de Petri foram mantidas em repouso durante 40 a 45 min para a absorção das gotas pelo meio de cultivo. Em seguida, foram incubadas a 32 °C durante 48 h. Passado o período de incubação foram realizadas as leituras do número de colônias nas diluições que apresentavam entre 4 e 40 colônias para cada gota depositada.

Os cálculos do número de UFC.mL⁻¹ foram realizados conforme a equação apresentada a seguir:

$$\text{UFC.mL}^{-1} = n \cdot (1/0,012) \cdot d$$

Onde: n = média do número de colônias contadas em 5 repetições;
 (1/0,012) = fator de correção para converter o volume para mL;
 d = diluição utilizada onde foram contadas de 4 a 40 colônias.

3.23 Cálculo do rendimento fermentativo

O rendimento fermentativo foi calculado com base na estequiometria proporcionada pela fermentação alcoólica sendo considerado como 100% de rendimento quando ocorre a formação de 51,11 g de etanol, equivalente a 64,75 mL, a partir de 100 g de AT. Visando a redução dos erros de medidas de volume optou-se por determinar as pesagens dos mostos, vinhos delevurados e biomassas centrifugadas para posterior conversão desses pesos em volumes, através de cálculo das massas com as respectivas densidades. Nas condições nas quais foram realizados os experimentos a densidade da biomassa da levedura foi considerada como 1,05.

As análises de teores alcoólicos foram determinadas nos vinhos delevurados, contudo, para os cálculos de rendimento foi descontado o etanol presente na levedura e proveniente da fermentação anterior. Segundo Basso². Para esse cálculo considera-se que o volume de exclusão da matéria sólida da levedura (membranas e paredes celulares, entre outras) representa 30,7% (v/m) da massa úmida de levedura centrifugada a 800 g.

² Basso, L.C. (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba). Comunicação pessoal, 1999

3.24 Delineamento Estatístico

Foi utilizada a análise de variância com aplicação do teste F, ao nível de 0,05 de significância, para analisar as variáveis e análise sob o esquema parcelas subdivididas no tempo em delineamento blocos ao acaso, com modelo classificação cruzada e 3 repetições, sendo os tratamentos considerados como parcelas e os ciclos fermentativos como sub-parcelas. As comparações de médias foram feitas pelo teste de comparações múltiplas de Tukey ao nível de 0,05 de significância (Gomes, 1990).

3.25 Condução dos Experimentos de Fermentação

Todos os experimentos de ciclos fermentativos foram realizados em tubos de vidro para centrífuga com capacidade máxima para 150 mL.

Para o início do primeiro ciclo de qualquer experimento ciclo foi adicionado, aos tubos de centrífuga previamente tarados e identificados, a biomassa de levedura. Em seguida, foi realizada a alimentação que consistiu de adição de uma massa de mosto de fermentação equivalente a 60 mL de mosto. Por fim, foram adicionados 20 mL da suspensão bacteriana em água destilada autoclavada. Após a alimentação, todos os tubos foram imediatamente pesados, tampados com tampas de alumínio e transferidos para estufa, com temperatura controlada de 32 ± 1 °C.

A evolução do processo fermentativo foi acompanhada através da pesagem dos tubos a cada hora para estimar a perda de peso causada pela eliminação do CO₂ produzido. Após 7 horas de fermentação, os tubos foram retirados da estufa e transferidos para a bancada do laboratório onde permaneceram, à temperatura ambiente, até o início do ciclo seguinte.

Decorridas 20 h da alimentação, os vinhos brutos foram homogeneizados através de agitação manual, com o auxílio de hastes de nylon, e dos mesmos foi retirada 1 amostra de 0,2 mL para as análises microbiológicas. Após a retirada de amostras, os vinhos brutos foram

centrifugados a 800 g durante 20 min para a separação das células e as biomassas obtidas foram pesadas e reutilizadas no ciclo fermentativo subsequente.

A partir do início do 2º ciclo fermentativo, as biomassas foram ressuspensas em 20 mL de água destilada autoclavada, em seguida foi adicionado ácido sulfúrico 1N, em quantidade suficiente para atingir pH entre 2,45 e 2,55 na tentativa de simular o tratamento ácido de pé-de-cuba realizado em processos industriais. O tratamento ácido foi realizado durante 1 h com agitações manuais a cada 10 min.

Ao final de 1 h de tratamento ácido, 60 mL dos mostos de fermentação foram transferidos para os tubos de fermentação contendo as biomassas. Os tubos foram imediatamente pesados e transferidos para a incubadora a 32 °C durante 7 h.

Os experimentos foram formados por 6 ciclos fermentativos de 20 h cada, realizados diariamente com tratamento ácido e reutilização da levedura de um ciclo fermentativo para o ciclo seguinte.

Em todos os vinhos delevurados foram determinados o pH, a concentração de etanol, de açúcares residuais (AR) e de glicerol, entretanto, somente no início do primeiro e no final do último ciclo fermentativo foram determinados os teores de trealose nas biomassas. Também foram calculados os rendimentos fermentativos de cada ciclo.

3.26 Análises Microbiológicas Realizadas Durante os Ciclos Fermentativos

Foram retirados 0,2 mL de vinho bruto para a amostragem de cada parcela experimental, os quais foram diluídos com 1,8 mL de água destilada autoclavada (diluição 1:10). Da amostra diluída foi retirado 1 mL para a determinação da viabilidade, da taxa de brotamento da levedura e da contagem de bastonetes através de microscopia ótica.

Concomitantemente, em 1 mL da amostra diluída, foi realizada a contagem bacteriana (UFC) através da técnica de microplaqueamento em gotas

3.27 Experimento Comparativo Entre Duas Metodologias De Plaqueamento

3.27.1 Plaqueamento de Cultura de *L. fermentum* CCT 1407 (Amostra A)

A cultura da bactéria mantida em congelador foi reativada e multiplicada de acordo com os procedimentos descritos anteriormente. A amostra foi transferida para a câmara de fluxo laminar onde foram realizadas diluições seriadas (1:10) com água peptonada e, em seguida, plaqueadas através das duas metodologias plaqueamento submerso ("pour plate"), também o conhecido como plaqueamento em profundidade (Oliveira et al., 1996), e o microplaqueamento em gotas, de acordo com a metodologia recomendada por Silva et al. (1996). Para ambas as metodologias de plaqueamento foram realizadas 10 repetições para cada uma das diluições e para cada uma das metodologias e em meio de cultivo ágar MRS com actidiona.

Terminado o plaqueamento, as placas foram incubadas a 32 °C durante 48 h. Para o plaqueamento submerso foram contadas as placas provenientes das diluições nas quais foram observadas entre 30 e 300 colônias em cada placa. No microplaqueamento em gotas foram contadas as diluições nas quais foram observadas entre 4 e 40 colônias em cada gota.

3.27.2 Plaqueamento da Cultura Mista de *S. cerevisiae* e *L. fermentum* CCT 1407 (amostra B)

A cultura bacteriana e a cultura da linhagem PE-2 de *S. cerevisiae* foram propagadas separadamente, de acordo com os procedimentos já descritos. Após a multiplicação, 5 mL da cultura bacteriana e 20 g de biomassa foram transferidos para um erlenmeyer, sendo em seguida alimentados com 200 mL de mosto de fermentação e incubados a 32 °C durante 8 h.

Após a incubação, foram realizadas diluições seriadas (1:10) da amostra em água peptonada. Todas as diluições foram plaqueadas através das duas metodologias de plaqueamento em questão. Foram realizadas 10 repetições para cada uma das diluições das amostras e para cada uma das duas metodologias.

Após o término do plaqueamento, as placas foram incubadas, a 32 °C durante 48 h. Após o período de incubação foram contadas as placas provenientes das diluições nas quais foram observadas entre 30 e 300 colônias para o plaqueamento submerso, e aquelas entre 4 e 40 colônias para o microplaqueamento em gotas.

3.28 Experimentos de Fermentação em Reciclos Fermentativos Com as Linhagens Fleischmann e PE-2 de *S. cerevisiae* em Cultura Mista Com *L. fermentum* CCT 1407

O objetivo deste experimento foi comparar o desempenho de duas linhagens de *S. cerevisiae*, PE-2 e Fleischmann, quando em ciclos fermentativos em cultura mista com *L. fermentum* CCT-1407 e em condições laboratoriais que simulam, na medida do possível, as condições industriais.

Em dois tratamentos, um de cada linhagem de levedura, também foi adicionado extrato de levedura ao mosto de fermentação para fornecer nutrientes para o desenvolvimento da bactéria e assim favorecer a multiplicação bacteriana.

3.29 Procedimentos

As duas linhagens de levedura foram multiplicadas em mosto de propagação, composto de mel diluído para 100 g.L^{-1} de AT e suplementado com sais, conforme os procedimentos descritos anteriormente.

Após a multiplicação, os vinhos brutos provenientes do mosto de multiplicação foram acondicionados em câmara fria, a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 16 h, em seguida foram centrifugados a 800 g durante 20 min. O sobrenadante foi separado para a determinação do teor de glicerol, etanol e açúcares residuais. Das biomassas das duas linhagens obtidas através da centrifugação foram transferidos $7,5 \text{ g}$ para cada tubo de fermentação, seguido de 60 mL de mosto de fermentação e 20 mL de inóculo bacteriano.

O experimento foi constituído de 4 tratamentos e 3 repetições de cada tratamento, distribuídos de acordo com o esquema apresentado na Tabela 4.

Tabela 4. Composição dos tratamentos para comparar o desempenho de duas linhagens de *S. cerevisiae*, Fleischmann e PE-2, quando em cultura mista com *L. fermentum* CCT 1407 e com a adição de extrato de levedura ao mosto de fermentação, durante 6 recícos fermentativos.

tratamentos	linhagem de levedura	adição de extrato de levedura
Fleischmann.	Fleischmann	sem
Fleischmann+ext.	Fleischmann	com
PE-2.	PE-2	sem
PE-2+ext.	PE-2	com

Em dois tratamentos, um de cada linhagem de levedura (Fleischmann+ext e PE-2+ext), foi adicionado extrato de levedura na quantidade de $1,467 \text{ g.L}^{-1}$ ao mosto de fermentação para que a concentração no vinho durante o 1º ciclo fosse 1 g.L^{-1} . Neste cálculo foi considerada a diluição de 60 mL de mosto de fermentação com 20 mL de inóculo bacteriano e $7,143 \text{ mL}$ de biomassa. Nos 2º, 3º e 4º ciclos foi adicionado extrato de levedura ao mosto

de fermentação em quantidade suficiente para atingir a concentração no vinho de $1,000 \text{ g.L}^{-1}$ e para o 5º e 6º ciclos $2,000 \text{ g.L}^{-1}$.

3.30 Experimento de Fermentação Durante 6 Reciclos em Cultura Mista de *L. fermentum* CCT 1407 Com as Linhagens Fleischmann e PE-2 de *S. cerevisiae* Submetidas a Estresse Térmico

O objetivo desse experimento foi avaliar o efeito de 2 diferentes viabilidades, ocasionadas por estresse térmico, do inóculo das linhagens de *S. cerevisiae*, PE-2 e Fleischmann, durante 6 reciclos fermentativos quando em cultura mista com *L. fermentum* CCT-1407.

3.31 Procedimentos

As duas linhagens de *S. cerevisiae* foram multiplicadas em meio de propagação com 100 g.L^{-1} de AT, e após a multiplicação, os recipientes contendo as suspensões foram transferidos para a câmara fria, a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, onde permaneceram durante 16 h. Em seguida, os vinhos foram centrifugados a 800 g durante 20 min para separar a biomassa.

Inicialmente foi realizada uma fermentação com as biomassas das duas linhagens de levedura, para isto foi utilizado mosto de fermentação constituído de 70% caldo de cana e 30% de melaço, ambos diluídos para 150 g.L^{-1} de AT. Nessa etapa foram preparadas fermentações com suspensões de leveduras com 100 g.L^{-1} e não foi inoculada a bactéria. Após a alimentação com o mosto, os frascos foram transferidos para a incubadora a temperatura de $32 \text{ }^\circ\text{C}$.

Após 7 h de incubação, o vinho foi centrifugado (800 g durante 20 min) e metade da biomassa de cada linhagem foi separada e reservada para compor os tratamentos sem estresse térmico.

Para compor os tratamentos com estresse térmico foi diluído o vinho delevurado com água destilada autoclavada até atingir o teor alcoólico de 40 g.L⁻¹. Após a diluição os vinhos delevurados diluídos foram transferidos para as outras duas porções das biomassas, uma de cada linhagem, até formar suspensões de leveduras com 200 g.L⁻¹. Por fim, as suspensões foram acondicionadas em erlenmeyers e transferidas para banho-maria a 40 °C onde permaneceram durante 22 h com agitação manual e ocasional.

Terminado o período para promover o estresse térmico, o vinho foi centrifugado (800 g durante 20 min). Da biomassa centrifugada foram transferidos 8 g para os tubos de fermentação, seguidos de 60 mL de mosto de fermentação e, por último, 20 mL do inóculo bacteriano.

O experimento foi constituído de 4 tratamentos e 3 repetições de cada tratamento, distribuídos em 12 tubos, que correspondem as parcelas experimentais (Tabela 5).

Tabela 5. Composição dos tratamentos no experimento para avaliar o efeito de um estresse térmico (40 °C durante 22 h) sobre a fermentação alcoólica realizada com as linhagens Fleischmann e PE-2 da levedura *S. cerevisiae* quando em cultura mista com *L. fermentum* CCT 1407 durante 6 ciclos fermentativos.

tratamentos	linhagem de levedura	estresse térmico
Fleischmann com est.	Fleischmann	Com
Fleischmann sem est.	Fleischmann	Sem
PE-2 com estresse	PE-2	Com
PE-2 sem estresse	PE-2	Sem

3.32 Efeitos da Contaminação Bacteriana Durante 6 Reciclos Fermentativos Com as Linhagens M-26 e PE-2 de ***S. cerevisiae*** Quando em Cultura Mista com ***L. fermentum*** CCT 1407

Neste experimento o objetivo foi avaliar o efeito da contaminação bacteriana durante 6 ciclos fermentativos realizados com as linhagens M-26 e PE-2, em cultura pura com cultura mista com a bactéria *L. fermentum* CCT 1407.

3.33 Procedimentos

As linhagens de *S. cerevisiae*, M-26 e PE-2 foram multiplicadas em mosto de propagação com 100g.L^{-1} de AT, em seguida, foram transferidas para a câmara fria, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, onde permaneceram 16 h. Posteriormente, as suspensões foram centrifugadas a 800 g durante 20 min para a separação da biomassa.

Para o início do 1º ciclo fermentativo foram transferidos 8 g das biomassas das linhagens de leveduras para os tubos de fermentação, os quais foram alimentados com 60 mL de mosto de fermentação. Para cada uma das linhagens da levedura houve um tratamento ao qual foi adicionado 20 mL de água destilada autoclavada e outro tratamento ao qual foi adicionado 20 mL de suspensão da bactéria *L. fermentum* CCT 1407 em água destilada autoclavada. Assim sendo para cada linhagem de levedura, M-26 e PE-2, houve um tratamento sem (cultura pura) e outro a inoculação da bactéria (cultura mista).

O experimento foi realizado com 4 tratamentos e 3 repetições de cada tratamento, distribuídos em 12 tubos, os quais correspondem às parcelas experimentais (Tabela 9).

Para a execução desse experimento foram utilizados procedimentos diferenciados para trabalhar com ciclos fermentativos com culturas puras e mistas em bancada de laboratório devido as possibilidades de contaminações acidentais através da atmosfera, de materiais utilizados para a ressuspensão de biomassa ou para a retirada de amostras. Para evitar o problema foram utilizados materiais autoclavados e aqueles que não poderiam ser autoclavados permaneceram em imersão em solução alcoólica a 70% durante 12 h para reduzir a presença de microrganismos contaminantes viáveis nesses materiais.

Tabela 6. Composição dos tratamentos no experimento para avaliar o efeito da contaminação bacteriana durante 6 ciclos fermentativos realizados com as linhagens PE-2 e M-26 da levedura *S. cerevisiae* quando em cultura mista com *L. fermentum* CCT 1407.

tratamentos	Linhagem de levedura	inóculo bacteriano
M-26 Cultura Pura	M-26	Não
M-26 Cultura Mista	M-26	Sim
PE-2 Cultura Pura	PE-2	Não
PE-2 Cultura Mista	PE-2	Sim

O experimento foi repetido e os resultados foram confirmados, porém neste trabalho são apresentados os resultado de um dos testes.

4 RESULTADOS

4.1 Plaqueamentos de Cultura de *L. fermentum* CCT 1407 (Amostra A) e de Cultura Mista de *S. cerevisiae* e *L. fermentum* CCT 1407 (amostra B)

Os resultados obtidos na execução do teste para comparar duas metodologias de plaqueamento estão sucintamente apresentados nas Tabelas 7 e 8, bem como nas Tabelas 24 e 25 (anexo C) e são referentes ao plaqueamento de duas amostras, uma amostra de cultura de *L. fermentum* CCT 1407 e a outra de uma cultura mista da mesma bactéria com *S. cerevisiae*. Após todos os procedimentos serem padronizados, o teste de plaqueamento foi repetido três vezes e os resultados apresentados são referentes a uma das repetições.

No plaqueamento em profundidade da amostra de *L. fermentum* (amostra A) o resultado médio obtido foi $2,57 \cdot 10^8$ UFC.mL⁻¹ com desvio padrão de 6,83 enquanto que no microplaqueamento foi $2,60 \cdot 10^8$ UFC.mL⁻¹ com desvio padrão de 9,20 (Tabela 7)

Na amostra com cultura mista da levedura e da bactéria (amostra B), os resultados médios obtidos foram $9,79 \cdot 10^7$ UFC.mL⁻¹ com desvio padrão de 4,61 no plaqueamento em profundidade e $9,50 \cdot 10^7$ UFC.mL⁻¹ com desvio padrão de 6,82 microplaqueamento em gotas (Tabela 8).

A análise estatística com a aplicação do teste F, realizada com os resultados obtidos demonstrou que não haver diferença estatística significativa entre os dois procedimentos de plaqueamento testados. A diferença existente os procedimentos avaliados é a variação entre os resultados obtidos. No

procedimento de microplaqueamento em gotas houve maior, no entanto, esse fato pode ser amenizado com o aumento do número de repetições.

Tabela 7. Resultados dos plaqueamentos realizados através do microplaqueamento em gotas e do plaqueamento em profundidade, em meio de cultivo MRS, de uma amostra de cultura de *L. fermentum* CCT 1407.

Repetição (nº)	Microplaqueamento em gotas (UFC.10 ⁶ .mL ⁻¹)	Plaqueamento profundidade (UFC.10 ⁶ .mL ⁻¹)
1	268	248
2	250	264
3	269	256
4	268	249
5	259	269
6	244	260
7	268	251
8	265	255
9	250	262
10	263	260
Média	260,4	257,4
Desvio Padrão	9,20	6,83
Variância	84,71	46,71

Tabela 8. Resultados do plaqueamento da amostra com cultura mista através de duas metodologias de plaqueamento.

repetição (n ^o)	microplaqueamento em gotas (UFC.10 ⁶ .mL ⁻¹)	Plaqueamento convencional (UFC.10 ⁶ .mL ⁻¹)
1	98	102
2	102	106
3	98	99
4	99	95
5	93	100
6	106	94
7	84	96
8	92	93
9	87	102
10	91	92
Média	95	97,9
Desvio Padrão	46,44	21,21
Variância	6,82	4,61

4.2 Experimento de Fermentação em Reciclos Fermentativos Com as Linhagens Fleischmann e PE-2 de *S. cerevisiae* em Cultura Mista Com *L. fermentum* CCT 1407

os resultados obtidos para viabilidade, contaminação bacteriana, brotamento, peso de fermento, pH dos vinhos delevurados, rendimento fermentativo, teor alcoólico dos vinhos delevurados e evolução do desprendimento de CO₂ estão apresentados nas Figuras 5 a 14 e Tabelas 9 a 13 (Anexos B) e os resultados das comparações de medias através do teste de Tukey nas Tabelas 26 a 32 (Anexos C).

Os resultados obtidos neste experimento demonstram que ocorreu queda na viabilidade, sendo maior nos dois tratamentos com a linhagem

Fleischmann que nos dois tratamentos com a linhagem PE-2 (Figura 5), a partir do 2º ciclo a diferença entre tais tratamentos foi significativa pelo teste Tukey. Entre os dois tratamentos envolvendo uma mesma linhagem de levedura não houve diferença estatística significativa.

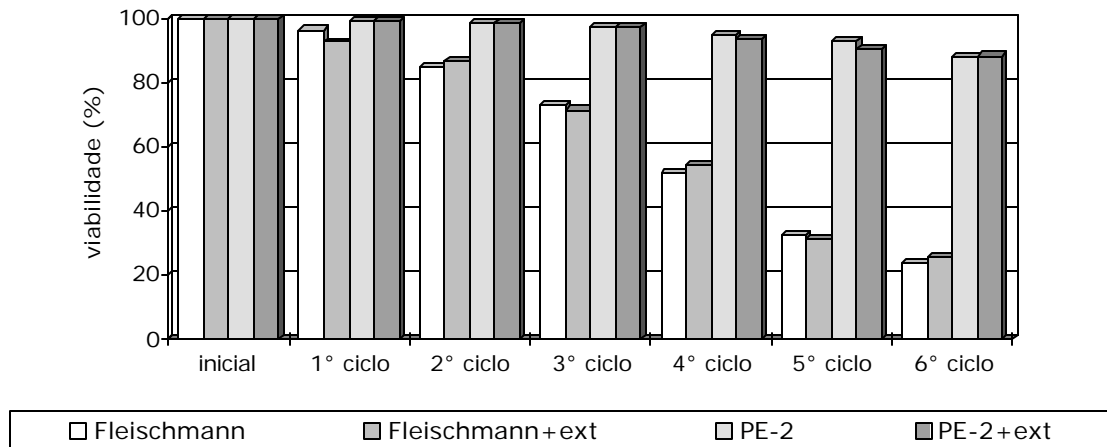


Figura 5 - Viabilidade celular do inóculo e ao final dos ciclos fermentativos realizados em cultura mista com *L. fermentum* CCT-1407 e as linhagens Fleischmann e PE-2 de *S. cerevisiae* e das mesmas linhagens com adição de extrato de levedura (+ext) ao mosto.

A contaminação (Figura 6) bacteriana foi maior no tratamento com a linhagem Fleischmann+ext no transcorrer de todos os ciclos fermentativos em relação aos demais tratamentos. O aumento na contaminação bacteriana ao longo dos ciclos foi de $2 \cdot 10^7$ UFC.mL⁻¹ para valores próximos a $1 \cdot 10^8$ UFC.mL⁻¹.

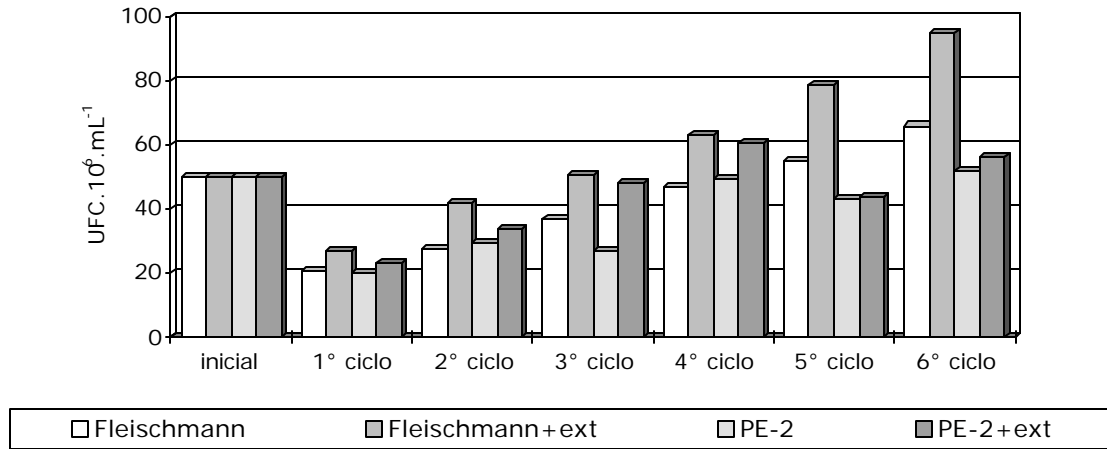


Figura 6 - Contaminação bacteriana no inóculo e ao final dos ciclos fermentativos realizados em cultura mista de *L. fermentum* CCT-1407 com as linhagens Fleischmann e PE-2 de *S. cerevisiae*, sem adição de extrato de levedura e das mesmas linhagens de levedura com adição de extrato de levedura (+ext) ao mosto.

Quando são comparados os dois tratamentos sem adição de extrato de levedura verifica-se que a contaminação bacteriana permaneceu menor no tratamento com a linhagem PE-2, em relação ao tratamento com a linhagem Fleischmann. O mesmo resultado ocorreu entre os dois tratamentos com adição de extrato de levedura. Apesar da tendência de maior contaminação bacteriana nos tratamentos com a linhagem Fleischmann, os tratamentos não diferiram entre si, através do teste F.

Com relação à biomassa (Figura 7), houve um aumento nos tratamentos com a linhagem Fleischmann até o 3º ciclo e uma redução da biomassa a partir do 4º ciclo fermentativo.

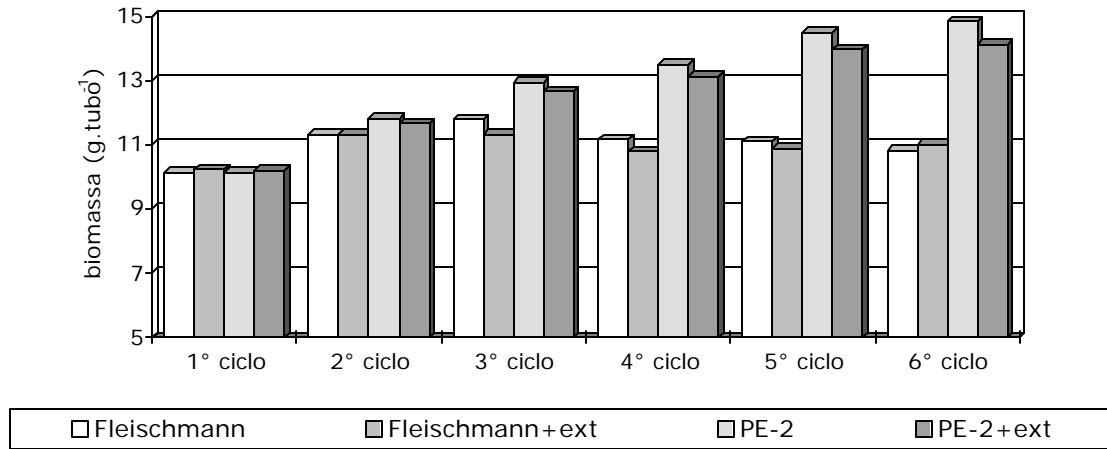


Figura 7 - Peso da biomassa inicial e ao final dos ciclos fermentativos realizados com as linhagens Fleischmann e PE-2 de *S. cerevisiae* sem adição de extrato de levedura ou com adição de extrato de levedura (+ext) ao mosto, quando em cultura mista com *L. fermentum* CCT-1407.

Ao final do 6º ciclo fermentativo os dois tratamentos com a linhagem Fleischmann apresentaram pesos de biomassa próximos a 11 g.tubo^{-1} , enquanto que nos dois tratamentos com a linhagem PE-2 os pesos foram acima de 14 g.tubo^{-1} .

A avaliação dos resultados sobre o pH dos vinhos delevurados (Figura 8) não demonstra correlações com a contaminação bacteriana ou com a biomassa.

Os resultados sobre rendimento fermentativo (Figura 9) demonstram duas importantes características. A primeira é a diferença estatisticamente significativa pelo teste de Tukey existente quando são comparadas as médias dos dois tratamentos com a linhagem PE-2 com os dois tratamentos com a linhagem Fleischmann, os rendimentos fermentativos foram superiores para os tratamentos com a linhagem PE-2 em relação àqueles com a linhagem Fleischmann. Os tratamentos de uma mesma linhagem apresentaram poucas diferenças de rendimento fermentativo entre si, sendo que, de modo geral, os tratamentos sem a adição de extrato de levedura apresentaram rendimentos mais elevados que os tratamentos com a adição do extrato de

levedura, com exceção do 6º ciclo fermentativo, quando foi observado resultado inverso.

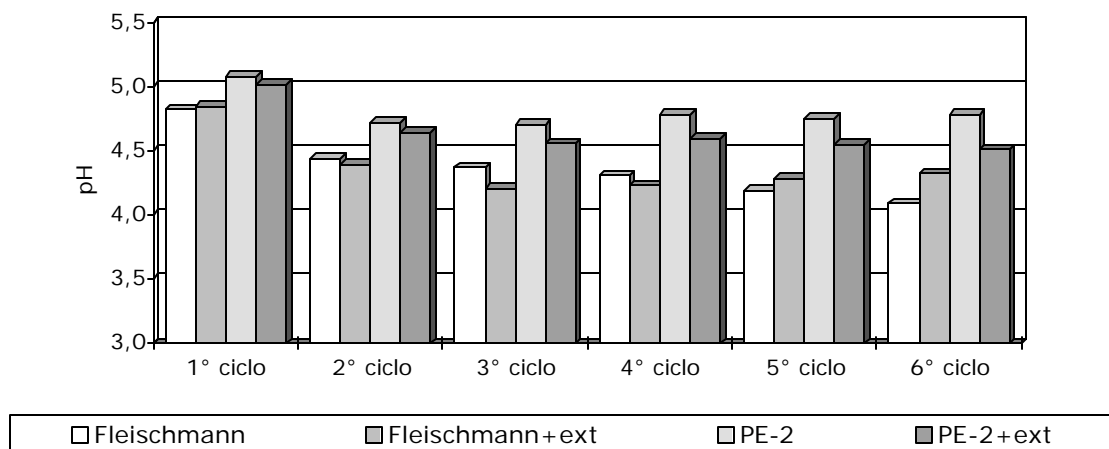


Figura 8 - pH dos vinhos delevurados ao final dos ciclos fermentativos realizados em cultura mista de *L. fermentum* CCT-1407 com as linhagens Fleischmann e PE-2 de *S. cerevisiae* e dessas mesmas linhagens quando adicionado extrato de levedura (+ext) ao mosto.

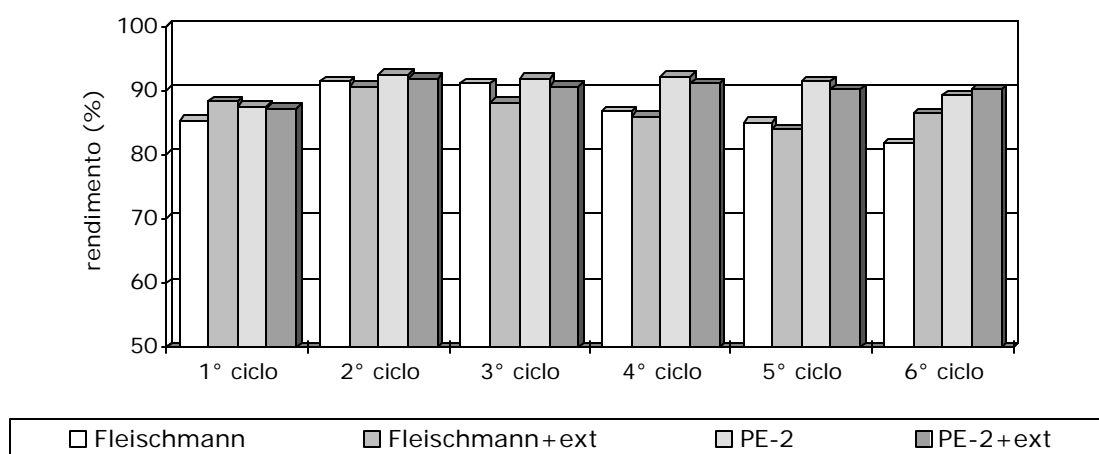


Figura 9 - Rendimento fermentativo dos ciclos fermentativos de cultura mista da bactéria *L. fermentum* CCT-1407 com as linhagens Fleischmann e PE-2 de *S. cerevisiae* e das mesmas linhagens com adição de extrato de levedura (+ext) ao mosto.

Os teores alcoólicos dos vinhos delevurados (Figura 10) apresentam comportamento similar ao verificado no rendimento fermentativo, pois o teor alcoólico é a principal variável utilizada no cálculo do rendimento. A partir do 3º ciclo fermentativo foi verificada a existência de diferença estatística significativa, pelo teste Tukey, entre os tratamentos avaliados.

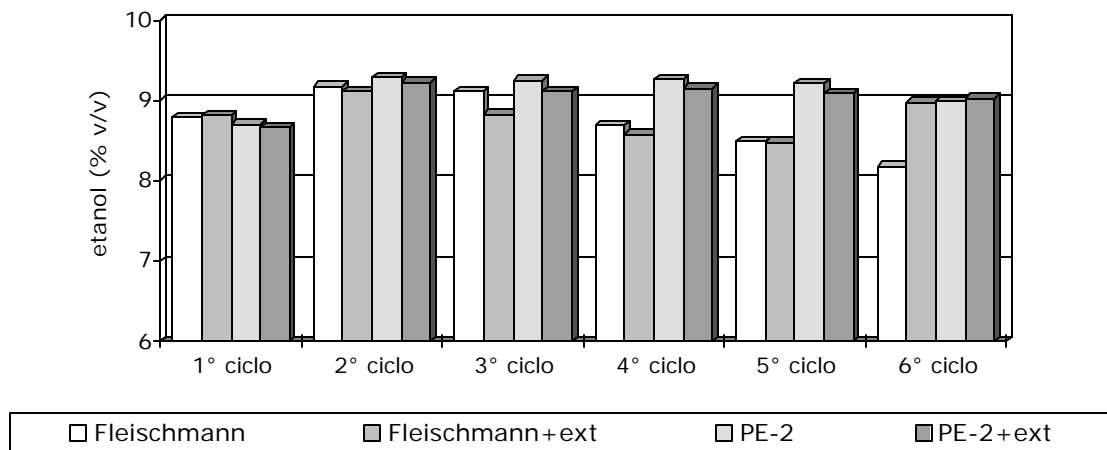


Figura 10 - Teores alcoólicos dos vinhos delevurados obtidos pela fermentação em cultura mista de *L. fermentum* CCT-1407 com as linhagens Fleischmann e PE-2 de *S. cerevisiae* e das mesmas linhagens com adição de extrato de levedura (+ext) mosto.

Os teores de glicerol estão apresentados em g para 100 mL de vinho delevurado e, apesar de permanecerem entre 0,5 e 1,0 g.100mL⁻¹ (Figura 11) são considerados elevados para as condições nas quais foi conduzido o experimento. Os dois tratamentos com a linhagem Fleischmann produziram mais glicerol que aqueles com a linhagem PE-2, contudo, não a diferença não foi considerada estatisticamente significativa.

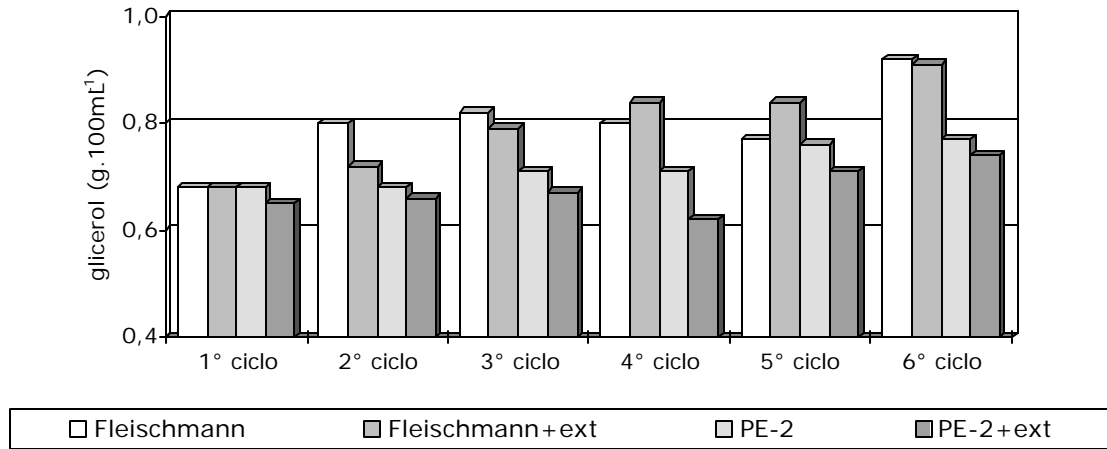


Figura 11 - Teores de glicerol nos vinhos delevurados obtidos através de fermentação em cultura mista de *L. fermentum* CCT-1407 com as linhagens de *S. cerevisiae*, Fleischmann e PE-2, sem ou com a adição de extrato de levedura (+ext) ao mosto.

Com relação à concentração de açúcares residuais nos vinhos delevurados (Figura 12) os resultados revelam apenas uma tendência de aumento com o transcorrer dos ciclos fermentativos, sendo que os teores permaneceram abaixo de $0,1 \text{ g.100mL}^{-1}$, com exceção do tratamento Fleischmann (sem a adição de extrato de levedura) no 6º ciclo que atingiu valor médio acima de $0,2 \text{ g.100mL}^{-1}$.

A pesagem dos tubos para determinar o desprendimento de CO_2 durante a fermentação demonstrou a velocidade na qual foi realizada a fermentação alcoólica (Figura 13). No decorrer dos ciclos fermentativos ocorreu redução da velocidade de fermentação nos dois tratamentos com a linhagem Fleischmann, sem que a mesma característica fosse observada nos dois tratamentos com a linhagem PE-2.

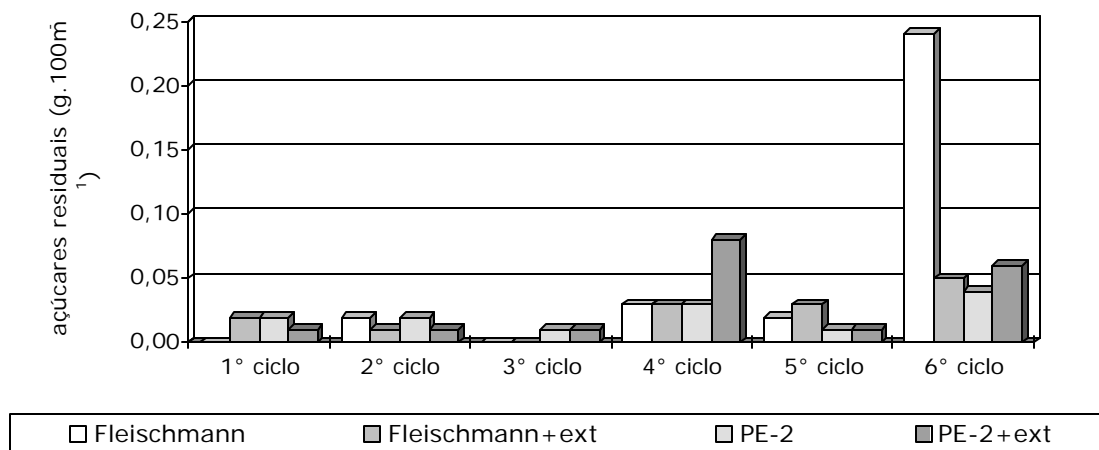


Figura 12 - Concentração de açúcares residuais presentes nos vinhos delevurados após os ciclos fermentativos realizados com cultura mista de *L. fermentum* CCT-1407 e as linhagens Fleischmann e PE-2 de *S. cerevisiae* sem ou com a adição de extrato de levedura (+ext) ao mosto.

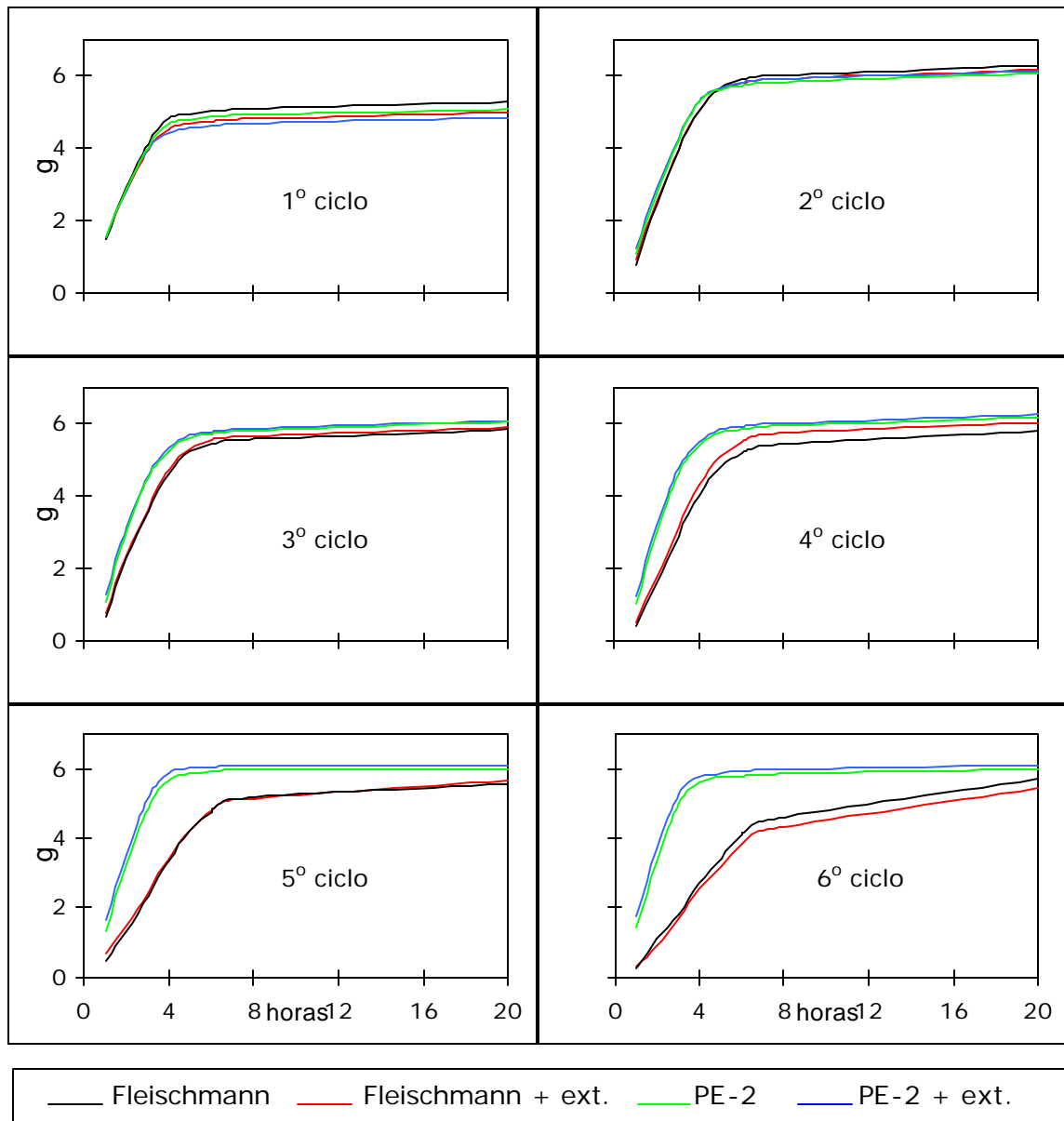


Figura 13 - Evolução do desprendimento de CO₂ no transcórreo dos 6 ciclos fermentativos realizados com cultura mista de *L. fermentum* CCT-1407 com as linhagens de *S. cerevisiae*, Fleischmann e PE-2, sem ou com a adição de extrato de levedura (+ext) ao mosto.

Outra observação pertinente é a diferença de desprendimento de CO₂ ao final dos ciclos fermentativos, 20 h após a alimentação. Nos ciclos

fermentativos iniciais a diferença entre as linhagens foi inferior, contudo, essa diferença foi tornando-se maior conforme foi observado nos demais ciclos.

Os teores de trealose presentes nas biomassas (Figura 14) observados neste experimento apresentaram relação com o aumento de peso da biomassa e também com a viabilidade apresentada pelos tratamentos.

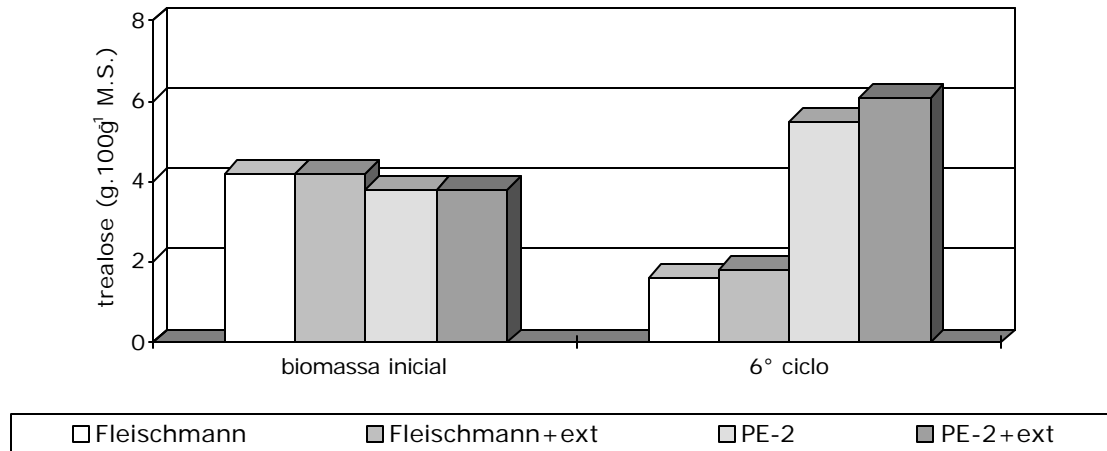


Figura 14 - Concentração de trealose no inóculo e na biomassa após o término do 6º ciclo fermentativo realizados em cultura mista de *L. fermentum* CCT-1407 com as linhagens Fleischmann e PE-2 de *S. cerevisiae*, sem ou com a adição de extrato de levedura (+ext) ao mosto.

Com relação à taxa de brotamento, não foi verificada relação com os demais parâmetros e não foi detectada nenhuma diferença estatística significativa entre os tratamentos testados.

4.3 Experimento de Fermentação Durante 6 Reciclos em Cultura Mista de *L. fermentum* CCT 1407 Com as Linhagens Fleischmann e PE-2 de *S. cerevisiae* Submetidas a Estresse Térmico

Os resultados deste experimento estão apresentados nas Figuras 15 a 24, nas Tabelas 14 a 18 (Anexos B) e os resultados do teste de Tukey para a comparação de médias nas Tabelas 33 a 41 (Anexos C).

A viabilidade celular (Figura 15) demonstrou uma importante característica, ambas as linhagens de *S. cerevisiae* apresentaram conseqüências do estresse provocado pelo tratamento térmico, pois houve redução na viabilidade do inóculo para valores próximos a 70% nas duas linhagens utilizadas na execução deste experimento

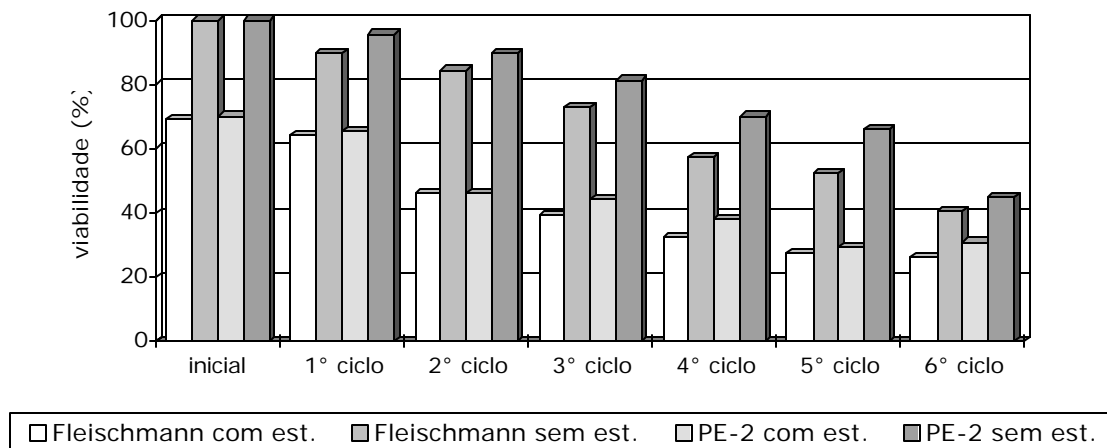


Figura 15 - Viabilidade celular do inóculo e ao final de cada ciclo fermentativo realizado com as linhagens Fleischmann ou PE-2 de *S. cerevisiae*, ambas com ou sem estresse térmico, e em cultura mista com *L. fermentum* CCT-1407.

O teste de Tukey, a 5% de significância, para a comparação de médias demonstrou que o tratamento PE-2 sem estresse diferiu significativamente dos demais tratamentos no 1º, 3º, 4º e 5º ciclos fermentativos, além disso, os dois tratamentos com estresse térmico foram considerados equivalentes.

Com relação à contaminação bacteriana (Figura 16), esta foi sempre maior nos tratamentos onde foi realizado o estresse térmico, em comparação aos tratamentos sem estresse térmico, independente da linhagem

de levedura avaliada. A comparação de médias, através do teste de Tukey, apontou diferenças significativas na contaminação bacteriana entre os tratamentos submetidos ao estresse térmico em relação aos tratamentos sem o estresse térmico a partir do 4^o ciclo.

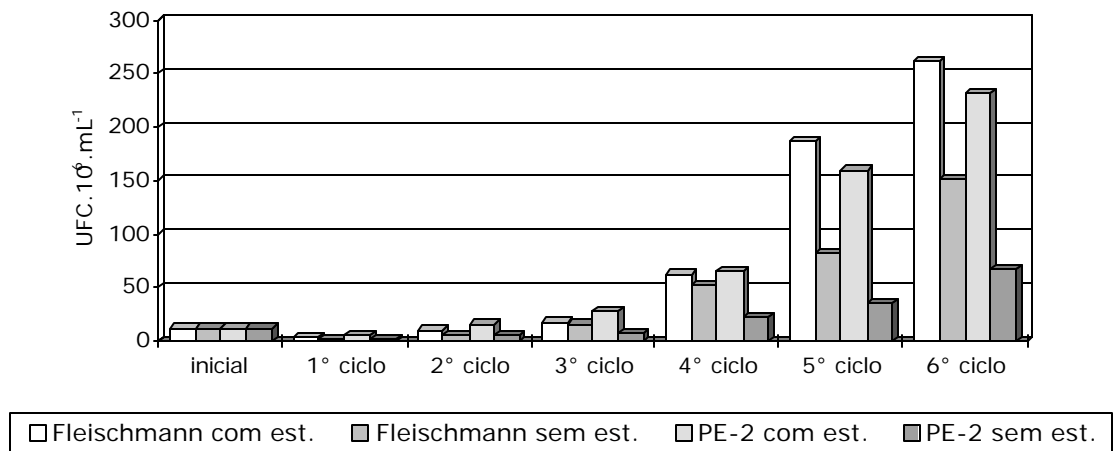


Figura 16 - Contaminação bacteriana no inóculo e na biomassa ao final de cada ciclo fermentativo realizado com cultura mista de *L. fermentum* CCT-1407 e as linhagens Fleischmann ou PE-2 de *S. cerevisiae*, com ou sem estresse térmico.

Ao comparar os dois tratamentos com a mesma linhagem de levedura, é possível verificar que para os dois tratamentos com estresse térmico a contaminação foi maior em relação ao tratamento sem o estresse térmico, independente da linhagem de *S. cerevisiae*.

Os resultados sobre o peso da biomassa (Figura 17) demonstram que o tratamento com a linhagem Fleischmann com estresse térmico apresentou comportamento peculiar, pois houve redução na biomassa ao término do 1^o, 2^o e 3^o ciclos fermentativos. A partir do 3^o ciclo fermentativo ocorreu o aumento da biomassa para esse tratamento.

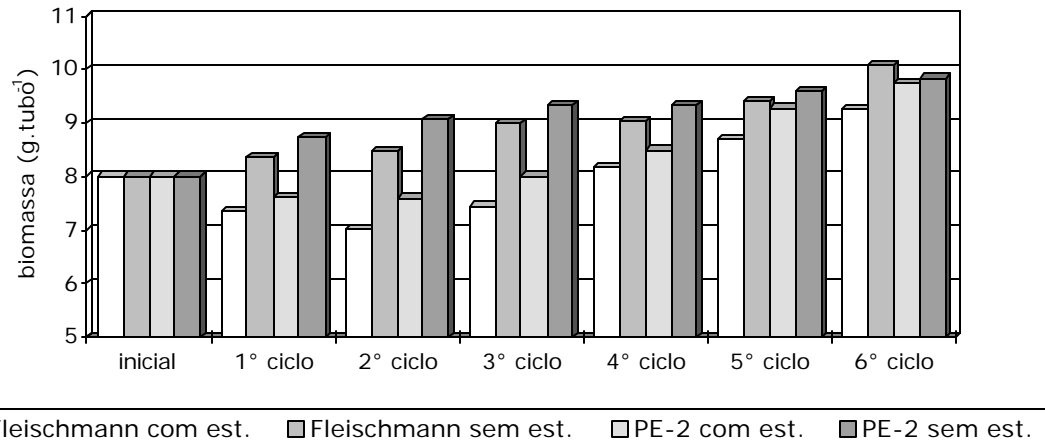


Figura 17 - Biomassa microbiana inicial e ao final de cada ciclo fermentativo realizado com cultura mista de *L. fermentum* CCT-1407 com as linhagens Fleischmann ou PE-2 de *S. cerevisiae* submetidas ou não a um estresse térmico.

Através dos resultados obtidos para pH dos vinhos delevurados (Figura 18) pode-se relacionar o pH, de modo geral, com a contaminação bacteriana, mas não com a biomassa, sendo que estes são os dois parâmetros relacionados com a produção de ácidos orgânicos durante a fermentação.

Os vinhos provenientes dos tratamentos com estresse térmico também apresentaram menores valores de pH reforçando a relação entre o pH e a contaminação bacteriana.

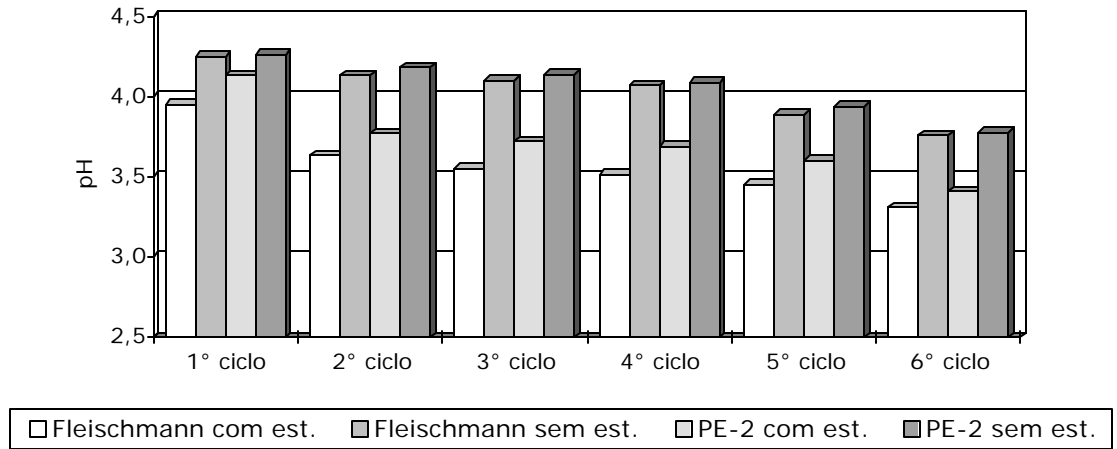


Figura 18 - pH dos vinhos delevurados ao final de cada ciclo fermentativo realizado com cultura mista de *L. fermentum* CCT-1407 com as linhagens Fleischmann e PE-2 de *S. cerevisiae*, com ou sem estresse térmico.

O rendimento fermentativo (Figura 19), este foi menor nos dois tratamentos com estresse térmico em relação aos demais, independentemente da linhagem de levedura. A análise estatística através do teste Tukey indicou que os dois tratamentos sem estresse diferiram dos demais porém, não foi considerada significativa a diferença entre os dois tratamentos sem estresse.

Os dois tratamentos submetidos ao estresse térmico produziram vinhos com teores alcoólicos menores (Figura 20) sendo detectada diferença significativa entre tratamentos através do teste de Tukey. Comparando-se as linhagens de levedura observa-se que os vinhos produzidos pelos tratamentos com a linhagem PE-2 apresentaram teores alcoólicos mais elevados quando comparados com os tratamentos similares com a linhagem Fleischmann.

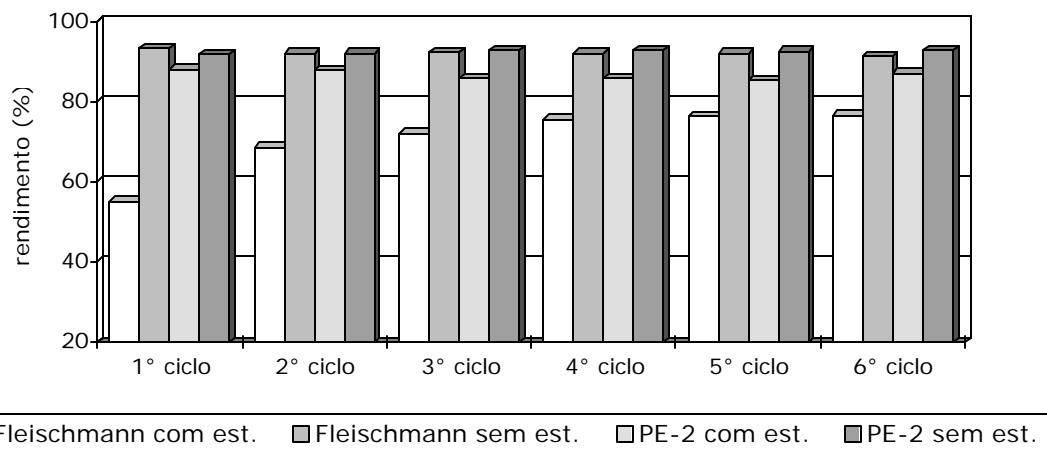


Figura 19 - Rendimento fermentativo de cada ciclo fermentativo realizado com cultura mista de *L. fermentum* CCT-1407 e as linhagens Fleischmann ou PE-2 de *S. cerevisiae* com ou sem estresse térmico.

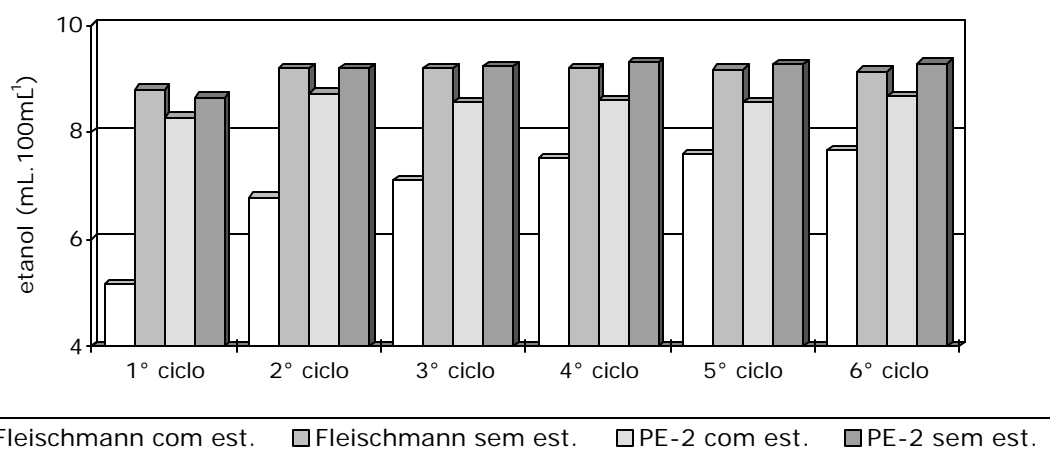


Figura 20 - Teores alcoólicos dos vinhos delevurados ao final de cada ciclo fermentativo realizado com cultura mista de *L. fermentum* CCT-1407 e as linhagens Fleischmann ou PE-2 de *S. cerevisiae*, com ou sem estresse térmico.

A partir do 3º ciclo fermentativo, os dois tratamentos com estresse térmico produziram mais glicerol (Figura 21) que os demais tratamentos,

independente da linhagem de levedura. Contudo, quando são comparadas as linhagens de levedura, o tratamento com a linhagem Fleischmann com estresse térmico produziu mais glicerol que o tratamento com a linhagem PE-2 com estresse térmico. O mesmo fato foi observado nos tratamentos sem estresse térmico.

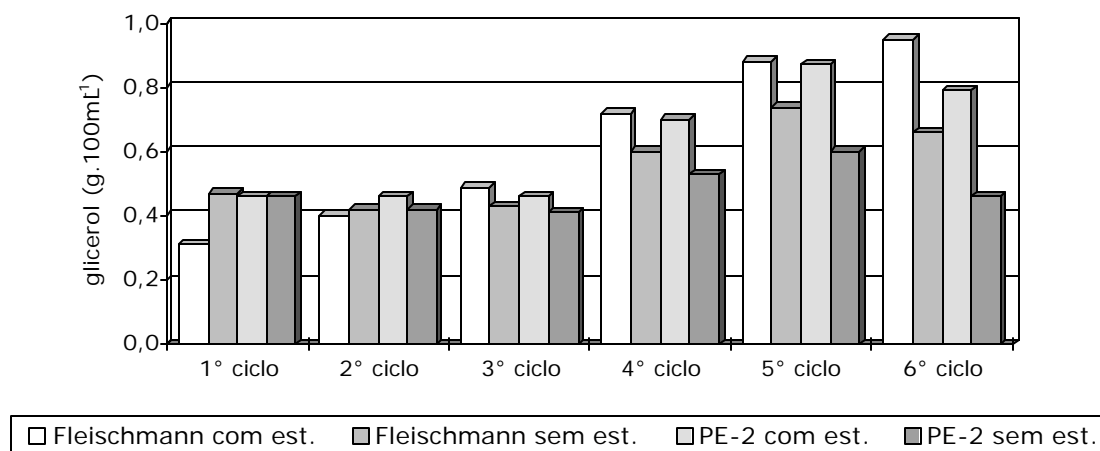


Figura 21 - Teores de glicerol do vinho de levedura após cada ciclo fermentativo realizado com cultura mista de *L. fermentum* CCT-1407 com as linhagens Fleischmann ou PE-2 de *S. cerevisiae*, com ou sem estresse térmico.

A evolução do desprendimento de CO₂ durante a fermentação (Figura 22) foi distinta para cada um dos tratamentos, contudo, nos dois tratamentos sem estresse térmico a redução de massa foi maior durante e ao final de cada um dos ciclos fermentativos. O tratamento envolvendo a linhagem Fleischmann com estresse térmico apresentou desprendimento de CO₂ inferior aos demais tratamentos no tempo 20 h após a alimentação confirmando o menor rendimento fermentativo desse tratamento.

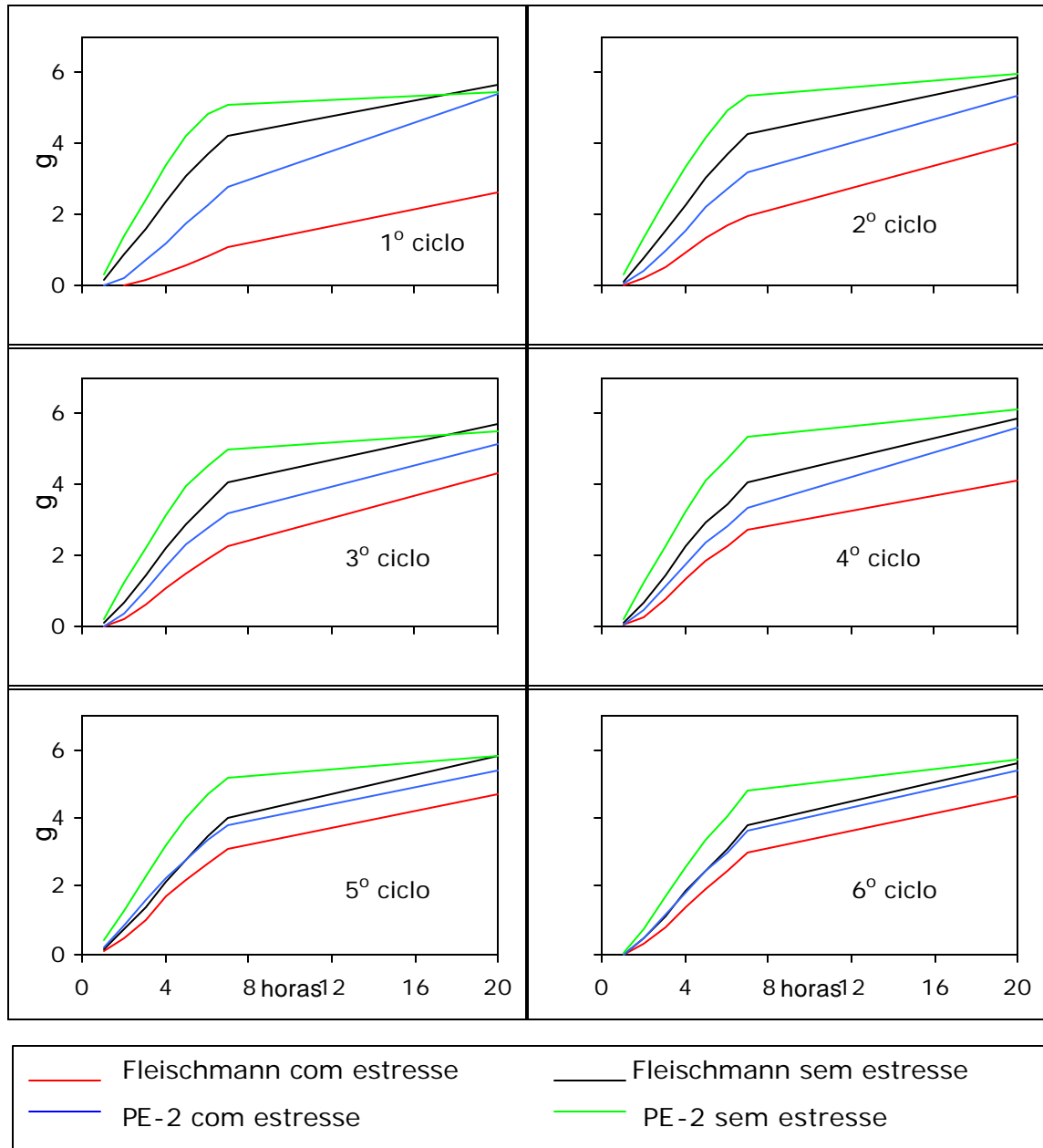


Figura 22 - Evolução do desprendimento de CO₂ no transcorrer de cada ciclo fermentativo realizado com cultura mista de *L. fermentum* CCT 1407 e as linhagens Fleischmann ou PE-2 de *S. cerevisiae*, com ou sem estresse térmico.

Os efeitos estressantes do tratamento térmico impossibilitaram o aproveitamento total dos açúcares (Figura 23) no tratamento com a linhagem

Fleischmann submetida ao estresse térmico ocasionando resultados com diferenças significativas entre os tratamentos através da comparação de médias pelo teste de Tukey.

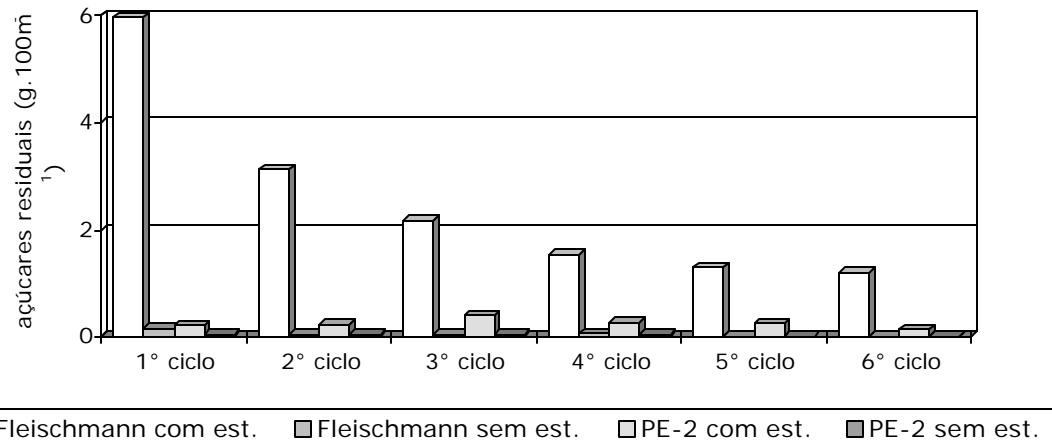


Figura 23 - Concentração de açúcares residuais nos vinhos delevurados ao final de cada ciclo fermentativo realizado com cultura mista de *L. fermentum* CCT-1407 com as linhagens Fleischmann ou PE-2 de *S. cerevisiae*, com ou sem estresse térmico.

O teor de trealose no inóculo (Figura 24), foi similar nos dois tratamentos não submetidos ao estresse térmico. Também ficou evidente a redução do teor de trealose causada pelo estresse térmico, pois nestes dois tratamentos o fermento inicial continha teores de glicerol de 2,31 e 2,26 g.100 g⁻¹ nos tratamentos com as linhagens Fleischmann e PE-2, respectivamente. Ao final do 6º ciclo, o tratamento PE-2 sem estresse térmico atingiu o teor médio de 8,27 g.100 g⁻¹ e o tratamento com a linhagem Fleischmann sem estresse térmico, 7,23 g.100 g⁻¹.

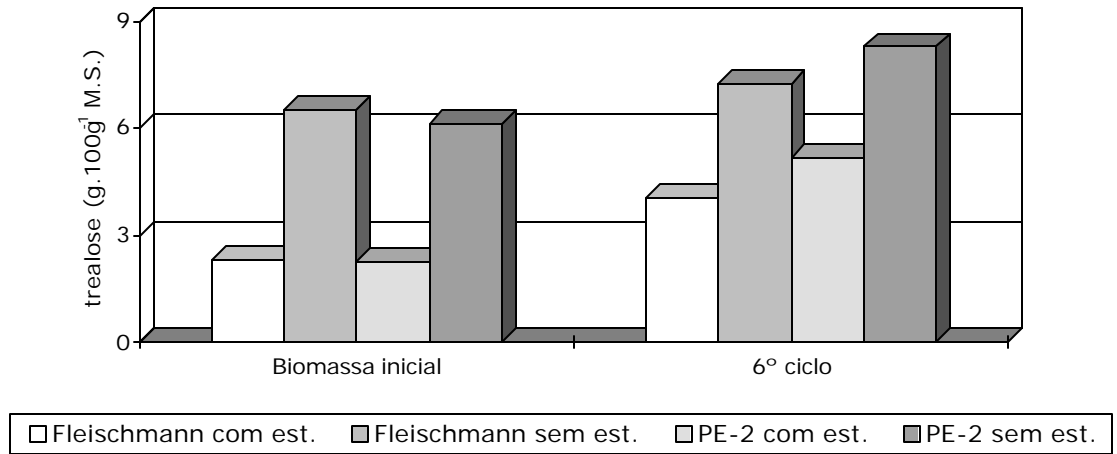


Figura 24 - Concentração de trealose na biomassa, em g.100g⁻¹ de matéria seca (M.S.) na biomassa inicial e após o término do 6º ciclo fermentativo realizado em cultura mista de *L. fermentum* CCT-1407 com as linhagens Fleischmann ou PE-2 de *S. cerevisiae*, com e sem estresse térmico.

A análise dos resultados obtidos sobre a taxa de brotamento não forneceu nenhuma relação com os demais parâmetros avaliados, nem mesmo com peso da biomassa.

4.4 Experimento Comparativo Entre as Linhagens PE-2 e M-26 de *S. cerevisiae* em Cultura Pura e em Cultura Mista com a Bactéria *L. fermentum* CCT 1407 Durante 6 Reciclos Fermentativos

os resultados referentes a este experimento estão apresentados nas Figuras 25 a 35 e Tabelas 19 a 23 (Anexos B) e os resultados das análises estatísticas estão apresentados nas Tabelas 42 e 43 (Anexos C).

As viabilidades celulares (Figura 25) foram similares para todos os tratamentos com uma tendência daqueles com a linhagem M-26 apresentar viabilidades menores no transcorrer dos ciclos fermentativos, contudo, não foi detectada diferença estatística significativa entre tratamentos através da

aplicação do teste F. Houve redução da viabilidade durante o transcorrer dos ciclos fermentativos em todos os tratamentos porém, essa redução não foi acentuada como em outros experimentos devido do menor teor alcoólico deste experimento.

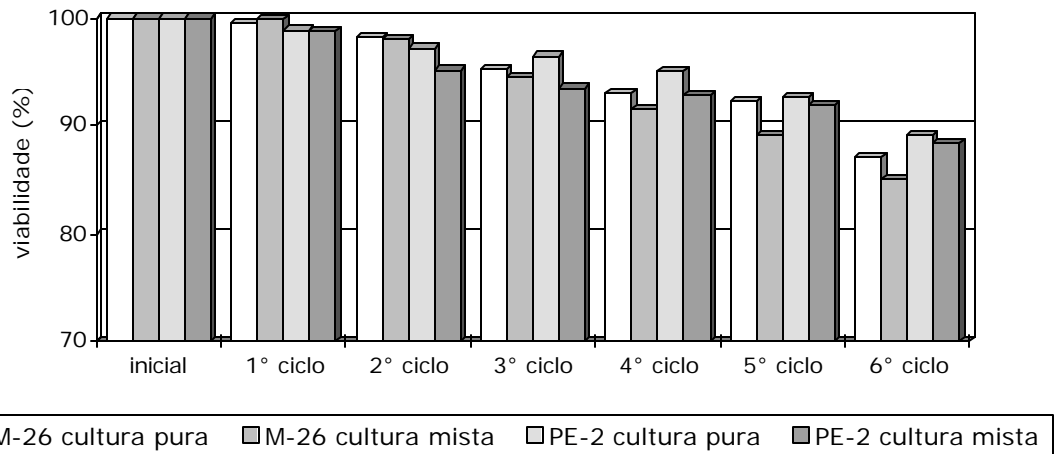


Figura 25 - Viabilidade celular do inóculo e ao final de cada ciclo fermentativo realizados nos tratamentos com as linhagens M-26 ou PE-2 de *S. cerevisiae* em cultura pura e em cultura mista com *L. fermentum* CCT-1407.

Com relação a contaminação bacteriana (Figura 26) houve uma diferença significativa, pelo teste de Tukey, no 2º ciclo fermentativo entre os dois tratamentos em cultura mista em relação aos dois tratamentos sem a inoculação da bactéria. A partir do 3º ciclo fermentativo a contaminação bacteriana presente no tratamento PE-2 cultura mista foi significativa (teste F), sendo mantida a diferença até o final do experimento.

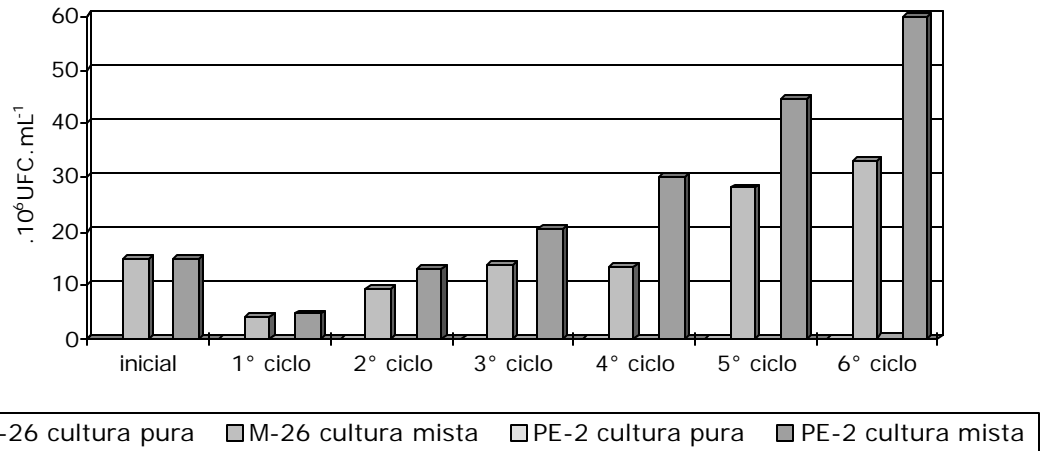


Figura 26 - Contaminação bacteriana inicial e ao final de cada ciclo fermentativo realizados nos tratamentos com as linhagens M-26 ou PE-2 de *S. cerevisiae* em cultura pura e em cultura mista com *L. fermentum* CCT-1407.

Entre os dois tratamentos PE-2 cultura pura e M-26 cultura pura não foi detectada nenhuma diferença estatística significativa para o parâmetro contaminação bacteriana.

A taxa de brotamento (Figura 27) dos dois tratamentos realizados com a linhagem M-26 foram superiores aos tratamentos com a linhagem PE-2. Durante o transcorrer dos ciclos fermentativos a taxa de brotamento do tratamento com a linhagem M-26 cultura pura foi sendo gradativamente reduzida porém, mesmo assim, permaneceu superior aos dois tratamentos com a linhagem PE-2.

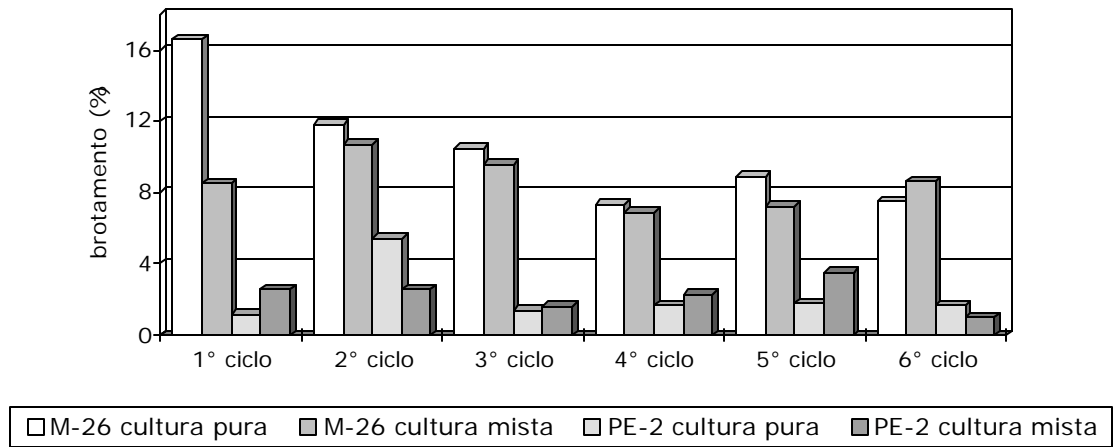


Figura 27 - Brotamento ao final de cada ciclo fermentativo realizados nos tratamentos com as linhagens M-26 ou PE-2 de *S. cerevisiae* em cultura pura e em cultura mista com *L. fermentum* CCT-1407.

Foi inoculada 8 g de biomassa em cada tubo de centrífuga (Figura 28), sendo que ao final de cada ciclo fermentativo ocorreram aumentos de peso da massa centrifugada. A partir do 2º ciclo houve uma redução na formação de massa microbiana, mesmo assim foram detectados aumentos na biomassa em todos os tratamentos testados. A aplicação do teste F revelou não existir diferença estatística entre os tratamentos testados, contudo, observou-se uma tendência da linhagem PE-2 apresentar maior vigor no crescimento, mesmo no tratamento em cultura mista com a bactéria contaminante.

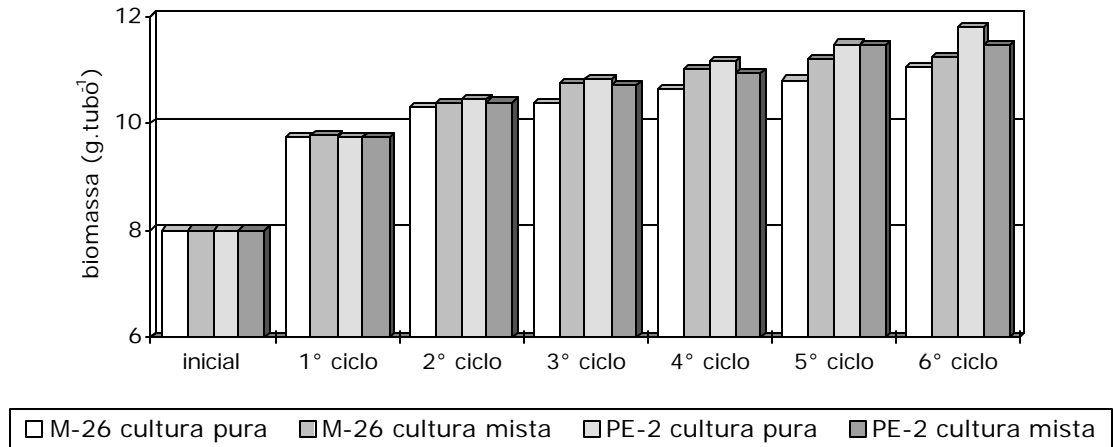


Figura 28 – Biomassa inicial e ao final de cada ciclo fermentativo realizados nos tratamentos com as linhagens M-26 ou PE-2 de *S. cerevisiae* em cultura pura e em cultura mista com *L. fermentum* CCT-1407.

A análise dos resultados obtidos para o parâmetro pH dos vinhos delevurados (Figura 29) Os dois tratamentos nos quais foram inoculados a bactéria apresentaram menores valores de pH que os demais, apresentando relações com a contaminação bacteriana.. A partir do 3º ciclo fermentativo a diferença foi considerada significativa através da aplicação do teste de Tukey. A contaminação bacteriana acidificou os vinhos, especialmente nos últimos ciclos fermentativos pela provável formação de ácido lático.

O tratamento M-26 cultura mista apresentou um menor valor de pH sugerindo maiores produções de ácidos orgânicos pela linhagem. A formação de ácidos orgânicos auxiliaram para a maior ação inibidora da multiplicação bacteriana no tratamento em cultura mista.

O rendimento de fermentação (Figura 30) foi similar em todos os tratamentos, não sendo detectada diferença estatística significativa, através do teste F, em nenhum ciclo fermentativo. Apesar disso, é possível verificar uma tendência dos dois tratamentos em cultura mista, independente da linhagem de levedura, apresentarem valores inferiores aos tratamentos em cultura pura.

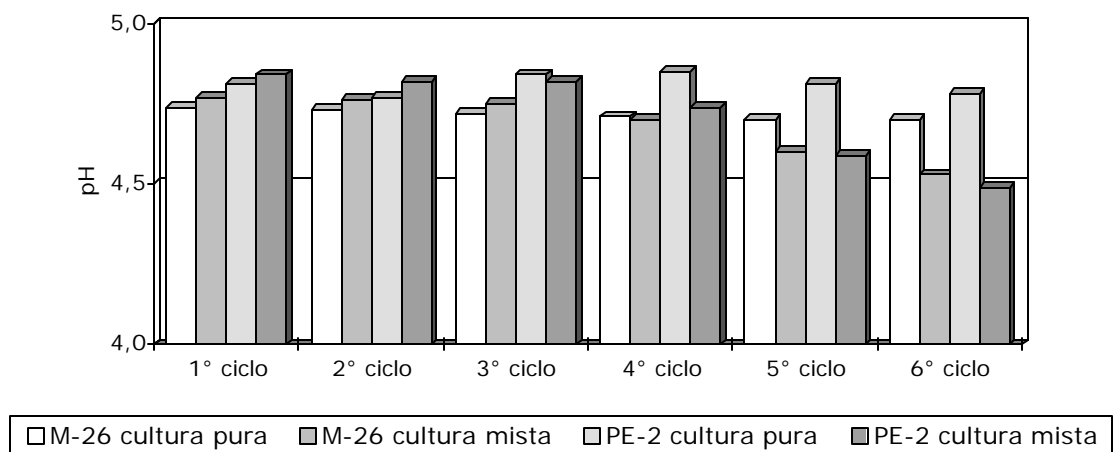


Figura 29 - pH dos vinhos delevurados ao final de cada ciclo fermentativo realizados nos tratamentos com as linhagens M-26 ou PE-2 de *S. cerevisiae* em cultura pura e em cultura mista com *L. fermentum* CCT-1407.

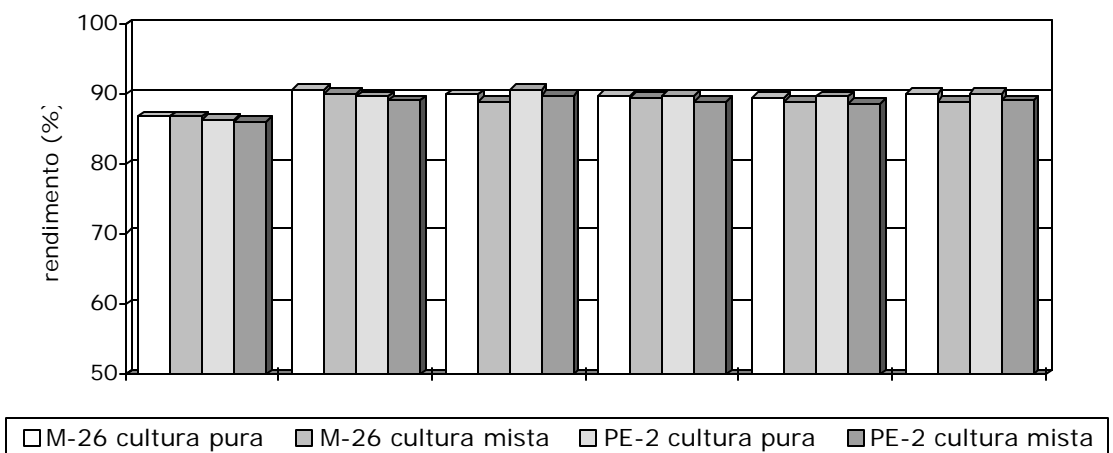


Figura 30 - Rendimento fermentativo ao final de cada ciclo fermentativo realizados nos tratamentos com as linhagens M-26 e PE-2 de *S. cerevisiae* em cultura pura e em cultura mista com *L. fermentum* CCT-1407.

Foi verificada uma tendência dos tratamentos com cultura mista, independentemente da linhagem de levedura, apresentarem teores alcoólicos

inferiores aos tratamentos sem a inoculação de bactéria (Figura 31). Apesar dessa tendência, a análise dos resultados demonstrou que não houve diferença estatística significativa (teste F) entre os tratamentos.

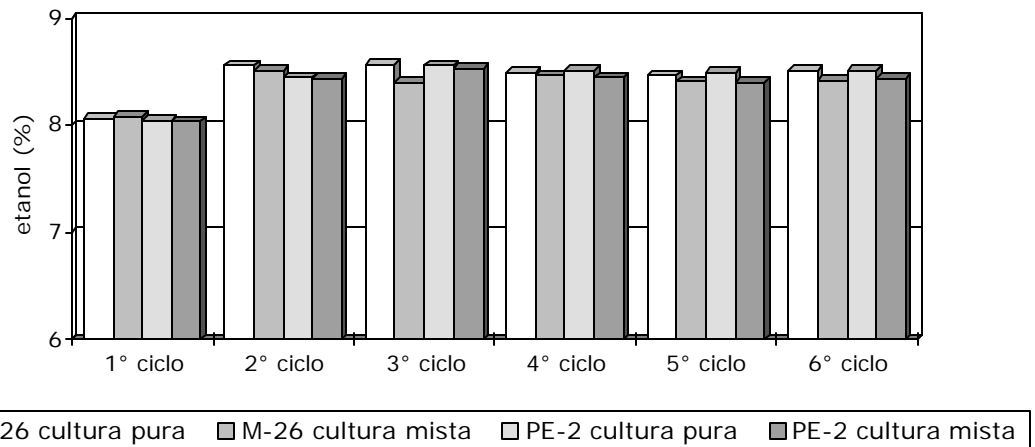


Figura 31 - Teores alcoólicos dos vinhos ao final de cada ciclo fermentativo realizados nos tratamentos com as linhagens M-26 e PE-2 de *S. cerevisiae* em cultura pura e em cultura mista com *L. fermentum* CCT-1407.

Nas concentrações de glicerol nos vinhos delevurados (Figura 32) também não foi detectado diferença estatística significativa através da aplicação do teste F. Houve redução da concentração de glicerol no 3º e 4º ciclo fermentativo devido a menor formação de biomassa. Os resultados obtidos a partir do 4º ciclo fermentativo demonstram que os tratamentos com cultura mista, quando comparadas as linhagens de levedura separadas, produziram mais glicerol que os tratamentos sem a inoculação da bactéria.

A concentração de açúcares residuais nos vinhos delevurados (Figura 33) foi baixa para todos os tratamentos, além disso foi bastante variável no transcórre dos ciclos não apresentando relação com as demais variáveis. É possível inferir que praticamente todo o AT presente no mosto de fermentação foi metabolizado pelas leveduras.

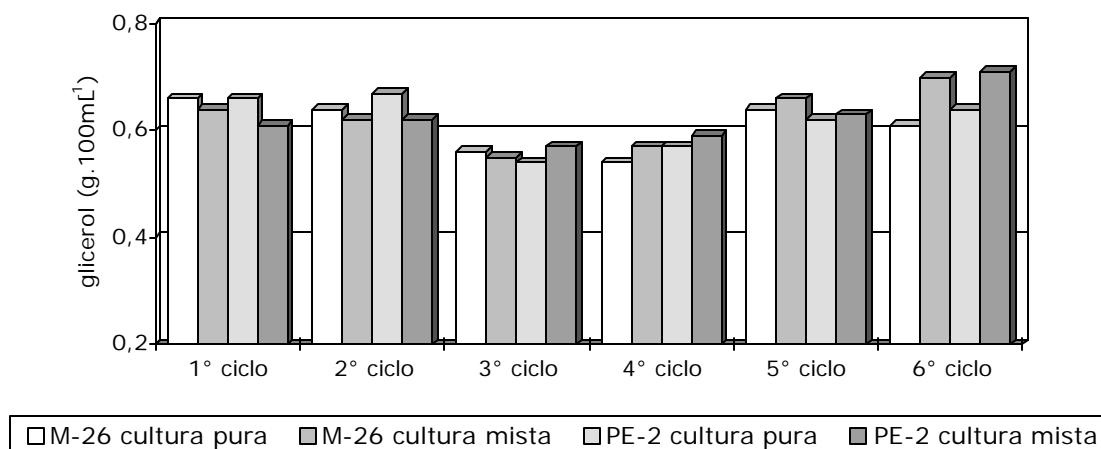


Figura 32 - Concentração de glicerol nos vinhos delevurados ao final de cada ciclo fermentativo realizados nos tratamentos com as linhagens M-26 ou PE-2 de *S. cerevisiae* em cultura pura e em cultura mista com *L. fermentum* CCT-1407.

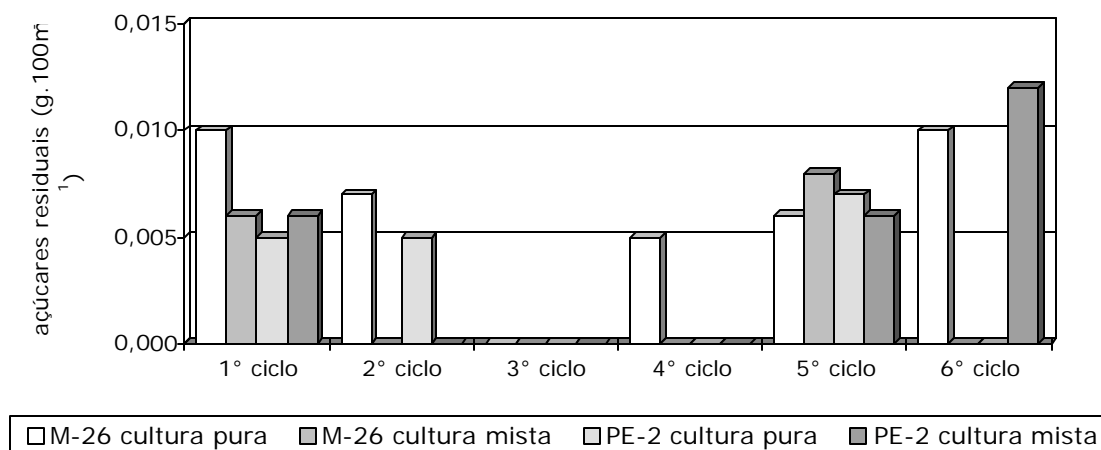


Figura 33 - Concentração de açúcares residuais nos vinhos delevurados ao final de cada ciclo fermentativo realizados nos tratamentos com as linhagens M-26 ou PE-2 de *S. cerevisiae* em cultura pura e em cultura mista com *L. fermentum* CCT-1407.

Os resultados do desprendimento de CO₂ realizado durante a fermentação (Figura 34) foram similares entre os tratamentos, além de

metabolizarem praticamente todo o AT disponível a velocidade foi similar, encerrando a fermentação tumultuosa antes de completar 8 h.

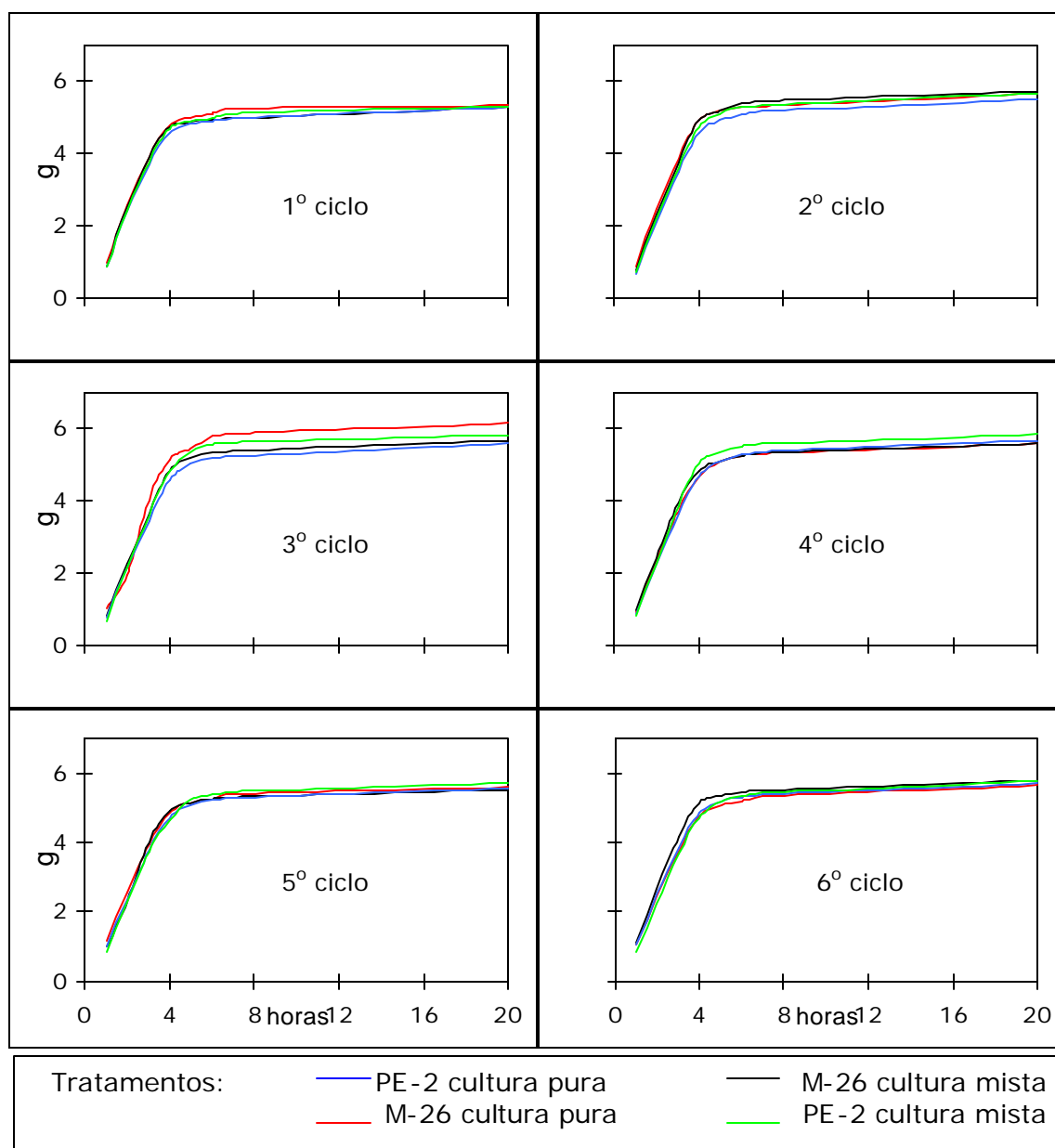


Figura 34 - Evolução do desprendimento de CO₂ no transcorrer de cada ciclo fermentativo realizados nos tratamentos com as linhagens M-26 ou PE-2 de *S. cerevisiae* em cultura pura e em cultura mista com *L. fermentum* CCT-1407.

Com relação ao teor de trealose (Figura 35) no inóculo, os dois tratamentos com a linhagem PE-2 apresentaram teores mais elevados que os dois tratamentos com a linhagem M-26. A mesma situação foi observada na biomassa oriunda do 6^o ciclo fermentativo.

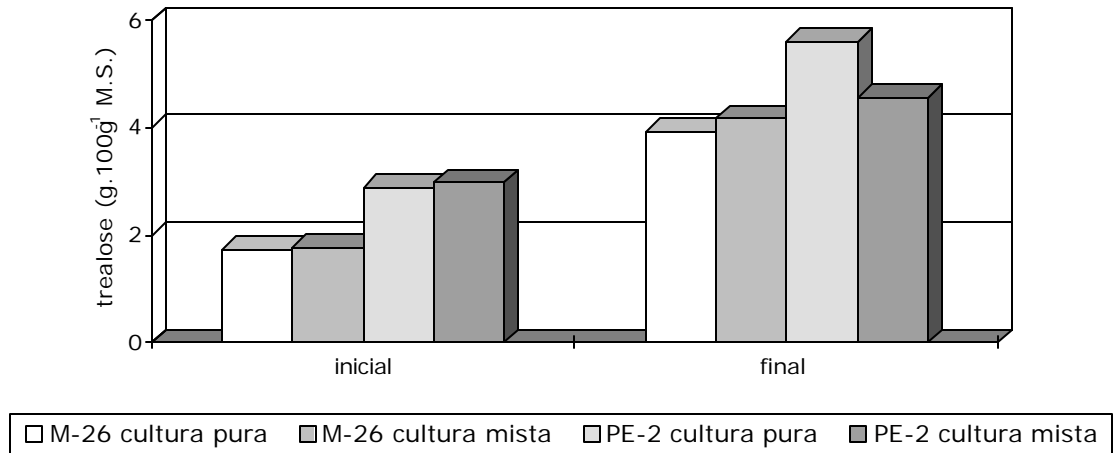


Figura 35 - Concentração de trealose na biomassa ao final de cada ciclo fermentativo realizados nos tratamentos com as linhagens M-26 ou PE-2 de *S. cerevisiae* em cultura pura e em cultura mista com *L. fermentum* CCT-1407.

5 DISCUSSÃO

5.1 Plaqueamentos de Cultura de *L. fermentum* CCT 1407 (Amostra A) e de Cultura Mista de *S. cerevisiae* e *L. fermentum* CCT 1407 (amostra B)

A análise dos resultados obtidos no plaqueamento, tanto da cultura de *L. fermentum* CCT 1407 (amostra A) quanto da amostra de cultura mista da bactéria com *S. cerevisiae* (amostra B) evidencia que as duas metodologias possibilitaram a obtenção de resultados similares não sendo detectada diferença significativa através da aplicação do teste F. Os valores obtidos atenderam as exigências do experimento e foram perfeitamente aceitáveis do ponto de vista microbiológico.

Ocorreu maior variância dos resultados pelo método de microplaqueamento em gotas nas duas amostras testadas. Esse fato pode ser compensado através da realização do maior número possível de repetições, procedimento que pode ser executado devido à rapidez no qual podem ser realizadas as repetições.

A escolha de uma metodologia para o acompanhamento de um trabalho de pesquisa envolve diversos fatores e, neste caso, o microplaqueamento possibilitou um acompanhamento mais freqüente do processo pois o número de placas necessárias, assim como a quantidade de meio de cultura e o volume de material em incubação foram menores que o necessário para a execução do plaqueamento convencional. Portanto, optou-se em utilizar o microplaqueamento em todos os ciclos fermentativos, pois não haveria essa possibilidade com o uso de plaqueamento em profundidade.

Com relação à execução da técnica do microplaqueamento em gotas foi possível avaliar, através da execução de vários testes, os seguintes pontos:

- ❖ A padronização dos procedimentos é muito importante para a obtenção de resultados com menor variância.
- ❖ Não foi necessário substituir a ponteira da pipeta para cada repetição de cada diluição, sendo possível utilizar a mesma ponteira para as cinco repetições. A ponteira da pipeta foi substituída para o plaqueamento de diluições diferentes.
- ❖ A utilização de gotas com 12 μL foi adequado para que não ocorresse escorrimento das gotas sobre o meio de cultivo.
- ❖ O uso de gotas de 15 μL prejudicou a contagem de colônias, pois ocorria o escorrimento e a união de duas gotas.
- ❖ O pipetador utilizado foi da marca BRAND com capacidade máxima de 0,050 mL e atendeu perfeitamente as necessidades.
- ❖ O tempo de incubação não foi reduzido sendo os melhores resultados obtidos com incubação das placas durante 48 h a 32 °C.
- ❖ A execução de 5 repetições de cada diluição foi o número máximo possível de repetições para a viabilização do uso da metodologia durante a execução dos experimentos de ciclos fermentativos. Acima de 5 repetições ocorreu aumento no tempo necessário para o plaqueamento e do número de placas dificultando a execução do plaqueamento e reprodução dos resultados.

O uso de 5 repetições de cada diluição não atendeu às exigências para a aplicação do teste F, mesmo assim foi optado por essa metodologia devido às condições de infraestrutura e devido ao número de plaqueamentos, pois a cada ciclo foi realizado o plaqueamento de 12 unidades experimentais em 4 diluições diferentes e 5 repetições de cada diluição.

5.2 Experimentos de Fermentação em Ciclos Fermentativos

A manutenção da viabilidade é uma das características mais desejadas na busca por linhagens de leveduras adaptadas às condições industriais de produção de etanol, portanto, é um importante parâmetro para a avaliação dos efeitos causados pela contaminação bacteriana durante a fermentação. Muitos fatores influem sobre a viabilidade, com destaque para: temperatura, teor alcoólico, contaminação bacteriana, ácidos orgânicos e o uso de mosto composto com mel diluído em água (Alves, 2000; Basso et al., 1997; Ngang et al., 1989; D'Amore et al., 1988; Narendranath et al., 1997)

Neste trabalho foram realizados experimentos comparativos entre linhagens de *S. cerevisiae* e a análise dos resultados obtidos revela que as linhagens M-26 e PE-2 demonstraram maior capacidade de manter a viabilidade que a linhagem Fleischmann. As características de persistência e resistência aos estresses da fermentação já foram relatadas para a linhagem PE-2 por Basso & Amorim (1996). Cabe ressaltar que a linhagem PE-2 foi isolada de processos industriais e apresenta adaptações fisiológicas que contribuem para a manutenção da viabilidade durante a fermentação com reciclos.

Thomas, et al., (2001) pesquisaram o efeito de fermentação em batelada com cultura mista para a fermentação de mosto a base de milho e relataram que a presença de *L. fermentum* provocou decréscimo na produção de etanol, aumento do desvio de carboidratos para a produção de glicerol e ácido láctico, queda da viabilidade da levedura, redução na formação de massa celular da levedura e inibição no desenvolvimento da bactéria.

Alves (2000) também comparou o comportamento das linhagens Fleischmann e PE-2 durante a fermentação alcoólica e relatou que a primeira tem maior atividade de invertase, sendo possível que a rápida hidrólise de sacarose exerça um estresse osmótico. Esta característica também poderia estar interligada com a baixa capacidade de permanência da linhagem Fleischmann em processos industriais, pois a rápida atividade de invertase está relacionada com a síntese e o acúmulo de glicerol intracelular

Além do estresse osmótico exercido pela maior atividade invertásica da linhagem Fleischmann também ocorre a rápida disponibilidade de

glicose e de frutose para os contaminantes bacterianos, e dessa forma poderiam ocorrer estímulos à multiplicação bacteriana. No entanto, Carvalho (2001) não verificou influência da atividade de invertase sobre a contaminação bacteriana durante a fermentação em reciclos.

Carvalho (2001) pesquisou a influência de linhagens de levedura sobre a multiplicação *L. fermentum* CCT 1407 através do cultivo da bactéria em vinhos provenientes de fermentações realizadas com as linhagens Fleischmann e PE-2. Os vinhos foram suplementados com glicose e extrato de levedura e inoculados com a bactéria. O autor não relatou nenhum estímulo ou repressão ao crescimento bacteriano gerado pelo vinho quando comparadas linhagens distintas de *S. cerevisiae*.

Uma observação realizada em unidades industriais que utilizam linhagens selecionadas de *S. cerevisiae* é a capacidade da linhagem PE-2 adaptar-se em unidades que produzem vinhos com teores alcoólicos elevados. Portanto esta é uma linhagem apta às condições experimentais utilizadas nesta pesquisa, devido ao teor alcoólico elevado, algumas vezes acima de 90 mL.L^{-1} .

Outra constatação foi a queda de viabilidade da linhagem Fleischmann, sempre maior que a ocorrida com a linhagem PE-2, durante fermentações em reciclos. Comportamento similar já foi relatado por Aranha (2002), Carvalho (2001) e Silva (2001) em experimentos executados em laboratório, sendo que Basso et al. (1988) constataram que a linhagem Fleischmann também apresenta baixa capacidade de persistir em fermentações industriais. Os estresses existentes na fermentação provocam reduções da viabilidade da levedura, no entanto, também ocorrem reduções na viabilidade celular devido à recirculação da levedura, pois a centrifugação não seleciona apenas as células viáveis. Assim sendo, a recirculação de fermento promove um estímulo a multiplicação bacteriana devido ao enriquecimento do meio causado pelas proteínas hidrolizadas e aminoácidos provenientes das células de leveduras. A autólise da célula de *S. cerevisiae* pode disponibilizar até 30% do nitrogênio total, sendo que os aminoácidos podem corresponder a 25% dessa parcela (Lurton et al., 1989).

A relação inversa entre a viabilidade celular da levedura e a contaminação bacteriana ocorre com frequência, sendo sugeridos vários mecanismos que causam inibição à multiplicação bacteriana ou a atividade fermentativa da levedura (Altherthum et al., 1984, Amorim & Oliveira, 1982, Oliva-Neto & Yokoya, 1994, Ngang et al., 1992 e Thomas et al., 2001).

A análise da relação entre viabilidade e contaminação é importante, pois já foi sugerido que a linhagem Fleischmann seria capaz de exercer ação antibacteriana maior que a PE-2 principalmente enquanto as viabilidades celulares permanecessem elevadas. A ação inibidora exercida pela linhagem Fleischmann seria devido a maior produção de ácidos orgânicos, principalmente dos ácidos málico e succínico, pois a linhagem Fleischmann produziu 30% mais ácido málico que a linhagem PE-2 (Alves, 2000).

Basso et al. (1997) também pesquisaram a ação do ácido succínico, o qual atuaria sinergisticamente com o etanol, ocasionando uma ação antibacteriana. O autor cita que o vinho exerce a ação antibacteriana pois durante a fermentação são produzidos o ácido succínico e o etanol.

No presente trabalho observou-se que, durante os primeiros ciclos fermentativos, a contaminação bacteriana foi menor nos vinhos provenientes dos tratamentos realizados com a linhagem Fleischmann, em comparação àqueles com a PE-2. Com o transcorrer dos ciclos fermentativos ocorreram reduções na viabilidade nos tratamentos com a linhagem Fleischmann e aumento da população bacteriana em níveis superiores aos observados nos tratamentos com a linhagem PE-2. Esse fato reforça a influência da viabilidade celular sobre a multiplicação bacteriana devido ao estímulo provocado pela autólise das células da levedura e a liberação de aminoácidos, conforme sugerido por Oliva-Neto & Yokoya (1997).

Para fermentações industriais, as contaminações bacterianas acima de $5,0 \cdot 10^6$ UFC.mL⁻¹ são consideradas prejudiciais, acima de $1,0 \cdot 10^7$ UFC.mL⁻¹ os prejuízos econômicos são significativos e acima de $1,0 \cdot 10^8$ UFC.mL⁻¹ ocorrem quedas nos rendimentos fermentativo e industrial, dificuldades de operação de centrífugas, floculação e aumento de consumo de ácido sulfúrico e de antibióticos.

Além do efeito estressante exercido pela contaminação bacteriana sobre a levedura também houve o efeito estressante provocado pelo etanol, pois foi observado que os experimentos com teor alcoólico mais elevado provocaram maiores redução na viabilidade, principalmente quando combinado com um estresse térmico, confirmando o proposto por Brosnan et al. (2000) e D'Amore & Stewart (1987).

Nos experimentos com ciclos fermentativos realizados neste trabalho foi observado o aumento da produção de glicerol nos tratamentos que apresentaram contaminações mais elevadas. Os resultados estão de acordo com o publicado por Thomas et al. (2001) e pode-se especular que o glicerol poderia estar sendo formado em maiores quantidades nos tratamentos com contaminações elevadas para reduzir os efeitos dos estresses aos quais a levedura foi submetida.

A trealose é um carboidrato que confere proteção contra agentes estressantes, porém não há um consenso sobre concentrações limitantes. Sabe-se que reduções nos teores de trealose afetam a integridade da membrana celular, e dessa forma, afetam a viabilidade celular (Walker, 1998; Wienken, 1990 e Thevelein, 1984). Outra função que também é atribuída à trealose é a capacidade das leveduras com habilidade de acumular trealose suportarem melhor os estresses da fermentação (Pataro, 2000). A relação entre o teor de trealose e a viabilidade celular das linhagens observadas neste trabalho permite confirmar tal relação, pois em todos os experimentos realizados foi observada uma relação positiva entre o teor de trealose e a viabilidade celular, independente da linhagem de levedura avaliada.

Com relação à execução dos experimentos, os procedimentos utilizados não impossibilitaram a multiplicação do microrganismo contaminante. Essa condição foi importante para avaliar os efeitos da multiplicação bacteriana sobre os parâmetros avaliados. Devido aos resultados obtidos é possível inferir que o tratamento ácido do fermento não impediu o aumento da contaminação bacteriana em nenhum dos experimentos realizados, portanto o tratamento ácido não foi suficiente para controlar a contaminação bacteriana.

Houve uma redução na contaminação bacteriana ao final do 1º ciclo, em relação ao inoculado, em todos os experimentos, fato atribuído à adaptação do microrganismo às condições dos mostos e vinhos (pH, teor de açúcares e etanol) e de ocorrência normal em experimentos em cultivo misto de microrganismos. É possível que durante o transcorrer dos ciclos fermentativos a autólise de células de levedura supra alguma deficiência do mosto e então estimule o desenvolvimento bacteriano. Outra hipótese é a ação antibacteriana exercida pela própria fermentação a qual poderia estar selecionando uma população bacteriana com capacidade de se adaptar às condições de fermentação.

A determinação da acidez do vinho apresenta relações com a contaminação sendo um parâmetro que pode ser utilizado para avaliar diretamente a contaminação bacteriana, além de ser um parâmetro bastante referenciado na bibliografia como influente sobre a viabilidade celular (Amorim & Oliveira, 1982; Ngang et al., 1989; Pampulha & Loureiro, 1989, e Viegas, et al., 1989) Apesar disso, optou-se pela realização do plaqueamento para a contagem bacteriana em substituição a acidez por considerar a contagem mais pertinente para o experimento. Não resta dúvida que os ácidos orgânicos estão envolvidos no processo de inibição de bactérias contaminantes e sugere-se avaliar esse parâmetro na fermentação.

5.2.1 Experimento de Fermentação em Reciclos Fermentativos Com as Linhagens Fleischmann e PE-2 de ***S. cerevisiae*** em Cultura Mista Com ***L. fermentum*** CCT 1407.

Os efeitos dos estresses provocados pela fermentação refletiram sobre a viabilidade celular, porém os dois tratamentos com a linhagem PE-2 apresentaram viabilidades elevadas enquanto os dois tratamentos com a linhagem Fleischmann apresentaram reduções significativas. Os dois tratamentos com a linhagem Fleischmann apresentaram maiores contaminações provavelmente devido a liberação de aminoácidos pela autólise e conseqüente

estímulo à multiplicação bacteriana. Nos dois tratamentos com a adição de extrato de levedura também houve estímulo na multiplicação bacteriana, sendo mais acentuado no tratamento Fleischmann com ext. confirmando as publicações de Oliva-Neto & Yokoya (1997) e Lurton et al. (1989). O pH do vinho delevurado também indica que houve a maior formação de ácidos nos dois tratamentos com a linhagem Fleischmann.

A partir do 5º ciclo fermentativo, os dois tratamentos com a linhagem Fleischmann, apresentaram viabilidade celular abaixo de 50% o que ocasionou dificuldades operacionais de executar a centrifugação. Nos dois tratamentos com a linhagem PE-2, não ocorreu uma queda tão proeminente na viabilidade e dessa forma a centrifugação da biomassa foi mais facilmente executada.

Os menores rendimentos e teores alcoólicos apresentados pelos dois tratamentos com a linhagem Fleischmann foram conseqüências dos estresses, da redução de viabilidade e aumento da contaminação ocorridas em tais tratamentos durante o transcorrer do experimento. É interessante ressaltar que os tratamentos com a linhagem PE-2 terminaram o 6º ciclo com teores de trealose mais elevados, pois a síntese de trealose utiliza o substrato e reduz o rendimento fermentativo.

Apesar da contaminação bacteriana, os dois tratamentos com a linhagem PE-2 mantiveram o rendimento fermentativo próximo a 90%, o que pode ser considerado elevado para fermentações com níveis de contaminação de 10^7 UFC.mL⁻¹. Sem dúvida, um fator importante foi o tempo de fermentação (20 h) necessário para a execução do experimento. Caso a fermentação fosse interrompida em 7-9 h, como ocorre em fermentações industriais, os rendimentos seriam inferiores aos apresentados.

A elevação do rendimento fermentativo do tratamento Fleischmann com extrato de levedura ao término do 6º ciclo pode ser uma conseqüência da centrifugação devido a viabilidade celular reduzida do tratamento citado, o que pode ter ocasionado um erro na determinação da biomassa que, por sua vez, influenciou diretamente o cálculo do rendimento fermentativo.

No transcorrer dos ciclos fermentativos, os tratamentos com a linhagem Fleischmann apresentaram maiores contaminações e maiores formações de glicerol. O desvio de açúcar para formação de glicerol e provavelmente ácido lático, pela bactéria, estariam envolvidos na redução no teor alcoólico e no rendimento fermentativo dos dois tratamentos com a linhagem Fleischmann.

Além de estar envolvido no balaço de redox, o glicerol desempenha uma importante função fisiológica, pois é um protetor osmótico (Cronwright et al., 2002 e Oura, 1977). Os tratamentos nos quais foi adicionado extrato de levedura apresentaram menores teores de glicerol em relação aos demais tratamentos, por sua vez, os teores de glicerol foram maiores nos dois tratamentos com a linhagem Fleischmann os quais apresentaram as maiores contaminações bacterianas ao final do 6º ciclo fermentativo. A relação semelhante foi obtida por Alves (2000) na comparação entre linhagens em fermentação com cultura pura da levedura.

A diferença no desprendimento de CO₂ ao final dos ciclos fermentativos reflete diferenças no rendimento fermentativo, pois são carboidratos que não foram fermentados até CO₂ e permaneceram com açúcares não fermentados ou então foram desviados para a formação de outros compostos reduzindo o teor alcoólico final do vinho. Os dois tratamentos com a linhagem Fleischmann apresentaram viabilidades reduzidas e maiores contaminações, esses fatores causaram redução da velocidade da fermentação e do rendimento fermentativo, comportamento descrito por Alterthum et al. (1984); Narendranath (1994); Novaes (1992) e Thomas et al. (2001);

Através do teor de trealose presente na massa celular é possível avaliar as condições estressantes existentes durante a fermentação (Wienken, 1990, Patato, 2000). Neste caso, os dois tratamentos com a linhagem Fleischmann apresentaram menores teores de trealose ao final do 6º ciclo fermentativo em relação aos tratamentos com a linhagem PE-2. Devido a essa informação, pode-se inferir que os estresses provocados pelos ciclos fermentativos afetaram menos a linhagem PE-2 que a linhagem Fleischmann.

Os teores de açúcares residuais foram variáveis, contudo, nos dois tratamentos com a linhagem Fleischmann foram inferiores ao esperado quando se considera o teor alcoólico de tais tratamentos.

Em uma análise final do experimento o estresse foi mais acentuado para a linhagem Fleischmann em relação à PE-2 pois aquela apresentou redução da viabilidade e do rendimento fermentativo e aumento da contaminação bacteriana, do teor de glicerol e do tempo de fermentação.

5.2.2 Experimento de Fermentação Durante 6 Reciclos em Cultura Mista de *L. fermentum* CCT 1407 Com as Linhagens Fleischmann e PE-2 de *S. cerevisiae* Submetidas a Estresse Térmico.

Para o início do experimento foi realizado um tratamento térmico no inóculo de dois tratamentos, um de cada linhagem de *S. cerevisiae*, provocando redução da viabilidade do inóculo. Além disso, a concentração de açúcares no mosto e na contaminação bacteriana no inóculo foi elevada para intensificar os efeitos estressantes da fermentação.

O estresse térmico realizado nos dois tratamentos reduziu a viabilidade e o teor de trealose para valores semelhantes para os dois tratamentos, isso permitiu inferir que os tratamentos com estresse térmico iniciaram o 1º ciclo fermentativo em condições similares, ao se comparar as linhagens.

A pronunciada queda de viabilidade verificada nos 4 tratamentos durante o transcorrer dos ciclos fermentativos foi consequência das condições estressantes nas quais o experimento foi conduzido, principalmente o teor alcoólico elevado e o inóculo bacteriano utilizado. Neste experimento foram reforçadas as condições estressantes da fermentação para comparar o comportamento das duas linhagens de *S. cerevisiae* em condições adversas.

A queda da viabilidade celular, aliada aos estresses causados pela temperatura, teor alcoólico, autólise e liberação de aminoácidos foram os agentes promotores da elevação da contaminação bacteriana principalmente

nos dois tratamentos com a linhagem Fleischmann. A contaminação bacteriana atingiu populações acima de $2,0 \cdot 10^8$ UFC.mL⁻¹ nos dois tratamentos submetidos ao estresse térmico, independente da linhagem de levedura.

De modo geral, nos dois tratamentos com a linhagem PE-2 ocorreram maiores contaminações bacterianas durante os três ciclos fermentativos iniciais e a partir do 4º ciclo a contaminação passou a ser menor, em relação aos dois tratamentos com a linhagem Fleischmann, provavelmente, como consequência da maior viabilidade celular apresentada pela linhagem PE-2 ao longo dos ciclos. Essa é uma característica também observada durante a execução de experimentos preliminares para ajustar os procedimentos e metodologias. Tais resultados reforçam a influência da autólise das células sobre a contaminação bacteriana conforme relatado por Oliva-Neto & Yokoya (1997).

Outro fator importante é a maior produção de ácidos orgânicos pela linhagem Fleischmann em relação a PE-2, que poderia estar exercendo juntamente com o etanol, uma ação antibacteriana maior que a realizada pela PE-2. Devido a autólise das células durante o transcorrer dos ciclos fermentativos ocorreu um estímulo ao desenvolvimento bacteriana que foi maior que a ação inibidora. Nos tratamento com a linhagem PE-2 mesmo com menor produção de ácidos orgânicos a redução da viabilidade foi menor causando menor estímulo a atividade bacteriana.

Os tratamentos com os menores rendimentos fermentativos foram aqueles que apresentaram maiores taxas de contaminação bacteriana e menores viabilidades independente da linhagem de levedura avaliada. Os resultados estão de acordo com os relatos de Novaes (1992), que considerou a contaminação bacteriana um problema na indústria, pois afeta a viabilidade reduz a produtividade e o rendimento fermentativo.

Os resultados sobre o rendimento fermentativo confirmam a maior adaptabilidade da linhagem PE-2 às condições nas quais foram realizados os experimentos, pois os tratamentos com a linhagem PE-2 apresentaram rendimentos maiores que os tratamentos similares com a linhagem Fleischmann, mesmo com a redução da viabilidade verificada em todos os tratamentos. A queda no rendimento fermentativo reflete a redução na

formação de etanol, a elevação da concentração de açúcares residuais nos vinhos e o aumento da formação de glicerol.

A redução do rendimento fermentativo quando são comparados os dois tratamentos com a linhagem Fleischmann foi 16,2% e com a linhagem PE-2 foi 6,0% ao término do 6º ciclo fermentativo. A queda de rendimento foi menor que a publicada por Alterthum et al. (1984), pois os autores utilizaram contaminações bacterianas, em alguns ciclos acima de 3.10^9 UFC.mL⁻¹, superiores as utilizadas neste experimento. Sem dúvida, o aumento da contaminação reduziria ainda mais o rendimento fermentativo. Os resultados obtidos neste experimento diferem daqueles publicados por Chin & Ingledew (1984) quando a inoculação 1.10^8 UFC.mL⁻¹ de *L. fermentum* não afetou a produção de etanol em fermentação de mosto de trigo, no entanto, em tal trabalho não se efetuou ciclos fermentativos.

A formação de glicerol foi resultado da maior taxa de crescimento da linhagem Fleischmann, além de resposta aos estresses provocados pela contaminação bacteriana. Nos tratamentos submetidos ao estresse térmico houve reduções das viabilidades, porém, os pesos de biomassa ao final do 6º ciclo foram próximos para todos os tratamentos permitindo especular que as células que permaneceram viáveis nos tratamentos submetidos ao estresse térmico puderam recompor a biomassa. A maior produção de glicerol pela linhagem Fleischmann é concordante com resultados obtidos em experimentos nos quais a produção de glicerol foi maior para a linhagem Fleischmann que para a PE-2 (Alves, 2000 e Carvalho, 2001).

A evolução do desprendimento de CO₂ no transcorrer da fermentação representa a velocidade na qual foi realizada a fermentação. Espera-se que uma linhagem de levedura com aptidão para uso industrial seja capaz de promover a fermentação de mostos em 7 a 8 h. Através da Figura 22 é possível visualizar que, caso a fermentação fosse interrompida 8 h após a alimentação os dois tratamentos com a linhagem Fleischmann e o tratamento PE-2 com estresse apresentariam rendimentos fermentativos muito inferiores ao tratamento PE-2 sem estresse.

A tendência da linhagem PE-2 apresentar teores mais elevados de trealose que a linhagem Fleischmann já foi relatada outras vezes, sendo que Silva (2001) relatou teores de trealose na biomassa de 9,32 e 8,54 g.100g⁻¹ ao final do 6º ciclo fermentativo. Matiazi (1995) comparou o acúmulo de trealose e o crescimento de leveduras e relatou uma relação entre os dois parâmetros. Os resultados deste experimento também demonstraram uma correlação positiva entre o acúmulo de trealose e o peso de biomassa.

O resumo dos resultados deste experimento foram semelhantes ao anterior com redução da viabilidade e do rendimento fermentativo e aumento da contaminação bacteriana, do teor de glicerol e do tempo de fermentação dos tratamentos com a linhagem Fleischmann em comparação àqueles com a PE-2.

5.2.3 Experimento Comparativo Entre as Linhagens PE-2 e M-26 de *S. cerevisiae* em Cultura Pura e em Cultura Mista com a Bactéria *L. fermentum* CCT 1407 Durante 6 Reciclos Fermentativos

Neste experimento foi detectada diferença estatística significativa, através da aplicação do teste F, somente para os parâmetros contaminação bacteriana e pH do vinho delevurado. Entre os tratamentos dos demais parâmetros não houve diferença estatística significativa.

O fato de não haver diferenças nas viabilidades celulares possibilitou inferir que a contaminação não foi influenciada pela viabilidade diferenciada dos tratamentos como aconteceu em outros experimentos nos quais foi utilizada a linhagem Fleischmann. Portanto, é possível considerar que não houve estímulo diferenciado a atividade bacteriana devido a maior ou menor autólise para qualquer dos tratamentos. Essa condição foi importante para a

Os resultados da comparação de médias, pelo teste Tukey, do parâmetro contaminação bacteriana revelou haver diferença significativa entre os dois tratamentos em cultura pura em relação aos dois tratamentos em cultura mista no 2º ciclo fermentativo, independente da linhagem de levedura

avaliada. A partir do 3º ciclo fermentativo o tratamento PE-2 cultura mista foi considerado diferente do tratamento M-26 cultura mista, sendo esta diferença mantida até o término do experimento. A contaminação maior no tratamento com a linhagem PE-2, em relação ao tratamento com a linhagem M-26, demonstra que as duas linhagens de *S. cerevisiae*, podem exercer uma interação diferenciada com a bactéria.

Neste experimento não houve a relação entre viabilidade e contaminação bacteriana observada nos demais experimentos e discutida na literatura (Altherthum et al., 1984, Amorim & Oliveira, 1982, Oliva-Neto & Yokoya, 1994, Ngang et al., 1992 e Thomas et al., 2001). Apesar de não haver diferença estatística entre os tratamentos para o parâmetro viabilidade observa-se uma tendência de maior redução nos tratamentos com a linhagem M-26. Esse fato sugere que ocorre uma inibição maior que o estímulo devido à autólise de células.

Quando foram comparadas as médias (teste Tukey) do parâmetro pH do vinho delevurado houve diferenciação dos dois tratamentos em cultura pura com os dois tratamentos em cultura mista, independente da linhagem de levedura. Novamente foi constatada uma relação entre pH e contaminação bacteriana, sendo que o tratamento PE-2 cultura mista apresentou a maior contaminação e o menor valor de pH devido a formação de ácidos orgânicos pela bactéria. Nos primeiros ciclos fermentativos o valor de pH do vinho delevurado foi menor nos tratamentos com a linhagem M-26, com o transcorrer dos ciclos houve aumento da população bacteriana principalmente no tratamento com a linhagem PE-2 e então o valor do pH do vinho passou a ser menor nesses tratamentos.

Segundo Basso et al. (1997) o ânion succinato em efeito sinérgico com o etanol poderia exercer ação antibacteriana. Alves (2000) reforça a possibilidade de que a ação inibidora a multiplicação bacteriana seja exercida por ácidos orgânicos em ação sinérgica com o etanol.

Com relação ao rendimento fermentativo, este foi elevado para todos os tratamentos com uma tendência de redução nos tratamentos em cultura mista, provavelmente a realização de mais ciclos fermentativos

resultaria em diferença estatística significativa em relação aos tratamentos em cultura pura. Este resultado reforça o potencial para uso industrial da linhagem M-26 em destilarias. Ao final do 6^o ciclo houve redução de 1,3% no rendimento do tratamento M-26 cultura mista em relação ao tratamento com cultura pura. Para os tratamentos com a linhagem PE-2 a redução do rendimento foi 1,0%.

A formação de glicerol foi maior nos dois tratamentos com cultura mista em comparação aos tratamentos com cultura pura. Os resultados apresentam concordância com os demais experimentos e com o relato de Thomas et al. (2001) no qual foi descrito o fato do aumento da concentração de glicerol em fermentações alcoólicas com cultura mista de levedura e bactéria.

A redução de massa dos tratamentos durante a fermentação foi similar para todos os tratamentos durante os 6 ciclos fermentativos. A fermentação tumultuosa encerrou em menos de 8 h após a alimentação.

O teor de trealose ao final do experimento foi maior nos dois tratamentos com a linhagem PE-2 em relação aos tratamentos com a linhagem M-26. Novamente é reforçada a relação entre trealose e a viabilidade celular (Pataro, 2002). Gutierrez (1990) relatou acúmulo de trealose atingindo 14,97 g.100 g⁻¹, expresso em g de trealose em 100 g de matéria seca durante a fermentação alcoólica em anaerobiose.

6 CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos no presente trabalho podemos concluir que:

A metodologia de microplaqueamento em gotas foi equivalente ao plaqueamento em profundidade para determinar a população de *L. fermentum* CCT 1407 tanto em cultura isolada quanto em cultivo misto com *S. cerevisiae*.

Reduções da viabilidade celular da levedura estimulam a multiplicação do *L. fermentum* CCT 1407 durante o transcorrer dos ciclos fermentativos.

A linhagem M-26 de *S. cerevisiae* demonstrou exercer maior inibição a multiplicação do *L. fermentum* CCT 1407 que a linhagem PE-2, nas condições nas quais foram realizados os ciclos fermentativos.

A linhagem Fleischmann de *S. cerevisiae* exerceu maior estímulo à multiplicação da bactéria *L. fermentum* CCT 1407 que a linhagem PE-2, sendo esse estímulo inversamente proporcional à viabilidade celular apresentada pela levedura.

A contaminação bacteriana presente no vinho exerceu estímulo sobre a produção de glicerol pela *S. cerevisiae*, independente da linhagem de levedura.

ANEXOS

ANEXOS A: Figuras

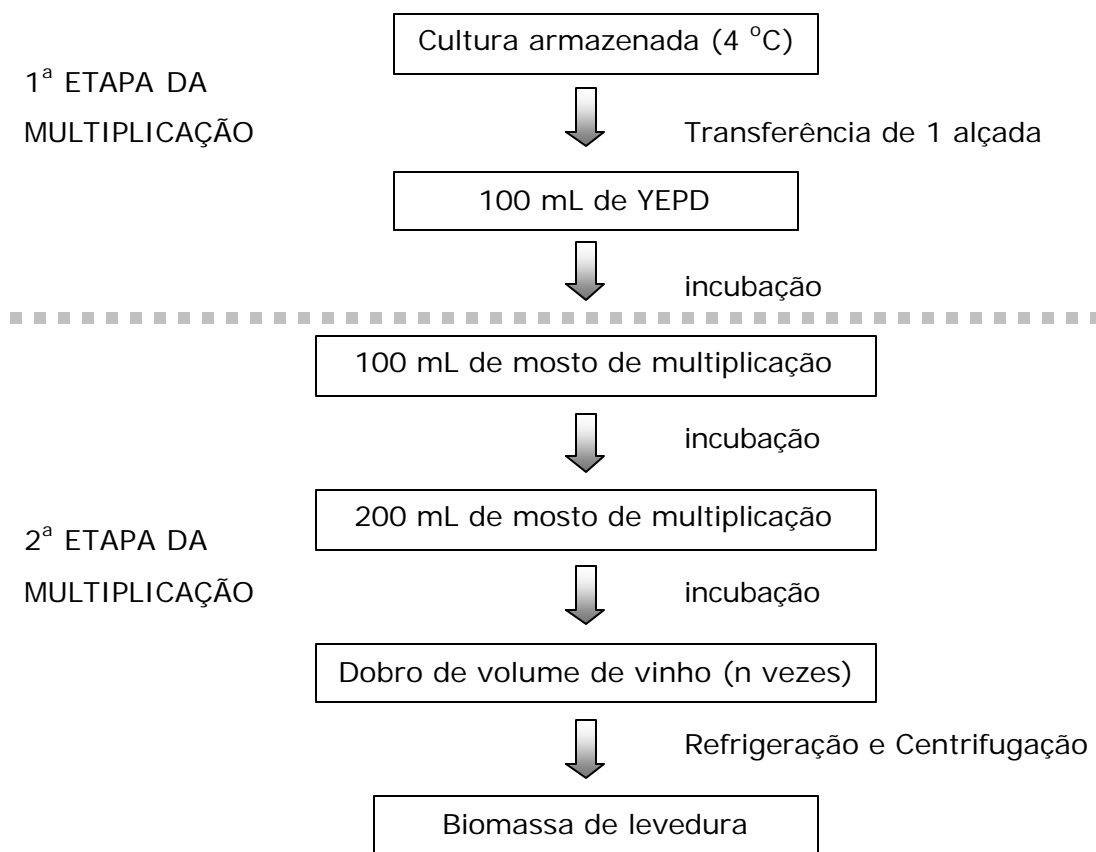


Figura 1 - Fluxograma do procedimento utilizado para a multiplicação das linhagens de *S. cerevisiae* para a obtenção de biomassa inicial (inóculo) suficiente para o início dos experimentos de ciclos fermentativos.

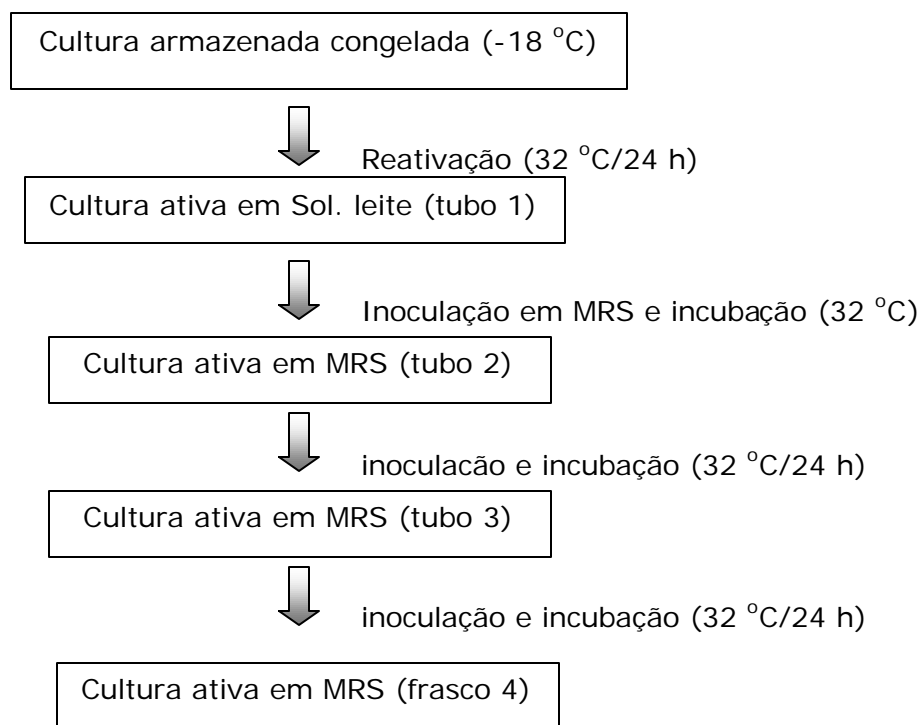


Figura 2 - Fluxograma resumido do procedimento utilizado para a reativação e multiplicação da cultura armazenada congelada (-18 °C) da bactéria *L. fermentum* CCT 1407 para a utilização nos experimentos com ciclos fermentativos.

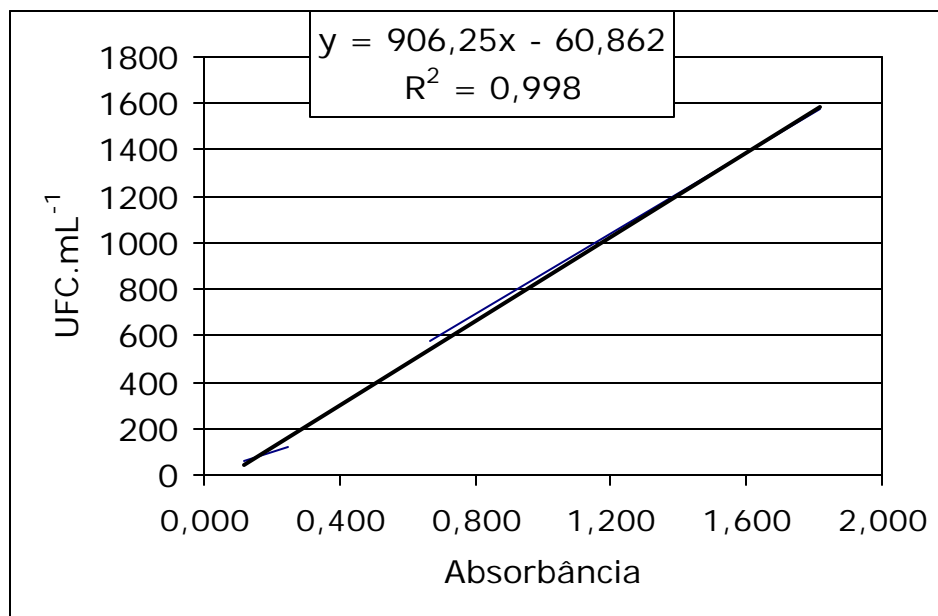


Figura 3 - Curva de calibração para determinação da população bacteriana (UFC.mL⁻¹) centrifugada e ressuspensa em água destilada autoclavada.

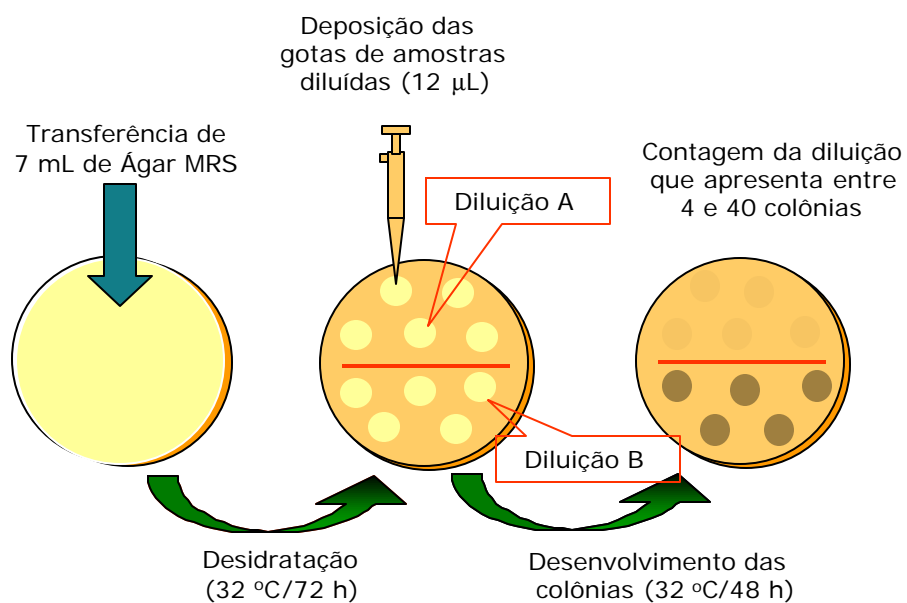


Figura 4 - Representação das principais fases do microplaqueamento em gotas quando as placas após receberem o meio de cultura foram incubadas para a desidratação do meio de cultivo. Após a desidratação foram depositadas as gotas das amostras diluídas, em seguida as placas foram novamente incubada para o desenvolvimento das colônias bacterianas.

ANEXOS B: Tabelas de resultados

Tabela 9. Resultados referentes à viabilidade, contaminação bacteriana e taxa de brotamento ao final de cada ciclo fermentativo com cultura mista de *L. fermentum* CCT 1407 e as linhagens Fleischmann ou PE-2 de *S. cerevisiae* sem ou com adição de extrato de levedura (+ext) ao mosto.

Trata- mentos	Viabilidade (%)						Contaminação (UFC.10 ⁶ .mL ⁻¹)						Brotamento (%)					
	1ciclo	2ciclo	3ciclo	4ciclo	5ciclo	6ciclo	1ciclo	2ciclo	3ciclo	4ciclo	5ciclo	6ciclo	1ciclo	2ciclo	3ciclo	4ciclo	5ciclo	6ciclo
Fleischmann	97,7	86,9	75,6	53,2	32,8	24,8	17,3	26,2	28,3	45,8	43,3	62,5	1,5	1,9	3,0	0,6	2,8	1,1
+ext	96,6	84,7	71,3	51,5	30,6	22,2	21,0	35,3	26,7	48,3	40,8	42,5	0,6	1,7	2,5	1,5	1,9	1,2
Média	95,0	83,0	71,9	50,3	34,4	24,5	21,8	26,9	25,0	53,3	45,8	50,0	1,0	2,3	3,2	2,1	3,5	2,1
Fleischmann	96,4	84,9	73,0	51,7	32,6	23,8	20,1	29,5	26,7	49,2	43,3	51,7	1,0	1,9	2,9	1,4	2,7	1,5
	93,9	87,8	73,5	57,4	32,2	27,4	21,3	40,7	50,8	63,3	43,3	55,8	2,4	2,6	2,2	2,7	6,4	4,2
	92,8	85,8	70,7	52,9	31,1	26,1	25,3	27,2	45,8	50,0	52,5	53,3	1,7	2,4	2,5	2,7	5,6	0,0
Média	91,3	86,1	70,2	52,2	31,3	23,8	23,0	33,7	47,5	68,3	35,0	59,2	2,1	3,9	2,1	2,5	4,5	1,1
	92,7	86,5	71,5	54,1	31,5	25,7	23,2	33,8	48,1	60,6	43,6	56,1	2,1	3,0	2,3	2,6	5,5	1,8
PE-2+ext	98,8	98,4	97,5	94,4	93,0	87,5	20,8	22,2	40,0	35,0	56,7	50,0	2,1	3,6	4,4	3,0	3,5	3,3
	98,9	99,1	98,0	95,4	92,6	87,6	21,2	34,3	38,3	53,3	61,7	86,7	2,5	7,2	3,8	4,5	2,7	3,2
Média	100,0	98,7	97,1	94,3	93,2	89,1	19,8	26,0	33,3	51,7	46,7	60,8	3,7	2,7	3,7	3,8	3,2	2,2
	99,2	98,7	97,6	94,7	92,9	88,1	20,6	27,5	37,2	46,7	55,0	65,8	2,8	4,5	4,0	3,8	3,1	2,9
PE-2	98,2	97,9	96,9	93,9	90,4	87,1	25,3	40,0	52,5	56,7	83,3	98,3	3,9	5,0	3,2	2,8	2,1	3,6
	100,0	99,3	98,5	95,2	90,6	89,9	29,3	42,5	49,2	70,0	41,7	91,7	2,6	4,3	2,8	4,1	2,4	1,8
Média	99,1	98,4	97,0	92,0	91,1	88,1	26,0	43,3	50,8	61,7	111,7	95,0	3,4	2,9	3,8	7,0	3,8	2,3
	99,1	98,5	97,4	93,7	90,7	88,3	26,9	41,9	50,8	62,8	78,9	95,0	3,3	4,1	3,3	4,6	2,8	2,6
Média geral	96,9	92,2	84,9	73,6	61,9	56,5	22,7	33,2	40,7	54,8	55,2	67,2	2,3	3,4	3,1	3,1	3,5	2,2

Tabela 10. Resultados sobre a peso de fermento, pH e rendimento de fermentação ao final de cada ciclo fermentativo com cultura mista de *L. fermentum* CCT 1407 e as linhagens Fleischmann ou PE-2 de *S. cerevisiae* sem e com adição de extrato de levedura (+ext) ao mosto.

Trata- mentos	Peso do fermento (g.tubo ⁻¹)						pH						Rendimento (%)					
	1ciclo	2ciclo	3ciclo	4ciclo	5ciclo	6ciclo	1ciclo	2ciclo	3ciclo	4ciclo	5ciclo	6ciclo	1ciclo	2ciclo	3ciclo	4ciclo	5ciclo	6ciclo
Fleischmann +ext	10,17	11,32	11,79	11,25	11,19	10,98	4,83	4,49	4,36	4,36	4,23	4,08	88,02	91,64	90,65	86,84	84,81	81,57
	10,05	11,27	11,86	10,98	10,91	10,60	4,82	4,46	4,30	4,28	4,16	4,11	88,57	91,46	90,87	86,38	85,27	81,70
	10,10	11,36	11,72	11,28	11,16	10,85	4,82	4,38	4,45	4,30	4,20	4,09	88,43	91,24	91,51	86,91	84,81	82,01
Média	10,11	11,32	11,79	11,17	11,09	10,81	4,82	4,44	4,37	4,31	4,19	4,09	88,34	91,45	91,01	86,71	84,96	81,76
Fleischmann	10,27	11,37	11,38	10,89	11,18	10,86	4,84	4,42	4,24	4,25	4,25	4,26	88,17	90,36	88,03	86,09	81,47	85,41
	10,25	11,44	11,40	10,81	10,96	11,23	4,81	4,38	4,18	4,23	4,29	4,36	88,74	91,09	88,27	86,29	85,37	87,18
	10,20	11,19	11,23	10,63	10,50	10,88	4,87	4,38	4,22	4,20	4,31	4,33	88,25	90,51	88,09	85,51	84,75	86,56
Média	10,24	11,33	11,34	10,78	10,88	10,99	4,84	4,39	4,21	4,23	4,28	4,32	88,39	90,65	88,13	85,97	83,87	86,38
PE-2+ext	10,13	11,78	12,93	13,46	14,60	14,95	5,10	4,71	4,72	4,79	4,76	4,77	87,47	92,34	91,84	92,24	91,44	89,14
	10,17	11,85	12,94	13,49	14,25	14,60	5,07	4,70	4,70	4,75	4,75	4,77	87,43	92,39	91,50	92,10	90,80	89,33
	10,12	11,83	12,99	13,55	14,69	14,97	5,07	4,74	4,72	4,81	4,75	4,79	87,50	92,44	92,08	92,32	91,83	89,18
Média	10,14	11,82	12,95	13,50	14,51	14,84	5,08	4,72	4,71	4,78	4,75	4,78	87,47	92,38	91,81	92,22	91,36	89,22
PE-2	10,15	11,70	12,62	13,12	13,88	13,78	5,02	4,64	4,53	4,59	4,53	4,50	87,22	91,84	90,72	90,88	89,99	90,95
	10,22	11,58	12,64	13,12	14,06	14,20	5,01	4,61	4,56	4,60	4,54	4,50	87,12	91,43	90,80	91,14	89,63	89,75
	10,19	11,75	12,75	13,19	13,96	14,31	5,04	4,66	4,59	4,61	4,57	4,52	86,98	92,24	90,06	91,15	90,83	89,76
Média	10,19	11,68	12,67	13,14	13,97	14,10	5,02	4,64	4,56	4,60	4,55	4,51	87,11	91,86	90,53	91,06	90,15	90,15
Média geral	10,17	11,54	12,19	12,15	12,61	12,68	4,94	4,55	4,46	4,48	4,45	4,42	87,83	91,58	90,37	88,99	87,58	87,79

Tabela 11. Resultados sobre a concentração de etanol, de glicerol e de açúcares residuais nos vinhos delevurados ao final de cada ciclo fermentativo com cultura mista de *L. fermentum* CCT 1407 e as linhagens Fleischmann ou PE-2 de *S. cerevisiae* sem e com adição de extrato de levedura (+ext) ao mosto.

Trata- mentos	Etanol (mL.100mL ⁻¹)						Glicerol (g.100mL ⁻¹)						Açúcares residuais (g.100mL ⁻¹)					
	1ciclo	2ciclo	3ciclo	4ciclo	5ciclo	6ciclo	1ciclo	2ciclo	3ciclo	4ciclo	5ciclo	6ciclo	1ciclo	2ciclo	3ciclo	4ciclo	5ciclo	6ciclo
Fleischmann +ext	8,76	9,20	9,08	8,70	8,48	8,16	0,69	0,76	0,78	0,81	0,75	0,94	0,00	0,02	0,01	0,02	0,03	0,15
	8,82	9,18	9,10	8,66	8,52	8,18	0,71	0,75	0,81	0,87	0,83	0,87	0,00	0,01	0,00	0,02	0,01	0,29
	8,80	9,16	9,14	8,70	8,48	8,20	0,65	0,65	0,77	0,83	0,93	0,92	0,00	0,02	0,00	0,04	0,02	0,27
Média	8,79	9,18	9,11	8,69	8,49	8,18	0,68	0,72	0,79	0,84	0,84	0,91	0,00	0,02	0,00	0,03	0,02	0,24
Fleischmann	8,78	9,10	8,82	8,60	8,44	8,56	0,67	0,80	0,78	0,85	0,78	0,91	0,00	0,00	0,00	0,01	0,02	0,05
	8,84	9,14	8,84	8,60	8,54	8,70	0,66	0,82	0,81	0,80	0,78	0,88	0,02	0,02	0,00	0,03	0,00	0,03
	8,80	9,10	8,82	8,52	8,46	9,64	0,72	0,79	0,87	0,75	0,74	0,97	0,03	0,00	0,00	0,04	0,08	0,07
Média	8,81	9,11	8,83	8,57	8,48	8,97	0,68	0,80	0,82	0,80	0,77	0,92	0,02	0,01	0,00	0,03	0,03	0,05
PE-2+ext	8,70	9,28	9,26	9,28	9,22	8,98	0,64	0,62	0,68	0,58	0,75	0,79	0,00	0,03	0,02	0,05	0,00	0,05
	8,70	9,28	9,22	9,26	9,16	9,00	0,68	0,70	0,68	0,63	0,69	0,72	0,06	0,00	0,00	0,02	0,00	0,05
	8,70	9,28	9,26	9,28	9,26	9,00	0,62	0,66	0,66	0,64	0,70	0,70	0,00	0,01	0,00	0,01	0,02	0,03
Média	8,70	9,28	9,25	9,27	9,21	8,99	0,65	0,66	0,67	0,62	0,71	0,74	0,02	0,02	0,01	0,03	0,01	0,04
PE-2	8,68	9,22	9,14	9,14	9,06	9,12	0,70	0,69	0,72	0,72	0,82	0,75	0,02	0,00	0,02	0,12	0,00	0,04
	8,68	9,18	9,12	9,14	9,04	9,02	0,70	0,65	0,71	0,72	0,69	0,77	0,00	0,02	0,00	0,09	0,00	0,04
	8,66	9,26	9,08	9,16	9,14	9,04	0,64	0,69	0,71	0,70	0,77	0,79	0,00	0,00	0,00	0,02	0,02	0,10
Média	8,67	9,22	9,11	9,15	9,08	9,06	0,68	0,68	0,71	0,71	0,76	0,77	0,01	0,01	0,01	0,08	0,01	0,06
Média geral	8,74	9,20	9,07	8,92	8,82	8,80	0,67	0,72	0,75	0,74	0,77	0,83	0,01	0,01	0,00	0,04	0,02	0,10

Tabela 12. Resultados sobre o teor de trealose presente na biomassa inicial e ao final do 6º ciclo fermentativo com cultura mista de *L. fermentum* CCT 1407 e as linhagens Fleischmann ou PE-2 de *S. cerevisiae* sem e com adição de extrato de levedura (+ext) ao mosto.

Tratamentos	Trealose (g.100g ⁻¹)	
	Biomassa inicial	6º ciclo
	4,10	1,40
Fleischmann+ext	4,16	1,75
	4,34	1,86
Média	4,20	1,67
	4,18	1,43
Fleischmann	4,12	1,93
	4,30	1,99
Média	4,20	1,79
	3,83	5,41
PE-2+ext	3,86	5,50
	3,71	5,68
Média	3,80	5,53
	3,79	5,99
PE-2	3,68	6,18
	3,85	6,15
Média	3,77	6,11
Média geral	3,99	3,78

Tabela 13. Evolução do desprendimento de CO₂ no transcorrer de 6 ciclos fermentativos com cultura mista de *L. fermentum* CCT 1407 e linhagens Fleischmann ou PE-2 de *S. cerevisiae* sem ou com a adição de extrato de levedura (+ ext.) ao mosto.

tratamentos	Ciclo	Variações de Peso (g.tubo ⁻¹)							
		1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	20h
Fleischmann + ext	1 ^o	1,48	2,82	3,96	4,55	4,67	4,74	4,80	5,01
	2 ^o	0,92	2,50	3,96	5,05	5,63	5,80	5,90	6,18
	3 ^o	0,75	2,38	3,66	4,74	5,32	5,56	5,65	5,90
	4 ^o	0,52	1,73	3,11	4,32	5,08	5,50	5,72	6,05
	5 ^o	0,68	1,48	2,47	3,42	4,23	4,82	5,20	5,66
	6 ^o	0,30	0,89	1,72	2,55	3,21	3,74	4,22	5,42
Média		0,78	1,97	3,17	4,11	4,69	5,03	5,25	5,70
Fleischmann	1 ^o	1,47	2,92	4,13	4,82	4,94	5,02	5,07	5,28
	2 ^o	0,77	2,42	3,94	5,05	5,68	5,89	5,99	6,29
	3 ^o	0,64	2,29	3,58	4,65	5,23	5,43	5,55	5,84
	4 ^o	0,38	1,58	2,90	4,03	4,77	5,17	5,40	5,80
	5 ^o	0,49	1,31	2,37	3,37	4,19	4,77	5,14	5,58
	6 ^o	0,28	1,24	1,81	2,70	3,42	4,00	4,50	5,70
Média		0,67	1,96	3,12	4,10	4,71	5,05	5,28	5,75
PE-2 + extr	1 ^o	1,51	2,85	3,98	4,45	4,56	4,62	4,67	4,85
	2 ^o	1,20	2,87	4,29	5,30	5,69	5,81	5,89	6,14
	3 ^o	1,28	3,15	4,56	5,53	5,70	5,78	5,85	6,09
	4 ^o	1,22	3,16	4,76	5,69	5,85	5,92	5,99	6,26
	5 ^o	1,65	3,53	5,17	5,89	6,03	6,06	6,08	6,10
	6 ^o	1,78	3,69	5,28	5,77	5,85	5,94	5,94	6,11
Média		1,44	3,21	4,67	5,44	5,61	5,69	5,74	5,93
PE-2	1 ^o	1,51	2,87	4,04	4,68	4,80	4,87	4,92	5,07
	2 ^o	1,06	2,74	4,22	5,28	5,63	5,74	5,82	6,08
	3 ^o	1,08	3,03	4,51	5,45	5,64	5,73	5,80	6,06
	4 ^o	1,00	2,97	4,62	5,60	5,77	5,85	5,93	6,19
	5 ^o	1,36	3,25	4,88	5,68	5,85	5,93	5,99	6,00
	6 ^o	1,43	3,32	5,04	5,62	5,76	5,78	5,84	6,01
Média		1,24	3,03	4,55	5,38	5,57	5,65	5,72	5,90

Tabela 14. Resultados de viabilidade, contaminação bacteriana e taxa de brotamento ao final de cada ciclo fermentativo nos tratamentos com cultura mista de *L. fermentum* CCT 1407 e as linhagens Fleischmann ou PE-2 de *S. cerevisiae* sem estresse térmico (linhagem/sem) ou com (linhagem/com) realizado no inóculo a 40 °C durante 22 h.

Trata- Mentos	Viabilidade (%)						Contaminação (UFC.10 ⁶ .mL ⁻¹)						Brotamento (%)					
	1ciclo	2ciclo	3ciclo	4ciclo	5ciclo	6ciclo	1ciclo	2ciclo	3ciclo	4ciclo	5ciclo	6ciclo	1ciclo	2ciclo	3ciclo	4ciclo	5ciclo	6ciclo
Fle. com	62,6	49,2	40,6	33,8	29,2	25,2	3,2	13,5	21,3	53,2	166,7	225,0	1,0	2,0	1,6	3,2	7,0	3,5
estresse	64,8	43,2	41,1	30,8	28,6	26,9	3,8	10,2	18,0	76,8	215,0	296,1	1,6	2,6	3,2	2,1	10,7	7,6
	65,1	45,8	35,8	32,9	23,7	26,6	3,1	8,2	14,5	58,1	178,3	263,3	2,2	2,0	4,0	4,2	4,8	5,4
Média	64,2	46,1	39,2	32,5	27,2	26,2	3,3	10,6	17,9	62,7	186,7	261,1	1,6	2,2	2,9	3,2	7,5	5,5
Fle. sem	89,3	84,3	74,8	53,0	53,8	39,0	2,2	7,0	18,8	60,5	96,7	165,8	6,7	4,1	3,7	8,0	5,3	8,6
estresse	90,8	87,8	72,0	65,3	51,0	44,7	1,2	5,3	15,2	55,5	76,7	148,8	6,1	5,1	5,0	4,0	1,5	4,3
	89,0	80,8	70,8	54,0	52,4	37,8	1,5	5,3	13,9	41,2	71,7	140,3	4,9	3,8	3,7	3,9	2,8	5,4
Média	89,7	84,3	72,6	57,4	52,4	40,5	1,7	5,9	16,0	52,4	81,7	151,7	5,9	4,3	4,1	5,3	3,2	6,1
PE-2 com	63,5	47,4	44,1	37,9	29,1	28,3	5,3	18,8	32,7	63,5	131,7	206,3	4,6	5,5	4,7	3,0	4,8	2,1
estresse	67,6	43,5	44,2	37,1	28,2	32,2	6,2	17,3	28,3	65,2	165,0	216,7	5,0	3,2	2,5	5,6	7,6	4,5
	64,7	46,8	44,0	38,7	30,8	31,4	4,2	11,3	21,5	69,3	182,5	273,3	4,3	4,3	2,9	3,7	3,0	4,7
Média	65,3	45,9	44,1	37,9	29,4	30,7	5,3	15,8	27,5	66,0	159,7	232,1	4,6	4,3	3,4	4,1	5,1	3,8
PE-2 sem	94,9	91,2	81,5	66,7	67,1	49,2	2,1	6,2	10,7	21,1	38,3	55,0	9,6	2,3	3,8	3,0	2,7	5,3
estresse	95,5	89,3	78,7	71,7	67,1	42,3	1,6	2,2	9,4	23,0	26,7	68,3	9,5	4,3	2,9	3,7	1,7	4,3
	96,5	88,3	83,2	71,6	64,2	43,5	1,8	6,7	9,2	22,0	41,7	78,3	5,5	2,8	3,2	2,8	2,3	4,8
Média	95,6	89,6	81,2	70,0	66,1	45,0	1,9	5,3	7,1	22,1	35,6	67,2	8,2	3,1	3,3	3,2	2,3	4,8
Média geral	78,7	66,5	59,2	49,5	43,8	35,6	3,0	10,0	13,4	94,7	116,7	177,5	5,1	3,5	3,4	3,9	4,5	5,0

Tabela 15. Resultados sobre o peso de biomassa, pH do vinho delevurado e rendimento de fermentação ao final de cada ciclo fermentativo nos tratamentos com cultura mista de *L. fermentum* CCT 1407 e as linhagens Fleischmann ou PE-2 de *S. cerevisiae* sem estresse térmico (linhagem/sem) ou com (linhagem/com) realizado no inóculo a 40 °C durante 22 h.

Trata- Mentos	Peso do fermento (g.tubo ⁻¹)						pH						Rendimento (%)					
	1ciclo	2ciclo	3ciclo	4ciclo	5ciclo	6ciclo	1ciclo	2ciclo	3ciclo	4ciclo	5ciclo	6ciclo	1ciclo	2ciclo	3ciclo	4ciclo	5ciclo	6ciclo
Fle. com	7,43	7,10	7,67	8,15	8,65	9,12	3,95	3,61	3,52	3,50	3,44	3,24	55,0	68,9	69,4	74,5	77,1	76,6
estresse	7,31	6,94	7,31	8,23	8,79	9,41	3,94	3,65	3,54	3,50	3,46	3,42	55,1	67,4	72,5	77,9	79,2	80,0
	7,35	7,04	7,35	8,09	8,70	9,22	3,95	3,64	3,58	3,52	3,44	3,26	55,0	68,9	73,9	74,5	72,1	73,0
Média	7,36	7,03	7,44	8,16	8,71	9,25	3,95	3,63	3,55	3,51	3,45	3,31	55,1	68,4	71,9	75,6	76,2	76,5
Fle. sem	8,31	8,41	8,93	8,79	9,15	9,77	4,24	4,13	4,10	4,09	3,87	3,74	92,4	91,9	92,3	91,9	91,5	91,9
estresse	8,39	8,56	8,97	8,96	9,24	10,02	4,24	4,13	4,11	4,08	3,90	3,78	93,8	92,1	92,7	92,1	91,7	90,1
	8,34	8,49	9,12	9,40	9,79	10,41	4,27	4,12	4,09	4,03	3,90	3,76	93,2	91,8	91,6	91,6	92,2	91,9
Média	8,35	8,49	9,01	9,05	9,39	10,07	4,25	4,13	4,10	4,07	3,89	3,76	93,1	92,0	92,2	91,9	91,8	91,3
PE-2 com	7,61	7,70	8,02	8,52	9,31	9,73	4,14	3,77	3,72	3,68	3,58	3,44	89,6	88,0	85,5	85,8	84,6	87,3
estresse	7,58	7,56	7,97	8,44	9,20	9,71	4,12	3,78	3,71	3,69	3,61	3,38	85,0	87,3	85,4	86,2	85,6	86,7
	7,65	7,69	8,07	8,47	9,30	9,78	4,14	3,77	3,73	3,70	3,61	3,40	89,5	88,2	86,6	85,4	86,0	87,2
Média	7,61	7,65	8,02	8,48	9,27	9,74	4,13	3,77	3,72	3,69	3,60	3,41	88,0	87,8	85,8	85,8	85,4	87,1
PE-2 sem	8,78	9,08	9,44	9,51	9,72	10,08	4,24	4,18	4,15	4,05	3,93	3,76	91,3	91,8	92,5	92,7	92,5	92,7
estresse	8,74	9,05	9,29	9,30	9,66	9,92	4,26	4,16	4,12	4,10	3,94	3,80	92,4	91,8	93,3	92,4	92,4	93,1
	8,74	9,07	9,30	9,17	9,39	9,52	4,28	4,21	4,16	4,13	3,95	3,77	91,3	92,1	92,3	93,0	92,8	92,3
Média	8,75	9,07	9,34	9,33	9,59	9,84	4,26	4,18	4,14	4,09	3,94	3,78	91,7	91,9	92,7	92,7	92,6	92,7
Média geral	8,02	8,06	8,45	8,75	9,24	9,72	4,15	3,93	3,88	3,84	3,72	56,5	55,0	68,9	69,4	74,5	86,5	86,9

Tabela 16. Resultados sobre a concentração de etanol, de glicerol e de açúcares residuais nos vinhos delevurados ao final de cada ciclo fermentativo nos tratamentos com cultura mista de *L. fermentum* CCT 1407 e as linhagens Fleischmann ou PE-2 de *S. cerevisiae* sem estresse térmico (linhagem/sem) ou com (linhagem/com) realizado no inóculo a 40 °C durante 22 h.

Trata- mentos	Etanol (mL.100mL ⁻¹)						Glicerol (g.100mL ⁻¹)						Açúcares residuais (g.100mL ⁻¹)					
	1ciclo	2ciclo	3ciclo	4ciclo	5ciclo	6ciclo	1ciclo	2ciclo	3ciclo	4ciclo	5ciclo	6ciclo	1ciclo	2ciclo	3ciclo	4ciclo	5ciclo	6ciclo
Fle. com	5,16	6,82	6,92	7,40	7,68	7,66	0,30	0,38	0,47	0,72	0,87	0,90	5,726	2,718	2,789	1,765	1,039	1,233
estresse	5,16	6,68	7,16	7,74	7,90	8,00	0,34	0,39	0,48	0,76	0,93	1,01	5,890	3,485	2,032	1,138	0,776	0,622
	5,16	6,82	7,26	7,40	7,20	7,32	0,30	0,44	0,52	0,69	0,85	0,95	6,256	3,206	1,729	1,728	2,064	1,714
Média	5,16	6,77	7,11	7,51	7,59	7,66	0,31	0,40	0,49	0,72	0,88	0,95	5,96	3,14	2,18	1,54	1,29	1,19
Fle. sem	8,72	9,20	9,20	9,20	9,14	9,18	0,46	0,41	0,43	0,59	0,72	0,61	0,060	0,055	0,015	0,081	0,023	0,049
estresse	8,86	9,20	9,24	9,22	9,20	9,10	0,48	0,42	0,41	0,56	0,76	0,69	0,038	0,040	0,047	0,035	0,000	0,000
	8,84	9,18	9,14	9,18	9,20	9,12	0,48	0,44	0,46	0,64	0,75	0,68	0,370	0,041	0,047	0,104	0,000	0,000
Média	8,81	9,19	9,19	9,20	9,18	9,13	0,47	0,42	0,43	0,60	0,74	0,66	0,16	0,05	0,04	0,07	0,01	0,02
PE-2 com	8,42	8,76	8,52	8,56	8,46	8,62	0,48	0,42	0,41	0,69	0,79	0,81	0,184	0,011	0,513	0,349	0,482	0,301
estresse	8,00	8,68	8,50	8,60	8,58	8,66	0,44	0,46	0,48	0,69	0,93	0,84	0,277	0,458	0,493	0,231	0,197	0,098
	8,40	8,76	8,64	8,64	8,62	8,70	0,45	0,51	0,50	0,71	0,89	0,71	0,209	0,263	0,217	0,234	0,081	0,037
Média	8,27	8,73	8,55	8,60	8,55	8,66	0,46	0,46	0,46	0,70	0,87	0,79	0,22	0,24	0,41	0,27	0,25	0,15
PE-2 sem	8,62	9,18	9,20	9,30	9,26	9,26	0,47	0,39	0,42	0,53	0,60	0,43	0,063	0,068	0,041	0,028	0,000	0,000
estresse	8,72	9,20	9,28	9,30	9,26	9,30	0,48	0,45	0,41	0,51	0,60	0,51	0,039	0,061	0,041	0,036	0,000	0,041
	8,62	9,22	9,20	9,32	9,30	9,30	0,44	0,41	0,39	0,54	0,59	0,45	0,057	0,049	0,034	0,042	0,000	0,000
Média	8,65	9,20	9,23	9,31	9,27	9,29	0,46	0,42	0,41	0,53	0,60	0,46	0,05	0,06	0,04	0,04	0,00	0,01
Média geral	7,72	8,48	8,52	8,66	8,65	8,69	0,43	0,43	0,45	0,64	0,77	0,72	1,60	0,87	0,67	0,48	0,42	0,34

Tabela 17. Resultados sobre o teor de trealose na biomassa inicial e ao final do 6º ciclo fermentativo nos tratamentos com cultura mista de *L. fermentum* CCT 1407 e as linhagens Fleischmann ou PE-2 de *S. cerevisiae* sem estresse térmico (linhagem/sem) ou com (linhagem/com) realizado no inóculo a 40 °C durante 22 h.

Tratamentos	Trealose (g.100g ⁻¹)	
	Biomassa inicial	6º ciclo
Fle. com estresse	2,41	3,78
	2,23	4,28
	2,30	4,10
Média	2,31	4,05
Fle. sem estresse	6,38	6,91
	6,67	8,12
	6,48	6,68
Média	6,51	7,23
PE-2 com estresse	2,11	4,82
	2,36	5,41
	2,30	5,31
Média	2,26	5,18
PE-2 sem estresse	6,08	8,87
	6,22	7,58
	6,00	8,36
Média	6,10	8,27
Média geral	4,30	6,18

Tabela 18. Evolução do desprendimento de CO₂, no transcorrer de 6 ciclos fermentativos realizados com cultura mista de *L. fermentum* CCT 1407 e as linhagens Fleischmann ou PE-2 de *S. cerevisiae*, submetidas (linhagem/com) ou não (linhagem/sem) a um estresse térmico do inóculo a 40 °C durante 22 h.

tratamentos	Ciclo	Variações de Peso (g.tubo ⁻¹)							
		1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	20h
Fleischmann com est.	1°	0,00	0,00	0,13	0,35	0,57	0,81	1,07	2,86
	2°	0,00	0,17	0,49	0,90	1,30	1,71	1,92	4,01
	3°	0,00	0,20	0,58	1,06	1,45	1,89	2,25	4,33
	4°	0,01	0,27	0,74	1,30	1,85	2,25	2,71	4,12
	5°	0,08	0,48	1,00	1,69	2,21	2,68	3,12	4,68
	6°	0,00	0,29	0,81	1,39	1,92	2,43	2,98	4,66
Média		0,02	0,23	0,62	1,11	1,55	1,96	2,34	4,11
Fleischmann sem est.	1°	0,14	0,84	1,60	2,37	3,07	3,70	4,22	5,68
	2°	0,08	0,77	1,53	2,25	3,02	3,68	4,26	5,88
	3°	0,06	0,67	1,43	2,21	2,89	3,47	4,03	5,72
	4°	0,07	0,65	1,43	2,24	2,92	3,46	4,06	5,85
	5°	0,17	0,73	1,41	2,15	2,75	3,46	4,01	5,80
	6°	0,00	0,44	1,09	1,87	2,43	3,08	3,79	5,63
Média		0,09	0,68	1,42	2,18	2,85	3,47	4,06	5,76
PE-2 com est.	1°	0,00	0,19	0,72	1,19	1,73	2,24	2,75	5,39
	2°	0,04	0,40	0,96	1,56	2,20	2,71	3,17	5,35
	3°	0,00	0,35	0,99	1,71	2,28	2,78	3,19	5,14
	4°	0,03	0,43	1,11	1,73	2,38	2,81	3,32	5,63
	5°	0,22	0,82	1,57	2,24	2,76	3,34	3,78	5,39
	6°	0,00	0,50	1,15	1,81	2,43	3,01	3,62	5,41
Média		0,05	0,45	1,08	1,70	2,30	2,82	3,30	5,39
PE-2 sem est.	1°	0,31	1,36	2,41	3,38	4,20	4,82	5,10	5,48
	2°	0,29	1,31	2,42	3,34	4,19	4,91	5,35	5,97
	3°	0,16	1,24	2,18	3,15	3,94	4,54	5,01	5,49
	4°	0,17	1,21	2,25	3,26	4,08	4,74	5,34	6,11
	5°	0,40	1,30	2,29	3,22	4,02	4,71	5,19	5,84
	6°	0,06	0,75	1,71	2,55	3,36	4,04	4,80	5,74
Média		0,23	1,20	2,21	3,15	3,96	4,63	5,13	5,77

Tabela 19. Resultados referentes à viabilidade, contaminação bacteriana e taxa de brotamento ao final de cada ciclo fermentativo realizado nos tratamentos envolvendo as linhagens M-26 ou PE-2 de *S. cerevisiae* em cultura pura (c. pura) e em cultura mista (c. mista) com *L. fermentum* CCT-1407.

Trata- mentos	Viabilidade (%)						Contaminação (UFC.10 ⁶ .mL ⁻¹)						Brotamento (%)					
	1ciclo	2ciclo	3ciclo	4ciclo	5ciclo	6ciclo	1ciclo	2ciclo	3ciclo	4ciclo	5ciclo	6ciclo	1ciclo	2ciclo	3ciclo	4ciclo	5ciclo	6ciclo
	99,7	99,8	98,3	93,4	90,1	86,3	0,0007	0,0007	0,0002	0,0005	0,070	0,100	11,5	12,4	10,8	7,6	7,7	7,1
M-26	98,8	96,2	94,7	91,7	93,8	85,0	0,0002	0,002	0,0008	0,002	0,010	0,160	6,9	9,7	10,5	7,1	9,5	9,0
C. Pura	100,0	98,8	92,9	94,2	93,0	90,1	0,0003	0,001	0,0005	0,001	0,022	0,085	31,4	10,5	10,3	7,2	9,5	6,3
Média	99,5	98,2	95,3	93,1	92,3	87,1	0,000	0,001	0,001	0,003	0,034	0,115	16,6	11,8	10,5	7,3	8,9	7,5
	100,0	99,7	96,4	93,0	91,8	88,0	4,1	7,5	14,6	12,	27,3	31,1	14,2	11,6	8,9	7,2	6,1	9,2
M-26	99,6	99,1	92,4	90,5	87,2	86,6	4,1	11,0	17,2	15,	28,2	33,4	5,3	7,8	9,3	6,5	6,8	10,5
C. Mista	100,0	97,5	95,0	91,1	88,7	80,6	3,7	9,5	9,2	13,	28,8	34,7	6,1	12,8	10,5	7,0	8,8	6,2
Média	99,9	98,1	94,6	91,5	89,2	85,1	4,0	9,3	13,7	13,3	28,1	33,1	8,5	10,7	9,6	6,9	7,2	8,6
	99,7	97,7	95,4	96,8	94,1	91,5	0,0068	0,004	0,0004	0,009	0,027	0,062	1,0	1,1	2,5	1,6	1,6	1,2
PE-2	98,6	96,8	96,7	94,9	91,6	90,6	0,0087	0,003	0,0003	0,011	0,043	0,074	1,6	2,7	0,9	2,0	1,9	1,5
C. Pura	98,4	97,2	97,3	93,7	92,5	85,4	0,0067	0,002	0,0003	0,016	0,063	0,510	1,0	1,7	0,9	1,5	1,8	2,3
Média	98,9	97,2	96,5	95,1	92,7	89,2	0,007	0,003	0,000	0,012	0,044	0,215	1,2	5,4	1,4	1,7	1,8	1,7
	99,6	98,3	97,3	98,5	97,7	95,1	4,9	13,6	27,7	26,	47,	66,6	2,9	3,2	1,6	2,3	3,8	0,6
PE-2	99,2	93,1	86,6	86,1	85,8	81,7	4,9	12,0	17,3	32,	46,	54,8	1,8	1,8	1,0	2,3	3,0	1,0
C. Mista	97,5	94,1	96,5	94,1	92,5	88,8	4,4	13,3	16,9	32,	41,2	58,2	3,0	2,9	2,3	2,3	3,8	1,4
Média	98,8	95,2	93,5	92,9	92,0	88,5	4,7	13,0	20,6	30,0	44,7	59,9	2,6	2,6	1,6	2,3	3,5	1,0
Média geral	99,3	97,4	95,2	93,0	91,4	87,8	2,2	5,6	8,6	10,8	18,2	23,3	7,2	6,5	5,8	4,5	5,4	4,7

Tabela 20. Resultados sobre a peso de fermento, pH e rendimento fermentativo ao final de cada ciclo fermentativo realizado nos tratamentos envolvendo as linhagens M-26 ou PE-2 de *S. cerevisiae* em cultura pura (c. pura) e em cultura mista (c. mista) com *L. fermentum* CCT-1407.

Trata- mentos	Peso do fermento (g.tubo ⁻¹)						pH						Rendimento (%)					
	1ciclo	2ciclo	3ciclo	4ciclo	5ciclo	6ciclo	1ciclo	2ciclo	3ciclo	4ciclo	5ciclo	6ciclo	1ciclo	2ciclo	3ciclo	4ciclo	5ciclo	6ciclo
	9,73	10,34	10,63	10,91	11,04	11,11	4,76	4,74	4,74	4,72	4,71	4,71	86,6	91,0	90,3	89,5	90,3	90,3
M-26	9,78	10,32	10,25	10,55	10,92	11,01	4,73	4,73	4,72	4,71	4,70	4,70	87,1	91,1	89,8	90,6	88,9	89,8
C. Pura	9,70	10,20	10,25	10,47	10,43	11,04	4,73	4,73	4,72	4,71	4,70	4,69	86,7	90,3	90,1	89,5	89,7	90,7
Média	9,74	10,29	10,38	10,64	10,80	11,05	4,74	4,73	4,72	4,71	4,70	4,70	86,8	90,8	90,0	89,9	89,6	90,2
	9,70	10,39	10,78	10,96	10,92	11,06	4,78	4,78	4,75	4,70	4,61	4,54	87,1	90,4	87,3	90,0	89,6	89,2
M-26	9,73	10,27	10,65	10,90	11,08	11,13	4,77	4,76	4,74	4,70	4,57	4,49	86,7	89,4	90,0	90,1	88,8	88,3
C. Mista	9,87	10,45	10,83	11,18	11,53	11,51	4,76	4,76	4,76	4,71	4,61	4,55	86,5	90,7	89,8	88,8	88,5	89,4
Média	9,77	10,37	10,75	11,01	11,18	11,23	4,77	4,76	4,75	4,70	4,60	4,53	86,8	90,2	89,0	89,6	89,0	89,0
	9,75	10,64	11,09	11,48	11,96	12,19	4,83	4,76	4,84	4,86	4,83	4,81	86,8	89,4	91,0	89,0	89,6	90,1
PE-2	9,80	10,62	10,29	10,62	10,78	11,26	4,81	4,81	4,81	4,81	4,76	4,75	86,1	90,2	90,3	90,1	90,2	90,0
C. Pura	9,68	10,06	11,07	11,38	11,68	11,89	4,80	4,73	4,87	4,87	4,85	4,79	86,4	89,6	90,5	90,5	89,4	90,2
Média	9,74	10,44	10,82	11,16	11,47	11,78	4,81	4,77	4,84	4,85	4,81	4,78	86,4	89,7	90,6	89,9	89,7	90,1
	9,73	10,45	10,78	11,12	11,52	11,56	4,84	4,82	4,84	4,75	4,61	4,54	85,9	89,8	90,8	88,9	88,8	89,3
PE-2	9,78	10,45	10,81	10,99	11,12	11,04	4,84	4,81	4,80	4,74	4,59	4,47	86,5	88,7	88,6	89,1	88,6	88,8
C. Mista	9,70	10,26	10,58	10,68	11,74	11,74	4,83	4,82	4,82	4,74	4,56	4,47	86,2	89,1	90,2	89,0	88,4	89,5
Média	9,74	10,39	10,72	10,93	11,46	11,45	4,84	4,82	4,82	4,74	4,59	4,49	86,2	89,2	89,9	89,0	88,6	89,2
Média geral	9,75	10,37	10,67	10,94	11,23	11,20	4,79	4,77	4,78	4,75	4,68	4,46	86,6	90,0	89,9	89,6	89,2	89,6

Tabela 21. Resultados sobre a concentração de etanol, de glicerol e de açúcares residuais nos vinhos delevurados ao final de cada ciclo fermentativo realizado nos tratamentos envolvendo as linhagens M-26 ou PE-2 de *S. cerevisiae* em cultura pura (c. pura) e em cultura mista (c. mista) com *L. fermentum* CCT-1407.

Trata- mentos	Etanol (mL.100mL ⁻¹)						Glicerol (g.100mL ⁻¹)						Açúcares residuais (g.100mL ⁻¹)					
	1ciclo	2ciclo	3ciclo	4ciclo	5ciclo	6ciclo	1ciclo	2ciclo	3ciclo	4ciclo	5ciclo	6ciclo	1ciclo	2ciclo	3ciclo	4ciclo	5ciclo	6ciclo
	8,06	8,56	8,56	8,46	8,52	8,52	0,63	0,62	0,57	0,53	0,62	0,59	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
M-26	8,08	8,58	8,58	8,56	8,42	8,48	0,72	0,63	0,55	0,56	0,68	0,64	0,013	0,000	0,000	0,014	0,017	0,016
C. Pura	8,08	8,54	8,56	8,48	8,48	8,52	0,62	0,66	0,57	0,53	0,61	0,61	0,000	0,022	0,000	0,000	0,000	0,014
Média	8,07	8,56	8,57	8,50	8,47	8,51	0,66	0,64	0,56	0,54	0,64	0,61	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01
	8,10	8,50	8,28	8,50	8,46	8,42	0,61	0,59	0,53	0,53	0,66	0,67	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
M-26	8,08	8,48	8,52	8,52	8,40	8,38	0,69	0,60	0,58	0,57	0,68	0,71	0,019	0,000	0,000	0,000	0,024	0,000
C. Mista	8,06	8,56	8,50	8,40	8,36	8,46	0,62	0,68	0,53	0,60	0,64	0,71	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Média	8,08	8,51	8,40	8,47	8,41	8,42	0,64	0,62	0,55	0,57	0,66	0,70	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00
	8,08	8,44	8,60	8,46	8,48	8,52	0,65	0,67	0,55	0,53	0,58	0,62	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
PE-2	8,02	8,50	8,56	8,52	8,52	8,50	0,65	0,67	0,55	0,59	0,62	0,64	0,000	0,016	0,000	0,025	0,000	0,000
C. Pura	8,04	8,42	8,52	8,56	8,46	8,52	0,68	0,66	0,53	0,58	0,65	0,65	0,014	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000
Média	8,05	8,45	8,56	8,51	8,49	8,51	0,66	0,67	0,54	0,57	0,62	0,64	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00
	8,00	8,46	8,58	8,42	8,38	8,44	0,61	0,62	0,53	0,57	0,63	0,65	0,000	0,000	0,000	0,000	0,019	0,017
PE-2	8,08	8,40	8,44	8,44	8,38	8,40	0,59	0,64	0,59	0,59	0,64	0,73	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
C. Mista	8,04	8,44	8,56	8,48	8,44	8,48	0,64	0,60	0,58	0,62	0,61	0,74	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,018
Média	8,04	8,43	8,53	8,45	8,40	8,44	0,61	0,62	0,57	0,59	0,63	0,71	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01
Média geral	8,06	8,49	8,52	8,48	8,44	8,47	0,64	0,64	0,56	0,57	0,64	0,66	0,007	0,003	0,000	0,003	0,007	0,005

Tabela 22. Resultados sobre o teor de trealose presente na biomassa inicial ao final do 6^o ciclo fermentativo realizado nos tratamentos envolvendo as linhagens M-26 ou PE-2 de *S. cerevisiae* em cultura pura (c. pura) e em cultura mista (c. mista) com *L. fermentum* CCT-1407.

Tratamentos	Trealose (g.100g ⁻¹)	
	Biomassa inicial	6 ^o ciclo
	1,63	4,19
M-26	1,65	4,13
C. Pura	1,92	3,51
Média	1,73	3,94
	2,01	3,80
M-26	1,69	4,59
C. Mista	1,89	4,13
Média	1,76	4,17
	2,71	5,66
PE-2	2,94	4,62
C. Pura	3,01	6,50
Média	2,89	5,59
	3,17	5,17
PE-2	2,88	4,13
C. Mista	2,89	4,42
Média	2,98	4,57
Média geral	2,34	4,57

Tabela 23. Evolução do desprendimento de CO₂ no transcorrer de 6 ciclos fermentativos dos 4 tratamentos constituídos de inóculo com a linhagem M-26 em cultura pura e em cultivo misto com *L. fermentum* CCT-1407e da linhagem PE-2 em cultura pura e em cultura mista com a bactéria.

tratamentos	Ciclo	Variações de Peso (g.tubo ⁻¹)							
		1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	20h
M-26 Cultura Pura	1 ^o	0,96	2,55	3,90	4,77	4,90	4,97	5,34	5,34
	2 ^o	0,87	2,45	3,85	4,92	5,17	5,28	5,32	5,67
	3 ^o	1,00	1,95	4,04	5,15	5,46	5,79	5,86	6,16
	4 ^o	0,94	2,35	3,73	4,76	5,09	5,22	5,32	5,59
	5 ^o	1,14	2,56	3,94	4,84	5,07	5,21	5,19	5,59
	6 ^o	1,07	2,47	3,75	4,76	5,09	5,21	5,32	5,65
Média		1,00	2,39	3,87	4,87	5,13	5,28	5,39	5,67
M-26 Cultura Mista	1 ^o	0,89	2,54	3,89	4,75	4,88	4,95	4,97	5,29
	2 ^o	0,75	2,29	3,76	4,92	5,18	5,39	5,45	5,74
	3 ^o	0,81	2,26	3,62	4,86	5,21	5,34	5,39	5,68
	4 ^o	0,99	2,42	3,95	4,94	5,11	5,26	5,33	5,59
	5 ^o	1,00	2,53	4,03	4,91	5,16	5,26	5,31	5,51
	6 ^o	1,10	2,69	4,18	5,15	5,35	5,45	5,51	5,79
Média		0,92	2,46	3,91	4,92	5,15	5,28	5,33	5,60
PE-2 Cultura Pura	1 ^o	0,86	2,40	3,69	4,58	4,81	4,91	4,97	5,29
	2 ^o	0,68	2,11	3,50	4,56	4,93	5,07	5,17	5,50
	3 ^o	0,77	2,14	3,45	4,58	5,02	5,18	5,24	5,58
	4 ^o	0,88	2,25	3,63	4,69	5,09	5,29	5,37	5,69
	5 ^o	1,00	2,36	3,76	4,73	5,08	5,23	5,29	5,57
	6 ^o	1,06	2,49	3,86	4,84	5,18	5,31	5,38	5,70
Média		0,88	2,29	3,65	4,66	5,02	5,17	5,24	5,56
PE-2 Cultura Mista	1 ^o	0,85	2,43	3,77	4,70	4,89	4,98	5,11	5,32
	2 ^o	0,70	2,19	3,61	4,73	5,10	5,28	5,34	5,67
	3 ^o	0,68	2,18	3,60	4,81	5,36	5,56	5,63	5,93
	4 ^o	0,80	2,28	3,86	5,04	5,37	5,51	5,58	5,84
	5 ^o	0,85	2,27	3,75	4,64	5,24	5,37	5,46	5,71
	6 ^o	0,83	2,23	3,67	4,73	5,17	5,32	5,42	5,76
Média		0,79	2,26	3,71	4,78	5,19	5,34	5,42	5,71

ANEXOS C: Análise estatística

Tabela 24. Quadro da análise de variância dos resultados obtidos dos plaqueamentos realizados através do microplaqueamento em gotas e do plaqueamento em profundidade, em meio de cultivo MRS, de uma amostra de cultura de *L. fermentum* CCT 1407 (UFC.10⁶mL⁻¹).

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob>F
Tratamento	1	180,000	180,000	3,817	0,0636
Resíduo	18	848,800	47,156		
Total	19	1028,800			

média geral: 260,340

Tabela 25. Quadro da análise de variância dos resultados obtidos dos plaqueamentos realizados através do microplaqueamento em gotas e do plaqueamento em profundidade, em meio de cultivo MRS, de uma amostra de cultura de *L. fermentum* CCT 1407 (UFC.10⁶mL⁻¹).

C.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob>F
Tratamento	1	42,050	42,050	1,2431	0,0279
Resíduo	18	608,900	33,828		
Total	19	650,850			

média geral: 96,450

Tabela 26. Resultados obtidos no teste de Tukey para a variável rendimento fermentativo ao final dos ciclos com cultura mista de *L. fermentum* CCT-1407 e as linhagens Fleischmann ou PE-2 de *S. cerevisiae* sem ou com a adição de extrato de levedura (+ ext.) ao mosto.

Tratamentos	Ciclos Fermentativos					
	1º ciclo	2º ciclo	3º ciclo	4º ciclo	5º ciclo	6º ciclo
Fleischmann	88,34 a	91,45 ab	91,01 a	86,71 b	84,96 b	81,76 c
Fleisch+ext	88,39 a	90,65 b	88,13 b	85,97 b	83,87 b	86,38 b
PE-2	87,47 a	92,39 a	91,81 a	92,22 a	91,36 a	89,22 a
PE-2+ext	87,11 a	91,86 ab	90,53 a	91,06 a	90,15 a	90,15 a

Coeficiente de Variação: 0,663%

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si em uma mesma coluna de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Tabela 27. Resultados obtidos no teste de Tukey para a variável brotamento ao final dos ciclos fermentativos com cultura mista de *L. fermentum* CCT-1407 e as linhagens Fleischmann ou PE-2 de *S. cerevisiae* sem ou com a adição de extrato de levedura (+ ext.) ao mosto.

Tratamentos	Ciclos Fermentativos					
	1º ciclo	2º ciclo	3º ciclo	4º ciclo	5º ciclo	6º ciclo
Fleischmann	1,0 b	2,0 b	2,9 a	1,4 b	2,7 b	1,5 a
Fleisch+ext	2,1 ab	3,0 ab	2,3 a	2,6 ab	5,5 a	1,8 a
PE-2	2,8 ab	4,5 a	4,0 a	3,8 a	3,1 b	2,9 a
PE-2+ext	3,3 a	4,1 ab	3,3 a	4,6 a	2,8 b	2,6 a

Coeficiente de Variação: 33,183%

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si em uma mesma coluna de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Tabela 28. Resultados obtidos no teste de Tukey para a variável viabilidade celular ao final dos ciclos fermentativos com cultura mista de *L. fermentum* CCT-1407 e as linhagens Fleischmann ou PE-2 de *S. cerevisiae* sem ou com a adição de extrato de levedura (+ ext.) ao mosto.

Tratamentos	Ciclos Fermentativos					
	1º ciclo	2º ciclo	3º ciclo	4º ciclo	5º ciclo	6º ciclo
Fleischmann	96,4 a	84,9 b	72,9 b	51,7 b	32,6 b	23,8 b
Fleisch+ext	92,7 b	86,6 b	71,5 b	54,2 b	31,5 b	25,8 b
PE-2	99,2 a	98,7 a	97,5 a	94,7 a	92,9 a	88,1 a
PE-2+ext	99,1 a	98,5 a	97,5 a	93,7 a	90,7 a	88,4 a

Coeficiente de Variação: 1,701%

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si em uma mesma coluna de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Tabela 29. Resultados obtidos no teste de Tukey para a variável teor alcoólico do vinho delevurado ao final dos ciclos fermentativos com cultura mista de *L. fermentum* CCT-1407 e as linhagens Fleischmann ou PE-2 de *S. cerevisiae* sem ou com a adição de extrato de levedura (+ ext.) ao mosto.

Tratamentos	Ciclos Fermentativos					
	1º ciclo	2º ciclo	3º ciclo	4º ciclo	5º ciclo	6º ciclo
Fleischmann	8,79 a	9,11 c	9,11 b	8,57 d	8,48 c	8,63 b
Fleisch+ext	8,81 a	9,18 bc	8,83 c	8,69 c	8,49 c	8,18 c
PE-2	8,70 b	9,22 ab	9,11 b	9,15 b	9,08 b	9,06 a
PE-2+ext	8,67 b	9,28 a	9,25 a	9,27 a	9,21 a	8,99 a

Coeficiente de Variação: 0,409%

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si em uma mesma coluna de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Tabela 30. Resultados obtidos no teste de Tukey para a variável biomassa ao final dos ciclos fermentativos com cultura mista de *L. fermentum* CCT-1407 e as linhagens Fleischmann ou PE-2 de *S. cerevisiae* sem ou com a adição de extrato de levedura (+ ext.) ao mosto.

Tratamentos	Ciclos Fermentativos					
	1º ciclo	2º ciclo	3º ciclo	4º ciclo	5º ciclo	6º ciclo
Fleischmann	10,11 a	11,32 c	11,79 b	11,17 c	11,09 c	10,81 c
Fleisch+ext	10,24 a	11,33 bc	11,34 c	10,78 d	10,88 c	10,99 c
PE-2	10,14 a	11,82 a	12,95 a	13,50 a	14,51 a	14,84 a
PE-2+ext	10,19 a	11,68 ab	12,67 a	13,14 b	13,97 b	14,10 b

Coeficiente de Variação: 1,338%

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si em uma mesma coluna de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Tabela 31. Resultados obtidos no teste de Tukey para a variável pH do vinho delevurado ao final dos ciclos fermentativos com cultura mista de *L. fermentum* CCT-1407 e as linhagens Fleischmann ou PE-2 de *S. cerevisiae* sem ou com a adição de extrato de levedura (+ ext.) ao mosto.

Tratamentos	Ciclos Fermentativos					
	1º ciclo	2º ciclo	3º ciclo	4º ciclo	5º ciclo	6º ciclo
Fleischmann	4,82 b	4,44 c	4,37 c	4,13 c	4,20 d	4,09 d
Fleisch+ext	4,84 b	4,39 c	4,21 d	4,23 d	4,28 c	4,32 b
PE-2	5,08 a	4,72 a	4,71 a	4,78 a	4,75 a	4,78 a
PE-2+ext	5,02 a	4,64 b	4,56 b	4,60 b	4,55 b	4,51 b

Coeficiente de Variação: 0,637%

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si em uma mesma coluna de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Tabela 32. Resultados obtidos no teste de Tukey para a variável açúcares residuais no vinho delevurado ao final dos ciclos fermentativos com cultura mista de *L. fermentum* CCT-1407 e as linhagens Fleischmann ou PE-2 de *S. cerevisiae* sem ou com a adição de extrato de levedura (+ ext.) ao mosto.

Tratamentos	Ciclos Fermentativos					
	1º ciclo	2º ciclo	3º ciclo	4º ciclo	5º ciclo	6º ciclo
Fleischmann	0,00 a	0,02 a	0,00 a	0,03 a	0,02 a	0,24 a
Fleisch+ext	0,02 A	0,24 a	0,00 a	0,03 a	0,03 a	0,05 b
PE-2	0,02 a	0,02 a	0,01 a	0,03 a	0,01 a	0,04 b
PE-2+ext	0,01 a	0,01 a	0,01 a	0,08 a	0,01 a	0,06 b

Coeficiente de Variação: 82,051%

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si em uma mesma coluna de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Tabela 33. Resultados obtidos no teste de Tukey para a variável viabilidade celular ao final dos ciclos fermentativos realizados com cultura mista de *L. fermentum* CCT 1407 e as linhagens Fleischmann ou PE-2 de *S. cerevisiae*, submetidas (linhagem/com) ou não (linhagem/sem) a um estresse térmico do inóculo a 40 °C durante 22 h.

Tratamentos	Ciclos Fermentativos					
	1º ciclo	2º ciclo	3º ciclo	4º ciclo	5º ciclo	6º ciclo
Fleis. com estr.	64,2 c	46,1 b	39,2 c	32,5 c	27,2 c	26,2 b
Fleis. sem estr.	89,7 b	84,3 a	72,6 b	57,4 b	52,4 b	40,5 a
PE-2 com estr.	65,3 c	45,9 b	44,1 c	37,9 c	29,4 c	30,7 b
PE-2 sem estr.	95,6 a	89,6 a	81,2 a	70,0 a	66,1 a	45,0 a

Coeficiente de Variação: 4,754%

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si em uma mesma coluna de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Tabela 34. Resultados obtidos no teste de Tukey para a variável contaminação ($\text{UFC} \cdot 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$) ao final dos ciclos fermentativos realizados com cultura mista de *L. fermentum* CCT 1407 e as linhagens Fleischmann ou PE-2 de *S. cerevisiae*, submetidas (linhagem/com) ou não (linhagem/sem) a estresse térmico do inóculo a 40 °C durante 22 h.

Tratamentos	Ciclos Fermentativos					
	1º ciclo	2º ciclo	3º ciclo	4º ciclo	5º ciclo	6º ciclo
Fleis. com estr.	3,3 a	10,6 a	17,9 a	62,7 a	186,7 a	261,1 a
Fleis. sem estr.	1,7 a	5,9 a	16,0 a	52,4 ab	81,7 b	151,7 b
PE-2 com estr.	5,3 a	15,8 a	27,5 a	66,0 a	159,7 a	232,1 a
PE-2 sem estr.	1,9 a	5,3 a	7,1 a	22,1 b	35,6 c	67,2 c

Coeficiente de Variação: 23,090%

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si em uma mesma coluna de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Tabela 35. Resultados obtidos no teste de Tukey para a variável brotamento ao final dos ciclos fermentativos realizados com cultura mista de *L. fermentum* CCT 1407 e as linhagens Fleischmann ou PE-2 de *S. cerevisiae*, submetidas (linhagem/com) ou não (linhagem/sem) a um estresse térmico do inóculo a 40 °C durante 22 h.

Tratamentos	Ciclos Fermentativos					
	1º ciclo	2º ciclo	3º ciclo	4º ciclo	5º ciclo	6º ciclo
Fleis. com estr.	1,6 c	2,2 a	2,9 a	3,2 a	7,5 a	5,5 a
Fleis. sem estr.	5,9 ab	4,3 a	4,1 a	5,3 a	3,2 b	6,1 a
PE-2 com estr.	4,6 bc	4,3 a	3,4 a	4,1 a	5,1 ab	3,8 a
PE-2 sem estr.	8,2 a	3,1 a	3,3 a	3,2 a	2,3 b	4,8 a

Coeficiente de Variação: 36,585%

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si em uma mesma coluna de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Tabela 36. Resultados obtidos no teste de Tukey para a variável biomassa celular ao final dos ciclos fermentativos realizados com cultura mista de *L. fermentum* CCT 1407 e as linhagens Fleischmann ou PE-2 de *S. cerevisiae*, submetidas (linhagem/com) ou não (linhagem/sem) a um estresse térmico do inóculo a 40 °C durante 22 h.

Tratamentos	Ciclos Fermentativos					
	1º ciclo	2º ciclo	3º ciclo	4º ciclo	5º ciclo	6º ciclo
Fleis. com estr.	7,36 c	7,03 d	7,44 c	8,16 b	8,71 b	9,25 b
Fleis. sem estr.	8,35 b	8,49 b	9,01 a	9,05 a	9,39 a	10,07 a
PE-2 com estr.	7,61 c	7,65 c	8,02 b	8,48 b	9,27 a	9,74 a
PE-2 sem estr.	8,75 a	9,07 a	9,34 a	9,33 a	9,59 a	9,84 a
Coeficiente de Variação: 2,005%						

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si em uma mesma coluna de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Tabela 37. Resultados obtidos no teste de Tukey para a variável pH do vinho delevurado ao final dos ciclos fermentativos realizados com cultura mista de *L. fermentum* CCT 1407 e as linhagens Fleischmann ou PE-2 de *S. cerevisiae*, submetidas (linhagem/com) ou não (linhagem/sem) a um estresse térmico do inóculo a 40 °C durante 22 h.

Tratamentos	Ciclos Fermentativos					
	1º ciclo	2º ciclo	3º ciclo	4º ciclo	5º ciclo	6º ciclo
Fleis. com estr.	3,95 c	3,63 c	3,55 c	3,51 c	3,45 c	3,31 cC
Fleis. sem estr.	4,25 a	4,13 a	4,10 a	4,07 a	3,89 a	3,76 a
PE-2 com estr.	4,13 b	3,77 b	3,72 b	3,69 b	3,60 b	3,41 b
PE-2 sem estr.	4,26 a	4,18 a	4,14 a	4,09 a	3,94 a	3,78 a
Coeficiente de Variação: 2,018%						

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si em uma mesma coluna de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Tabela 38. Resultados obtidos no teste de Tukey para a variável rendimento fermentativo ao final dos ciclos fermentativos realizados com cultura mista de *L. fermentum* CCT 1407 e as linhagens Fleischmann ou PE-2 de *S. cerevisiae*, submetidas (linhagem/com) ou não (linhagem/sem) a um estresse térmico do inóculo a 40 °C durante 22 h.

Tratamentos	Ciclos Fermentativos					
	1º ciclo	2º ciclo	3º ciclo	4º ciclo	5º ciclo	6º ciclo
Fleis. com estr.	55,1 b	68,4 c	71,9 c	75,6 c	76,2 c	76,5 c
Fleis. sem estr.	93,1 a	92,0 a	92,2 a	91,9 a	91,8 a	91,3 a
PE-2 com estr.	88,0 b	87,8 b	85,8 b	85,8 b	85,4 b	87,1 b
PE-2 sem estr.	91,7 a	91,9 a	92,7 a	92,7 a	92,6 a	92,7 a

Coeficiente de Variação: 1,722%

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si em uma mesma coluna de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Tabela 39. Resultados obtidos no teste de Tukey para a variável etanol no vinho delevurado ao final dos ciclos fermentativos realizados com cultura mista de *L. fermentum* CCT 1407 e as linhagens Fleischmann ou PE-2 de *S. cerevisiae*, submetidas (linhagem/com) ou não (linhagem/sem) a um estresse térmico do inóculo a 40 °C durante 22 h.

Tratamentos	Ciclos Fermentativos					
	1º ciclo	2º ciclo	3º ciclo	4º ciclo	5º ciclo	6º ciclo
Fleis. com estr.	5,16 c	6,77 c	7,11 c	7,51 c	7,59 c	7,66 c
Fleis. sem estr.	8,81 a	9,19 a	9,19 a	9,20 a	9,18 a	9,13 a
PE-2 com estr.	8,27 b	8,73 b	8,55 b	8,60 b	8,55 b	8,66 b
PE-2 sem estr.	8,65 a	9,20 a	9,23 a	9,31 a	9,27 a	9,29 a

Coeficiente de Variação: 1,607%

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si em uma mesma coluna de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Tabela 40. Resultados obtidos no teste de Tukey para a variável glicerol ao final dos ciclos fermentativos realizados com cultura mista de *L. fermentum* CCT 1407 e as linhagens Fleischmann ou PE-2 de *S. cerevisiae*, submetidas (linhagem/com) ou não (linhagem/sem) a um estresse térmico do inóculo a 40 °C durante 22 h.

Tratamentos	Ciclos Fermentativos					
	1º ciclo	2º ciclo	3º ciclo	4º ciclo	5º ciclo	6º ciclo
Fleis. com estr.	0,31 b	0,40 a	0,49 a	0,72 a	0,88 a	0,95 a
Fleis. sem estr.	0,47 a	0,42 a	0,43 a	0,60 b	0,74 b	0,66 c
PE-2 com estr.	0,46 a	0,46 a	0,46 a	0,70 a	0,87 a	0,79 b
PE-2 sem estr.	0,46 a	0,42 a	0,41 a	0,53 b	0,60 c	0,46 d
Coeficiente de Variação: 7,046%						

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si em uma mesma coluna de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Tabela 41. Resultados obtidos no teste de Tukey para a variável açúcares residuais no vinho ao final dos ciclos fermentativos realizados com cultura mista de *L. fermentum* CCT 1407 e as linhagens Fleischmann ou PE-2 de *S. cerevisiae*, submetidas (linhagem/com) ou não (linhagem/sem) a um estresse térmico do inóculo a 40 °C durante 22 h.

Tratamentos	Ciclos Fermentativos					
	1º ciclo	2º ciclo	3º ciclo	4º ciclo	5º ciclo	6º ciclo
Fleis. com estr.	5,96 a	3,14 a	2,18 a	1,54 a	1,29 a	1,19 a
Fleis. sem estr.	0,16 b	0,05 b	0,04 b	0,07 b	0,01 b	0,02 b
PE-2 com estr.	0,22 b	0,24 b	0,41 b	0,27 b	0,25 b	0,15 b
PE-2 sem estr.	0,05 b	0,06 b	0,04 b	0,04 b	0,00 b	0,01 b
Coeficiente de Variação: 40,688%						

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si em uma mesma coluna de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Tabela 42. Resultados obtidos no teste de Tukey para a variável contaminação bacteriana ao final de 6 ciclos fermentativos dos 4 tratamentos constituídos de inóculo com a linhagem M-26 em cultura pura e em cultivo misto com *L. fermentum* CCT-1407 e da linhagem PE-2 em cultura pura e em cultura mista com a bactéria.

Tratamentos	Ciclos Fermentativos					
	1º ciclo	2º ciclo	3º ciclo	4º ciclo	5º ciclo	6º ciclo
M-26 pura	0,000 a	0,001 b	0,001 c	0,003 c	0,034 c	0,115 c
M-26 mista	4,000 a	9,300 a	13,700 b	13,300 b	28,100 b	33,100 b
PE-2 pura	0,007 a	0,003 b	0,000 c	0,012 c	0,044 c	0,215 c
PE-2 mista	4,700 a	13,000 a	20,600 a	30,000 a	44,700 a	59,900 a

Coeficiente de Variação: 19,902%

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si em uma mesma coluna de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Tabela 43. Resultados obtidos no teste de Tukey para a variável pH do vinho delevurado ao final de 6 ciclos fermentativos dos 4 tratamentos constituídos de inóculo com a linhagem M-26 em cultura pura e em cultivo misto com *L. fermentum* CCT-1407 e da linhagem PE-2 em cultura pura e em cultura mista com a bactéria.

Tratamentos	Ciclos Fermentativos					
	1º ciclo	2º ciclo	3º ciclo	4º ciclo	5º ciclo	6º ciclo
M-26 pura	4,74 b	4,73 b	4,72 b	4,71 b	4,70 b	4,70 b
M-26 mista	4,77 b	4,76 b	4,75 b	4,70 b	4,60 c	4,53 c
PE-2 pura	4,81 a	4,77 b	4,84 a	8,84 a	4,81 a	7,78 a
PE-2 mista	4,84 a	4,82 a	4,82 a	4,74 b	4,59 c	4,49 c

Coeficiente de Variação: 0,405%

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si em uma mesma coluna de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCARDE, V.E. Avaliação de antimicrobianos na germinação de esporos e na multiplicação de bactérias isoladas de processos de fermentação alcoólica. Piracicaba, 1995. 114p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- ALVES, D.M.G. Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica. Piracicaba, 1994. 274p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- ALVES, D.M.G. Respostas fisiológicas de duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* frente ao potássio durante a fermentação alcoólica. Rio Claro. 2000. 118p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho".
- ALTERTHUM, F.; MELO CRUZ, M.R.; RIBEIRO VAIRO, M.L.; GAMBASSI, D.M. Efeitos dos microrganismos contaminantes da fermentação alcoólica nas microdestilarias. STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos, v.3, n.1, p.42-46, set./out. 1984.
- AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J. Infecção na fermentação: como evitá-la. Açúcar e Álcool, v.5, p.12-18, 1982

- ARANHA, D.A.D. Efeitos do alumínio sobre a fermentação alcoólica. Piracicaba, 2002. 86p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. Habilidade fermentativo de levedura isoladas do processo industrial. Relatório Anual de Pesquisa em Fermentação Alcoólica, n.1, p.52-76, 1996
- BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G.; AMORIN, H.V. The antibacterial action of succinic acid produced by yeast during fermentation. Revista de Microbiologia, v.28, supl.1, p.77-82, 1997.
- BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. GUTIERREZ, L.E. Estudo comparativo entre os fermentos Fleischmann, IZ-1904 e M-300 A (TA). Relatório Anual de Pesquisa em Fermentação Alcoólica, n.8, p.34-43, 1988.
- BASSO, L.C.; OLIVEIRA, A.J.; ORELLI, V.D.; CAMPOS, A.D. GALLO, C.R., AMORIM, H.V.; Dominance of wild yeast over industrial yeast strain evaluated by karyotyping technique. Yeast Newsletter, v.52, n.2, p.50, 1993.
- BRIN, M. Tranketalose: clinical aspects. Methods in Enzymology, v.9, p.506-514, 1966.
- BROSNAN, M.P.; DONNELLY, D.; JAMES, T.C.; BOND, U. stress response is repressed during fermentation in brewery strains of yeast. Journal of Applied Microbiology. v.88, n.5, p.746-755, May 2000.
- CARVALHO, R.S. Interações entre leveduras e bactérias durante a fermentação alcoólica. Piracicaba, 2001. 74p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

- CHIN, P.M.; INGLEDEW, W.M. Effect of lactic acid bacteria on wheat mash fermentations prepared with laboratory backset. *Enzyme Microbiology and Technology*, v. 16, p.311-317, 1994.
- 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, Sept. 2002.
- D'AMORE, T.; STEWART, G. Ethanol tolerance of yeast. *Enzyme and Microbial Technology Biotechnology Research and Reviews*, v.9, n.6, p.322-330, 1987.
- D'AMORE, T.; CRUMPLEN, R.; STEWART, G.G. The involvement of trehalose in yeast stress tolerance. *Journal of Industrial Microbiology*, v.91, p.191-196, 1991.
- DE MAN, J.C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, v.1, n.23, p.130-135, 1960.
- FERGUGLIA, R.M.O. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* em cultura mista com *Lactobacillus fermentum* envolvidos na floculação de leveduras. Piracicaba, 1997. 104p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- FREDERICK, M.K.B. Estudo genético, fisiológico e molecular de *Lactobacillus fermentum* envolvidos na floculação de leveduras. Campinas, 1994. 56p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- GALLO, C.R. Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica. Campinas, 1990. 388p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

GALLO, C.R.; CANHOS, V.P. Contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica - revisão. STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos, v.9, n.4/5, p.35-40, mar./jun. 1991.

GOMES, F.P. Estatística experimental. 13.ed. Piracicaba: ESALQ, 1990. 468p.

GRIFFITH, A.D.; CYR, D.M.; EGAN, S.G. TREMBLEY, G.C.. Inhibition of pyruvate carboxilase by sequestration of coenzyme A with sodium benzoate. Archives of Biochemistry and Biophysical, v.269, p.201-207, 1989.

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

GUTIERREZ, L.E. Efeito da adição de sulfato de amônio sobre a produção de ácido succínico durante a fermentação alcoólica. Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". v. 45, n. 2, p.433-440, 1988.

GUTIERREZ, L.E. Bioquímica de leveduras. Piracicaba: ESALQ, 1997. 270p.

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

KANDLER, O.; WEISS, R.B. Regular nonsporing gram positive rods. In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLF, J.G. (Ed.). Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore: Williams and Wilkens, 1986. v.2, p. 1208-1234.

- MacMASTER, L.D.; RAVNO, A.B. Sucrose loss in diffusion with reference to thermophilic bacteria and lactic acid. Processing South African Sugar Technology Association, v.49, p.49-52, 1975.
- MATIAZI, H.J. Efeito de agentes estressantes sobre o teor de trealose em *Saccharomyces cerevisiae*. Piracicaba, 1995. 70p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- MURIANA, P.M.; KLAENHAMMER, T.R. Purification and partial characterization of lactacin F a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Applied and Environmental Microbiology, v.57, n.1, p.114-121, 1991.
- NARENDRANATH. N.V.; HYNWA, S.H.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M.. Effects of lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentation. Applied and Environmental Microbiology, v.63, n.11, p.4158-4163, Nov. 1997.
- NGANG, J.J.E.; LETOURNEUA, F.; VILLA, P. Alcoholic fermentation of beet molasses: effects of lactic acid on yeast fermentation parameters. Applied and Microbiological Biotechnology, v.31, p.125-128, 1989
- NGANG, J.J.E; WOLNIEWICZ, E.; LETOURNEAU, F.; VILLA, P. Stimulation of *lactobacilli* during alcoholic fermentation action of sucrose hydrolysis by yeast. Biotechnology Letters, v.14, n.8, p.741-746, Aug. 1992.
- NOVAES, F.V. Processos fermentativos. In: MUTTON, M.J.R. (Ed.). Aguardente de cana: produção e qualidade. Jaboticabal: Funep, 1992. p.37-48
- OLIVA-NETO, P. Influência da contaminação por bactérias lácticas na fermentação alcoólica pelo processo de batelada alimentada. Campinas, 1990. 207p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

- OLIVA-NETO, P. Estudo de diferentes fatores que influenciam o crescimento da população bacteriana contaminante da fermentação alcoólica por leveduras. Campinas, 1995. 183p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Evaluation of bacterial contamination in a fed-batch alcoholic fermentation process. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.10, n.6, p.697-699, 1994.
- OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Effects of nutritional factors on growth of *Lactobacillus fermentum* mixed with *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation. *Revista de Microbiologia*, v.28, p.25-31, 1997.
- OLIVEIRA, A.J.; GALO, C.R.; ALCARDE, V.E. Efeito da temperatura e pH na germinação de esporos de bactérias em processos de fermentação alcoólica. *Álcool e Açúcar*, v.15, n.80, p.32-35, jun./jul. 1995.
- OLIVEIRA, A.J.; GALO, C.R.; ALCARDE, V.E.; GODOY, A.; GARCIA, C.E. Curso de treinamento em microbiologia. Piracicaba: FERMENTEC; ESALQ, 1996. 37p.
- OURA, E. Reaction products of yeast fermentations. *Process Biochemistry*, v.12, p.644-651, 1977.
- PAMPULHA, M.E.; LOUREIRO, V. Interaction of the effects of acetic acid and ethanol on inhibition of fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, v.11, n. 4, p.269-274, 1989.
- PANEK, A.C.; MANSURE, J.J.A.; PASCHOALIN, M.F.; PANEK, D. Regulation of trehalose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* mutants during temperature shifts. *Biochemie*, v.72, p.77-79, 1990.

PATARO, C.; GUERRA, J.B.; GOMES, F.C.O.; NEVES, M.J.; PIMENTES.; ROSA, C.A. Trehalose accumulation, invertase activity and physiological characteristics of yeast isolated from 24 fermentation cycles during the production of artisanal brazilian cachaça. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.33, n.3, p.202-208, 2002.

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

ROSALES, S.Y.R. Contaminantes bacterianos da fermentação etanólica: isolamento em meios diferenciais, identificação e avaliação de desinfectantes. Rio Claro, 1989. 200p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho".

SERRA, G.E.; CEREDA, M.P.; FERES, R.J.F.; BERTOZO, M.T.; VICENTE, A.L. Contaminação da fermentação alcoólica "floculação do fermento". *Brasil Açucareiro*, v.93, p.26-31, 1979.

SERRA, G.E.; CEREDA, M.P.; PINTO, S.Z.; MENEGUIM, M.A.; MARINO, E.A.; FERREIRA, L.J.; BERTHIOL, A.E. Controle microbiológico da fermentação alcoólica em condições industriais. In: SIMPÓSIO DE TECNOLOGIA DO AÇÚCAR E DO ÁLCOOL, 3., Águas de São Pedro, 1980. Anais. Águas de São Pedro: STAB, 1980. p.387-295.

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

- SILVA, S.M.G. Efeitos do cádmio sobre a fermentação alcoólica e o uso da vinhaça par atenuar a sua ação tóxica. Piracicaba, 2001. 135p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- THEVELEIN, J.M. Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiological Reviews*, v.48, n.1, p.42-59, 1984.
- 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, p.819-828, 2001.
- TILBURY, R.H. Occurrence and effects of lactic acid bacteria in sugar industry. In: CAN, J.G. *Lactic acid bacteria in beverages and food*. London: Academic Press, 1975. p.171-177.
- TREVELYAN, W.E.; HARRINSON, J.S. Studies on yeast metabolism. 5. The trehalose content of baker's yeast during anaerobic fermentation. *Biochemical Journal*, v.62, p.177-183, 1956a.
- TREVELYAN, W.E.; HARRINSON, J.S. Studies on yeast metabolism 7. Yeast carbohydrate fraction. Separation from nucleic acid analysis and behavior during anaerobic fermentation. The trehalose content of baker's yeast during anaerobic fermentation. *Biochemical Journal*, v.63, n.2. p.23-33, 1956b.
- VIEGAS, C.A.; ROSA, M.F.; SÁ-CORREIA, I.; NOVAIS, J.M. inhibition of yeast growth by octanoic and decanoic acids produced during ethanolic fermentation. *Applied Enviromental Microbiology*, v.55, n.1, p.21-28, 1989.
- WALKER, G.M. *Yeast physiology and biotechnology*. New York: John Wiley, 1998. 350p.

WIENKEN, A. Trehalose in yeast, stress protection rather than reserve carbohydrate. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.58, p.209-217, 1990.

YOKOYA, F. Problemas com contaminantes na fermentação alcoólica. *STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos*, v.9, n.65, p.38-39, jul./ago. 1991.

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

ZAGO, E.A. Efeito da concentração de N, P, Mg, Mn, e Zn na multiplicação de leveduras industriais. Piracicaba, 1982. 125p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz", Universidade de São Paulo.

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