

**Sinergismo entre sulfito, ácido láctico, pH e etanol na
fermentação alcoólica de *Saccharomyces cerevisiae*
PE-2 e M-26**

CLAUDIA DORTA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências
do Campus de Rio Claro, Universidade
Estadual Paulista, para obtenção do título de
Doutorado em Ciências Biológicas (área de
Microbiologia Aplicada)

**Rio Claro
Estado de São Paulo
2006**

**Sinergismo entre sulfito, ácido láctico, pH e etanol na
fermentação alcoólica de *Saccharomyces cerevisiae*
PE-2 e M-26**

CLAUDIA DORTA

Orientador: Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto

Tese apresentada ao Instituto de Biociências
do Campus de Rio Claro, Universidade
Estadual Paulista, para obtenção do título de
Doutorado em Ciências Biológicas (área de
Microbiologia Aplicada)

**Rio Claro
Estado de São Paulo
2006**

DEDICO,

À minha família por todo apoio e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto pela orientação, dedicação e confiança.

Aos biólogos Mário Soares de Abreu Neto e Nilson Nicolau Júnior, e aos alunos de Biotecnologia da Unesp de Assis Agnes Izumi Nagashima e Nelson Floresto Lizier pela cooperação, dedicação e amizade durante o desenvolvimento do trabalho.

À CAPES pela bolsa oferecida durante parte da realização deste trabalho.

Aos professores do curso de Pós-Graduação de Microbiologia Aplicada do Instituto de Biociências da Unesp de Rio Claro que contribuíram para a ampliação dos meus conhecimentos.

À USINA NOVA AMÉRICA pela doação de materiais e aos seus funcionários por suas colaborações.

Ao Ms. Vitório dos Santos Júnior e à Profa. Dr. Wilma Aparecida Spinosa do CEPECI (FEMA), Assis/ SP, por fornecerem o CG para a análise de etanol das amostras.

Ao Prof. Dr. Rogelio Brandão da UFOP/ MG e sua orientada Michelle B. Moura por suas contribuições.

Aos meus companheiros de laboratório de Bioquímica e Microbiologia da Unesp de Assis pela força e amizade.

À minha família por me apoiar nos momentos mais difíceis durante o desenvolvimento deste trabalho.

ÍNDICE

	Páginas
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	04
2.1. <i>Tecnologia da produção industrial de etanol carburante.....</i>	<i>04</i>
2.1.1. <i>Processos fermentativos.....</i>	<i>04</i>
2.1.2. <i>Efeito do tratamento ácido sulfúrico.....</i>	<i>05</i>
2.1.3. <i>Contaminação no processo da fermentação alcoólica.....</i>	<i>07</i>
2.2. <i>Metabolismo de Saccharomyces cerevisiae.....</i>	<i>09</i>
2.2.1. <i>Consumo do substrato.....</i>	<i>09</i>
2.2.2. <i>Trealose.....</i>	<i>10</i>
2.2.3. <i>Efeito antagônico do ácido lático</i>	<i>10</i>
2.2.4. <i>Efeito tóxico do etanol</i>	<i>12</i>
2.2.5. <i>Efeito inibitório do sulfito</i>	<i>13</i>
2.2.6. <i>pH e a atividade de H⁺-ATPase</i>	<i>15</i>
3. OBJETIVO.....	17
3.1. <i>Objetivo geral.....</i>	<i>17</i>
3.2. <i>Objetivos específicos.....</i>	<i>17</i>
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1. <i>Material</i>	<i>19</i>
4.1.1. <i>Microrganismos</i>	<i>19</i>
4.1.2. <i>Meios de cultivo e fermentativo.....</i>	<i>20</i>
4.2. <i>Condições de cultivo.....</i>	<i>20</i>
4.2.1. <i>Multiplificação dos microrganismos</i>	<i>20</i>
4.2.2. <i>Processos fermentativos</i>	<i>21</i>
4.2.2.1. <i>Verificação dos fatores sinérgicos de estresse</i>	<i>21</i>
4.2.2.2. <i>Efeito do tratamento ácido associado a outros fatores de fermentativos para a linhagem S. cerevisiae PE-2.....</i>	<i>22</i>
4.2.2.3. <i>pH ótimo fermentativo em condições de fatores de estresse associados.....</i>	<i>23</i>

4.2.2.4. Efeito do tratamento ácido e pH dos mostos durante a fermentação mista com <i>S. cerevisiae</i> PE-2 e <i>L. fermentum</i> CCT 1396. ...	24
4.3. Técnicas Analíticas	25
4.3.1. Técnicas analíticas para a análise microbiana	25
4.3.1.1. Determinação da biomassa seca	25
4.3.1.2. Viabilidade e brotamento das leveduras	25
4.3.1.3. Contagem de leveduras e bactérias	25
4.3.1.4 Contagem de células viáveis de bactérias	26
4.3.1.5. Produção de biomassa seca	26
4.3.1.6. Determinação da acidez total expressa em ácido láctico.....	26
4.3.1.7. Quantificação e identificação dos ácidos orgânicos	27
4.3.1.8. Cálculo da atividade da Bomba de prótons	27
4.3.1.9. Determinação da trealose	28
4.3.1.10. Determinação da proteína residual	29
4.3.1.11. Determinação de Açúcares Redutores Residuais (ARRT).....	29
4.3.1.12. Determinação da concentração de etanol	29
4.4. Cálculos relacionados à produção etanólica	29
4.5. Forma de análise dos resultados	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1. Processos fermentativos com fatores sinérgicos de estresse	31
5.1.1. Viabilidade e brotamento	31
5.1.2. Produção de Biomassa	36
5.1.3. Acidez total expressa em ácido láctico e ácidos orgânicos.....	36
5.1.4. Atividade da Bomba de próton	39
5.1.5. Trealose	41
5.1.6. Proteína residual	45
5.1.7. Determinação do açúcar redutor residual total (ARRT), rendimento e produtividade etanólica	47
5.2. Efeito do tratamento ácido associado a outros fatores de estresse para a linhagem <i>S. cerevisiae</i> PE-2.	52

5.2.1. Viabilidade e Brotamento	52
5.2.2. Produção de Biomassa	55
5.2.3. Acidez total expressa em ácido lático.....	58
5.2.4. Atividade da bomba de prótons	59
5.2.5. Trealose	61
5.2.6. Proteína residual	64
5.2.7. Determinação do açúcar redutor residual total, rendimento e produtividade etanólicos.....	64
5.3. pH ótimo fermentativo sob condições de fatores de estresse associados	74
5.3.1. Viabilidade e Brotamento	74
5.3.2. Produção de Biomassa	74
5.3.3. Acidez total expressa em ácido lático.....	78
5.3.4. Atividade da Bomba de prótons	78
5.3.5. Trealose	80
5.3.6. Proteína residual	80
5.3.7. Determinação do açúcar redutor residual total, rendimento e produtividade etanólica	84
5.4. Efeito do tratamento ácido e pH dos mostos durante a fermentação mista de <i>S. cerevisiae</i> PE-2 e <i>L. fermentum</i> CCT 1396	89
5.4.1. Viabilidade e Brotamento	89
5.4.2. Produção de Biomassa e Relação Bactéria/ Levedura	92
5.4.3. Acidez total expressa em ácido lático.....	95
5.4.4. Atividade da Bomba de prótons	97
5.4.5. Trealose	101
5.4.6. Proteína residual	102
5.4.7. Determinação do açúcar residual, rendimento e produtividade etanólica.....	105
6- CONCLUSÕES	111
7-RESUMO	113
8-ABSTRACT	115

9-LITERATURA CITADA	117
----------------------------------	------------

1. INTRODUÇÃO

A indústria sucro-alcooleira no Brasil é de grande importância para a economia. O etanol, além de suas propriedades antimicrobianas, é utilizado como combustível alternativo para automóveis, sendo menos poluente que a gasolina e, além disso, é derivado de uma fonte de energia renovável. Devido ao alto custo da gasolina gerado por conflitos e oscilações econômicas mundiais, e por ser derivada de uma fonte de energia não renovável (o petróleo), o etanol está ganhando abertura para se tornar uma importante matriz energética mundial.

A produção comercial de álcool no Brasil é feita mediante do processo de batelada alimentada ou fermentação contínua. O etanol é produzido após a fermentação do açúcar de cana por *Saccharomyces cerevisiae*, na qual existe o reciclo de células que acaba intensificando o problema da contaminação bacteriana. Tal problema caracteriza-se pela floculação, diminuição do açúcar e álcool, além do decréscimo do crescimento e da viabilidade da levedura como resultado dos componentes tóxicos liberados no meio pelos contaminantes.

As bactérias lácticas, principalmente as pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, são comumente responsáveis pela diminuição do rendimento alcoólico nas usinas. Segundo MAIORELLA (1983), 40 g/L de ácido lático foi suficiente para o

decréscimo de 80% na população de *Saccharomyces cerevisiae* crescidas em meio sintético. De acordo com CARTWRIGHT *et al.* (1989), o mecanismo em que os ácidos presentes no meio fermentativo atuam dependem do valor do pH. Assim, em pH baixo os ácidos orgânicos estarão predominantemente em sua forma não dissociada, permitindo com que estes entrem na membrana da levedura passivamente, já que esta impede a entrada passiva de íons.

O tratamento da levedura com ácido sulfúrico é feito nas usinas sucro-alcooleiras após o término de cada ciclo fermentativo para evitar o aumento de bactérias contaminantes e diminuir a floculação, entretanto, este procedimento pode interferir negativamente no metabolismo e fisiologia do fermento.

Desde a última década do século XX as usinas de açúcar e álcool têm aumentado a dosagem de melaço no mosto fermentativo em relação ao caldo de cana, acarretando maiores problemas para a produção etanólica, como a adição de sulfito no processo. Tal substância é utilizada na clarificação do açúcar e acumulada tornando-se excessiva no melaço. A presença do referido reagente, em quantidades elevadas no melaço-de-cana, tem sido descrita por pesquisadores como um outro fator de diminuição do rendimento alcoólico, da viabilidade e do crescimento celular de leveduras. Entretanto, ALVES (1994) chegou a conclusão que a presença de sulfito no meio fermentativo pode exercer um efeito benéfico à fermentação, quando age contra a proliferação de bactérias contaminantes.

O etanol pode tornar-se tóxico para a célula de levedura, causando uma inibição do tipo não competitiva. (GHOOSE e TYAGI, 1979, LEÃO e van UDEN, 1982). Fatores como a temperatura e existência dos subprodutos acetaldeído, ácidos fórmico, acético, láctico, octanóico e decanóico contribuem para a elevação do efeito tóxico pelo etanol.

Tanto a concentração de ácido láctico, quanto a presença de sulfito durante o processo fermentativo, podem ter menor ou maior efeito tóxico, dependendo das condições em que estes se encontram, como o teor alcoólico, pH e nível de contaminação. Muito ainda tem que ser feito para a verificação dos efeitos sinérgicos de toxinas e outros fatores estressantes para as leveduras durante a produção etanólica, visando maior otimização do processo. Este trabalho teve o propósito de verificar os efeitos sinérgicos ligados à presença de ácido láctico, sulfito, etanol e pH no

metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* (linhagens Pedra-2 e M-26) durante o processo de produção etanólica, simulando em escala laboratorial, o sistema de batelada alimentada. Verificou-se também o efeito do tempo de tratamento ácido no controle da contaminação por *Lactobacillus fermentum* CCT 1396 durante o processo fermentativo de *Saccharomyces cerevisiae* Pedra-2 (PE-2). Tal trabalho visou, dessa forma, buscar condições mais adequadas para aumento da eficiência e do rendimento alcoólico após a compreensão de vários fatores que interferem no metabolismo das leveduras durante o processo fermentativo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Tecnologia da produção industrial de etanol carburante

2.1.1. Processos fermentativos

Os processos de fermentação etanólica mais utilizados no Brasil são o de batelada alimentada e o contínuo. O processo de batelada alimentada surgiu inicialmente na fabricação industrial de fermento para a panificação, no início do século XIX (BROWN, 1990, apud ABUD, 1997). Segundo ALMEIDA (1940), em tal processo há a alimentação contínua do mosto na dorna de fermentação e ao seu término, o produto fermentado é centrifugado e separado da levedura. A condução pelo processo de batelada alimentada permite evitar o efeito inibitório do açúcar, durante a fase inicial, resultando em maior concentração de etanol num mesmo período de tempo quando comparada com a batelada convencional (não alimentada). Ainda, no referido processo, a alimentação pode ser realizada mediante adições intermitentes, à velocidade constante e de forma exponencial. (WINKLER, 1991 e 1995). Segundo LALUCE *et al.* (1990), grande parte das usinas brasileiras trabalha com o processo de batelada alimentada com o reciclo do fermento, o qual é tratado com ácido sulfúrico antes de retornar para as

dornas fermentativas. O mosto é, assim, adicionado lentamente durante 4h, sendo que após 6-9h chega-se ao final do processo fermentativo.

No processo contínuo, o meio nutriente mais o inóculo são injetados de forma contínua em reatores, com a saída da mesma quantidade de meio fermentado. (WINKLER, 1995; ABUD, 1997). Tal processo pode ser mais vantajoso que o de batelada alimentada, pois inclui otimização das condições de processo para uma maior produtividade, período longo de produtividade contínua, maior produtividade volumétrica, redução dos custos laboratoriais uma vez alcançado o estado desejado e reduzido o tempo de limpeza e sanitização das dornas. (CYSEWSKI e WILKIE, 1978). A maior desvantagem é que as fermentações contínuas são mais suscetíveis à contaminação bacteriana por longos prazos de exposição, além de exigir um conhecimento apurado para otimizar as condições de processo para atingir o rendimento desejado - especialmente durante a adição de produtos químicos, alterações da taxa de fluxo e a mistura dos nutrientes, ou alterações nos parâmetros estimados (INGLEDEW, 2003 apud BAYROCK e INGLEDEW, 2005). É importante o total conhecimento desses parâmetros quando a planta do processo contínuo é desenhada ou operada (BAYROCK E INGLEDEW, 2005).

2.1.2. Efeito do tratamento com ácido sulfúrico

A lavagem do fermento com ácido sulfúrico, além de contribuir para o controle dos contaminantes da fermentação alcoólica, é o principal método de controle da floculação do fermento (OLIVA-NETO, 1995).

O tratamento com ácido sulfúrico é feito diminuindo o pH do fermento, diluído em água, a uma faixa de 2,0 a 3,0. Ao fermento mantido na cuba são adicionados ácido sulfúrico e água e mantido em constante agitação. O tempo de tratamento é variável (até 3 horas), quanto maior for este tempo menor a viabilidade celular. As células de levedura mais jovens e as mais velhas são menos resistentes ao tratamento. (BOVI e MARQUES, 1983).

Segundo RODINE (1985), o uso excessivo do ácido sulfúrico para o controle do contaminante é uma prática danosa às células de levedura num processo de fermentação alcoólica. O tratamento ácido excessivo pode ter efeito abrasivo sobre a parede da levedura que é essencial para sua viabilidade e produção de etanol, assim

segundo PATERSON *et al.*(1988) a intensidade do tratamento deve variar de acordo com o índice de contaminação do meio.

GOMES (1988) não observou nenhuma ação drástica sobre a viabilidade celular em experimentos de laboratório utilizando *S. cerevisiae* quando o leite da levedura foi tratado em três níveis de pH (2,0; 2,5 e 3,0) ajustados com ácido sulfúrico, obtendo maiores rendimentos em relação aos controles. Foi observada a redução de 44,3% da microbiota contaminante, em função do vigor e tempo de tratamento.(GALLO e CANHOS, 1991).

ALVES DA SILVA (1993) mostrou através de seus experimentos que o uso do ácido sulfúrico como agente de desinfecção do leite de leveduras constitui-se numa das práticas mais eficientes e econômicas para a fermentação alcoólica. Entretanto, seu uso não deve ser indiscriminado, mas baseado num rigoroso acompanhamento dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do processo fermentativo.

Embora muitos pesquisadores defendam o uso do ácido sulfúrico como descontaminante do processo de fermentação alcoólica, para outros sua prática não é eficiente, elevando o custo com este reagente, além do perigo do transporte, manipulação e danos ao meio ambiente quando o vinho deleiturado (com o ácido) é despejado ao solo (OTENIO, 1998). Para NUNES *et al.* (1991), o uso do ácido sulfúrico é inadequado, porque o tratamento ácido não funciona como descontaminante e também não existe a necessidade do uso de qualquer bactericida, pois o número de bactérias não chega justificá-lo. Estes pesquisadores defendem o ajuste dos processos de centrifugação, alimentação e nutrição, como a solução para um bom processo fermentativo. A adição de ácido sulfúrico e de bactericidas seja qual for à quantidade é inadequada e inoportuna passando, então, a ter a função de destruidor de leveduras e enzimas. Esta adição causa muitas reações químicas resultando no desequilíbrio do importante sistema de enzima-substrato no meio de fermentação. Ainda, o tratamento ácido da levedura quando floculada induz a dispersão do fermento e das bactérias, mas não sua total eliminação (GUERRA e ANGELIS, 1998). Apesar da eficácia do tratamento na desfloculação do fermento, esta não é duradoura, sendo revertida em função do pH quando o inóculo tratado é retornado à dorna fermentativa (BOVI e

MARQUES, 1983). Além disso, a utilização do pH baixo (2,0-2,5) pode afetar o metabolismo da levedura. (LUDWIG *et al.*, 2001).

OTÊNIO (1998) mostrou que o tratamento ácido não foi eficiente para o aumento do teor alcoólico da dorna, volume do fermento da dorna, acidez fixa, tempo de fermentação, viabilidade e brotamento da levedura na Usina de Bandeirantes/ PR.

2.1.3. Contaminação no processo da fermentação alcoólica

A decomposição da sacarose por microrganismos inicia-se quando a cana-de-açúcar está ainda no campo. Quanto mais rápido a cana for levada à usina para ser convertida em sacarose ou álcool, mais eficiente será o processo de obtenção de tais produtos. Segundo OLIVA-NETO (1995), durante a passagem da cana até a etapa de fermentação alcoólica nas dornas das destilarias, a microbiota contaminante passa por uma grande seleção em função do pH, temperatura, condições atmosféricas e produtos inibidores (presentes no substrato) a que são submetidas. Assim, durante o processo fermentativo, a microflora restringe-se a poucos gêneros, uma vez que o pH torna-se mais baixo e existe o aumento do teor alcoólico, ficando difícil a adaptação para a maior parte dos microrganismos. Entretanto, o processo de batelada alimentada ou contínuo com o reciclo de célula, utilizado nas usinas sucro-alcooleiras, favorece a proliferação de alguns gêneros contaminantes nas dornas fermentativas (OLIVA-NETO e YOKOYA, 1994).

Pesquisadores constataram a presença de fermentações paralelas à fermentação alcoólica em função da presença de contaminantes. Esses agentes diminuem o rendimento etanólico devido à produção de ácidos como o acético, láctico e butírico e de gomas dextrana e levanas. (NEVES, 1938; ALMEIDA, 1940; OLIVA-NETO e YOKOYA, 1994 e 1997).

WALKSMAN, segundo ALVES (1994), em 1945 concluiu que as relações antagônicas entre as leveduras e as bactérias lácticas são marcadas por um amplo número de substâncias tóxicas, abrangendo desde compostos simples como ácidos orgânicos, álcoois, até polipeptídeos, proteínas e derivados do metabolismo secundário.

A literatura aponta como principais contaminantes do meio fermentativo bacilos Gram-positivos compostos pelos gêneros *Lactobacillus*, *Bacillus* e

Leuconostoc, sendo este último menos comum devido a menor resistência ao teor alcoólico. (OLIVA-NETO, 1995; NOBRE, 2005).

OLIVA-NETO (1990) isolou como principal contaminante da fermentação o gênero *Lactobacillus* a partir de amostras de "leite de levedura" em usinas do estado de São Paulo. A análise taxonômica demonstrou que *L. fermentum* foi a bactéria predominante (62%), seguida por *L. murinus* (9%), *L. vaccinostercus* (9%), *L. plantarum* (2%) e *Leuconostoc* sp (2%). Do total da referida microflora 64% resistiu a 10% (v:v) de etanol em cultivo isolado.

Os *Lactobacillus* tem ampla distribuição, são espécies principalmente acidófilas e tolerantes ao etanol, vulgarmente denominadas de bactérias lácticas, são sacarolíticas (TILBURY, 1975; PRIEST, 1981; apud ALVES, 1994), sendo exigentes em termos nutricionais, principalmente quanto aos aminoácidos (OLIVA-NETO e YOKOYA, 1997). Segundo HYNES *et al.* (1997), a contaminação por bactérias lácticas é o maior problema da fermentação industrial de álcool. O crescimento das referidas bactérias reduz o rendimento alcoólico devido o consumo de glicose que seria destinada na síntese etanólica, além da competição dos nutrientes do meio, e do efeito tóxico do ácido láctico. (YOKOYA, 1991, HYNES *et al.* 1997). Além disso, segundo LUDWIG *et al.* (2001), tais bactérias podem induzir a floculação do fermento causando o assentamento de células de leveduras no fundo das dornas e perda de células nas centrífugas contribuindo ainda mais para a diminuição do rendimento produtividade etanólica e viabilidade celular (ROSE, 1980; OLIVA-NETO e YOKOYA, 1994; LUDWIG *et al.*, 2001).

De acordo com SERRA *et al.* (1979), o rendimento fermentativo diminuiu 15% devido a bactérias contaminantes. Segundo ALTERTHUM *et al.* (1984), quando as bactérias durante a fermentação atingiram níveis de 10^8 a 10^9 cel/mL, a queda no rendimento fermentativo foi na faixa de 14 a 90% do teórico. CRUZ *et al.* (1985) observaram diminuições de 10 a 40% no rendimento, quando a contaminação chegou de 10^7 a 10^8 cel/mL.

OLIVA-NETO (1990) mostrou que ao final de 18 ciclos de uma fermentação mista com *S. cerevisiae* (fermento Fleishmann) e *L. fermentum*, o fermento ficou seriamente comprometido e as bactérias tiveram um grande crescimento. Existiu uma diminuição acentuada no rendimento etanólico, o qual chegou ao valor de até

46,7% (comparado ao teórico), e a sua produtividade teve uma diminuição de até 53,5% em relação à média dos ciclos iniciais. Tal diminuição na atividade catalítica do fermento foi atribuída a acidez que atingiu níveis superiores a 6g/L, expressos em ácido láctico.

THOMAS *et al.* (2001) ao estudarem a influência da contaminação por lactobacilos durante a fermentação etanólica por *S. cerevisiae* concluíram que quando o número de células da levedura foi superior ou ao menos igual ao da bactéria, o crescimento do contaminante foi inibido. Entretanto, o rendimento etanólico e a viabilidade da levedura diminuíram em até 22% e 45%, respectivamente, quando o número de células de *Lactobacillus fermentum* ultrapassou o de *S. cerevisiae*.

2.2. Metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*

2.2.1. Consumo do substrato

A sacarose, principal substrato utilizado na produção etanólica no Brasil, é hidrolisada primeiramente em glicose e frutose pela invertase periplasmática (β -D-fructofuranoside fructohydrolase, E.C.3.2.1.26) (ZECH e GÖRISH, 1995) produzida pela própria levedura. Através do processo de difusão facilitada da membrana do microrganismo por permeases (CARTWRIGHT *et al.*, 1989), tais açúcares fosforilados podem fazer parte da via Glicolítica.

Segundo CHAPMAN e BARTLEY (1968), as enzimas respiratórias das leveduras são inibidas a partir de 2 g/L de glicose no meio, o que torna a fermentação a principal via de degradação do açúcar, mesmo em condições aeróbias. Tal inibição é denominada Efeito Crabtree (WEUSTHUIS *et al.*, 1994).

A fermentação etanólica com açúcares em concentrações excedentes a 27% (p:v) são lentas e poucos sacarídeos são convertidos em açúcares (BAFRNCOVÁ *et al.*, 1999). Altas concentrações de açúcares no mosto fermentativo são responsáveis pela parada ou diminuição da fermentação devido ao aumento da pressão osmótica e da alta toxicidade do etanol para as células de leveduras (BISSON e BUTZKE, 2000; MALACRINÒ *et al.*, 2005). Segundo OLIVA-NETO (1990), a condução pelo processo

de batelada alimentada permite evitar o efeito inibidor do açúcar na fase inicial da fermentação.

2.2.2. Trealose

A trealose é um dissacarídeo constituído por duas unidades de glicose com ligação no carbono anomérico, dessa maneira, não é redutora. (LELOIR e CABIB, 1953, apud PANEK, 1991).

Segundo a literatura, a trealose é um carboidrato de reserva e de proteção das leveduras em situação de estresse como temperatura elevada, toxicidade do etanol, desidratação celular e aumento da pressão osmótica; sendo esta acumulada em presença de oxigênio, em baixas concentrações de açúcares, como quando há exaustão da glicose no meio durante a fase de diauxia (PANEK, 1975a; CROWE *et al.*, 1984; THEVELEIN, 1984; HOTTINGER *et al.*, 1987; PANEK *et al.* 1990; ALCARDE e BASSO, 1997).

De acordo com MACKENZIE *et al.* (1988), a resistência de leveduras à pressão osmótica foi acompanhada por acúmulo de trealose. SHARMA (1997) mostrou que a exposição de *Saccharomyces cerevisiae* à concentrações estressantes de NaCl estimulou o acúmulo de trealose na levedura e aumentou sua resistência ao etanol.

Leveduras provenientes de três destilarias de produção artesanal de cachaça revelaram 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 (PATARO, 2002). A análise do teor da trealose produzida pela levedura mostra ser um eficiente parâmetro para verificação do nível de estresse em que esta é submetida.

2.2.3. Efeito antagônico do ácido láctico

Segundo OLIVA-NETO (1995), a ação inibitória de ácidos orgânicos sobre as leveduras depende da concentração do ácido e da levedura usada no processo fermentativo, do sinergismo com outros produtos e a pressão osmótica do meio.

Existe uma ampla classe de ácidos que causa danos à fermentação etanólica, como ácido acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico (SAMSOM, 1955), fórmico, láctico (MAIORELLA *et al.*, 1983), octanóico e decanóico (LAFON-

LAFOURCADE *et al.*, 1984; VIEGAS *et al.*, 1989; VIEGAS e SÁ-CORREIA, 1997). Entretanto, o ácido láctico destaca-se frente aos outros ácidos durante a contaminação pelas bactérias lácticas que são muito freqüentes nos processos fermentativos industriais (OLIVA-NETO, 1990; HALM, 1993; HYNES *et al.*, 1997; NOBRE, 2005).

Segundo MAIORELLA *et al.* (1983), os ácidos acético, fórmico e láctico têm o efeito inibitório por interferência química das funções de manutenção das células. O ácido láctico possui uma hidroxila extra, caracterizando-se assim, por uma menor solubilidade aos lipídeos em relação aos outros dois citados e sua propriedade inibitória ocorre em concentrações mais elevadas, na faixa de 10-40 g/L. DAESHEL *et al.* (1988), utilizando espécies de *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces rosei* junto a *Lactobacillus plantarum* como contaminante, durante uma fermentação com suco de repolho, estabeleceram concentrações inibitórias de ácido láctico para o crescimento celular a partir de 2g/L. OLIVA-NETO e YOKOYA (1994) constataram que após o 15º ciclo de um processo fermentativo, a eficiência alcoólica sofreu uma marcante inibição quando o ácido láctico ultrapassou 6 g/L e o número de bactérias contaminantes tornou-se maior que $1,2 \times 10^9$ /mL.

CASSIO *et al.* (1987) demonstraram o processo ativo simultâneo do próton-lactato para o acúmulo de lactato no interior da célula de *S. cerevisiae*, na proporção 1:1. Segundo os mesmos autores, a taxa de acúmulo do referido ânion no interior da célula depende da oscilação do pH fora e dentro da célula. Permeases também foram citadas como envolvidas no processo de transporte ativo do lactato. (CASSIO *et al.*, 1987; NARENDRANATH *et al.*, 2001). Contrariamente, a forma não dissociada do ácido láctico atravessa a membrana plasmática por difusão passiva. No interior da célula, a forma não dissociada do ácido láctico se ioniza, pois o pH intracelular é em torno de 6,0 a 7,0 e o pKa do ácido láctico é igual a 3,86 causando, assim, a acidificação do citosol. Com o acúmulo de H⁺ intracelular, a H⁺-ATPase intensifica sua atividade para expulsar estes prótons (HOLYOAK *et al.*, 1996). O aumento da atividade de H⁺-ATPase em função da acidificação interna resultará em uma significativa diminuição da energia necessária para o crescimento da levedura e outras funções metabólicas essenciais (BRUL e COOTE, 1999) e com o tempo não será possível a manutenção do pH intracelular levando a diminuição do crescimento e finalmente a morte celular (HALM *et al.*, 2004).

De acordo com NGANG *et al.* (1989), a pressão osmótica do meio e a quantidade do inóculo exerceram influência no grau de toxicidade do ácido láctico, durante o cultivo em melaço de beterraba para a produção de álcool. Nos testes que havia maior pressão osmótica, 2,5 g/L foram suficientes para causar uma inibição na taxa específica de produção de etanol. Entretanto, em mostos com baixa pressão osmótica, com até 10 g/L de ácido láctico, o aumentaram da taxa específica de produção do álcool. O aumento do inóculo de levedura amenizou o efeito tóxico do referido ácido.

2.2.4. Efeito tóxico do etanol

O etanol pode tornar-se tóxico para a célula de levedura. (GHOOSE e TYAGI, 1979; BEAVEN, 1982; LEÃO e van UDEN, 1982). A tolerância a altas concentrações de etanol é dependente da linhagem, sendo que para a maioria das linhagens tolerantes a concentração máxima de etanol que permite o crescimento é de 10% (p:v) e que proporciona a produção de etanol no máximo de 20% (p:v). (JONES *et al.*, 1981).

As enzimas hexoquinase e a álcool desidrogenase são mais sensíveis a grandes concentrações de etanol (CASEY e INGLEDEW, 1976; SHARMA e TAURO, 1987). MILLAR *et al.* (1982) consideraram a invertase, frutose-1,6-bifosfato aldolase e piruvato descarboxilase as mais sensíveis enzimas. Segundo ZECH e GÖRISCH (1995), a invertase de *Saccharomyces cerevisiae* sofre inativação de até 100% quando submetida a altas concentrações de álcool (acima de 8% v:v) e concentrações de NaCl ocorrida no meio industrial com o melaço, sendo esta condição reversível quando tais inibidores têm sua concentração diminuída.

O etanol não se concentra no interior da célula de *Saccharomyces cerevisiae* (GUIJARRO e LAGUNAS, 1984, apud CARTWRIGHT, 1989). Segundo a literatura, o lugar de ação do etanol é na parte fosfolipídica das membranas, onde se liga no interior hidrofóbico causando enrijecimento, e conseqüentemente, acarretando distúrbios dos sistemas de transportes (LOREIRO-DIAS e PEINADO, 1982; LEÃO e van UDEN, 1982; INGRAM, 1985). Além disso, diminui a capacidade de seletividade da membrana plasmática, permitindo a saída de constituintes celulares e a entrada passiva de prótons, reduzindo assim, o potencial de membrana e por fim interferindo em

todos os sistemas que requeiram força protomotiva. Tal descontrole celular acaba resultando em deficiências nutricionais, o que intensifica a inibição alcoólica (CASEY *et al.*, 1984; DOMBEK e INGRAM, 1986).

O etanol inibiu de forma não competitiva o transporte de maltose e glicose através da membrana plasmática (LEÃO e van UDEN, 1982; LOUREIRO-DIAS e PEINADO, 1982) de *Saccharomyces cerevisiae*.

Oxigênio molecular (ANDREASON e STIER, 1954, BUTTKE *et al.*, 1980, BUTTKE e PYLE, 1982) e lipídeos têm sido acrescentados em processos fermentativos para a manutenção da atividade de altas taxas de rendimento alcoólico, uma vez que a produção de ácidos graxos insaturados fica comprometida em anaerobiose (THOMAS *et al.*, 1978, BEAVAN *et al.*, 1982, CASEY *et al.*, 1984). Foi observada uma melhora do metabolismo da levedura durante a fermentação quando se adicionou colesterol de membranas de mamíferos (CHIN *et al.*, 1984).

2.2.5. Efeito inibitório do sulfito

Sulfito de sódio no processo industrial é incorporado no melaço-de-cana na faixa de 200 a 700 mg/L (OLIVA-NETO e YOKOYA, 2001), formando algumas vezes mostos com até 300 mg SO₂/L, especialmente quando envolve a presença de caldo sulfitado da fábrica de açúcar.

Segundo a literatura, o dióxido de enxofre é uma substância muito reativa e sua ação inibitória está diretamente relacionada com o pH, já que caracteriza-se por duas constantes de dissociação. Entre os valores de pH mais baixos coexistem as formas bissulfito (HSO₃⁻) e dióxido de enxofre (SO₂), com pK₁ = 1,77, enquanto entre valores de pH 5,0 e 9,0, há uma composição mista de bissulfito e sulfito (SO₃⁻²), sendo o pK₂ = 6,9. Uma vez que o pH da fermentação é ácido, parte do sulfito encontra-se na forma mais tóxica (SO₂) na ausência de oxigênio. O SO₂ é transportado para o interior da célula, entretanto, converte-se nas outras duas formas, devido o ambiente ser caracterizado pelo valor de pH próximo a 6. (CARR *et al.*, 1976; ANACLETO e van UDEN; 1982, CARTWRIGHT *et al.* 1989).

O bissulfito pode formar ácidos hidroxissulfônicos pela reação com grupos carbonílicos de aldeídos, ácidos orgânicos e outros (HARADA *et al.*, 1968, apud WARTH, 1985). Segundo CARR *et al.* (1976), compostos como acetaldeído-bissulfito

são bactericidas. HARADA *et al.*(1968) observaram que o bissulfito ao reagir com o acetaldeído bloqueia a regeneração do NAD requerido pela glicólise em leveduras.

Segundo ALVES (1994), BASSO (1991) constatou que na adição de 100 mgSO₂/L na forma de NaHSO₃, 40% de tal substância reage com componentes do mosto e apenas 45% do acetaldeído teórico pode ser detectado. Em tal experimento ocorreu uma diminuição da eficiência fermentativa e do crescimento celular. BRECHOT *et al.*(1969) verificaram a inibição de 30 a 40% na fermentação e de 40 a 80% na respiração por adição de sulfito no mosto. Maiores teores de metabissulfito, na produção de etanol combustível a partir da beterraba, foram responsáveis por diminuição na produtividade alcoólica e queda na viabilidade celular. (GIBBONS e WESTBY, 1987).

GUTIERREZ (1988), entretanto, verificou que na presença de 219 mg de SO₂/L de meio de melaço não alterou a produção de etanol a pH 4,0, havendo diminuição de álcoois superiores e elevação no teor de acetaldeído. ALVES (1994) chegou a conclusão que a presença de sulfito no mosto fermentativo pode ser benéfica se este atuar como bactericida, pois segundo tal autora a contaminação pelo microrganismo causa maiores danos ao rendimento alcoólico. OLIVA-NETO e YOKOYA (2001) concluíram que o CMI (Concentração Mínima Inibitória) para o sulfito de sódio, em pH 4,5, foi na faixa de 10-40 µg/mL para bactérias lácticas, já para a levedura o CMI foi de 5000 µg/mL, nas mesmas condições. Em pH 6,5 o valor do CMI para a levedura foi o mesmo, entretanto, para as bactérias lácticas este ficou na faixa de 312-625 µg/mL, mostrando ser mais eficiente para estas na faixa de pH 4,5.

ANACLETO e van UDEN (1982) estudaram a cinética de morte celular em função da elevação da concentração do sulfito e da temperatura. Tais pesquisadores propuseram através de um modelo cinético da morte celular que existe dois sítios na superfície da membrana que estão envolvidos com o grau de toxicidade do sulfito. O primeiro SDD (provavelmente uma proteína), teria alta afinidade pelo SO₂, funcionando como um catalisador e diminuindo a energia de ativação para a termodesnaturação ou ativação da ATPase. O segundo sítio de ligação seria o EM (certamente uma proteína ou até outra região da proteína de SDD), que em presença do dióxido de enxofre, aumentaria a entropia do processo, induzido pela ocupação do primeiro sítio. A morte celular ocorre quando há a saturação dos dois sítios.

Os níveis de ribonucleosídeos fosfatos de leveduras sofrem um drástico decréscimo na presença de 2mM de SO₂ a pH 3,6. A atividade de ATPase é aumentada com 1mM de SO₂. (MAIER *et al.*, 1986).

2.2.6. pH e a atividade de H⁺-ATPase

Um fator muito importante para a produção etanólica é o potencial hidrogeniônico do meio, tanto para o crescimento da levedura, taxa de fermentação e formação de produtos, quanto para o controle da contaminação bacteriana (ALVES, 1994). As bactérias são menos resistentes ao pH baixo e tem menor velocidade de crescimento que as leveduras em tal situação. Enquanto que para as bactérias lácticas o pH ideal é na faixa de 6,0, a levedura *S. cerevisiae* apresenta um bom rendimento na produção alcoólica em pH acima de 3,8 (KANDLER e WEISS, 1986).

Segundo SOUZA *et al.* (2001), a enzima H⁺-ATPase da membrana plasmática de *S. cerevisiae* controla um importante processo fisiológico. Através da Bomba de prótons, tal enzima regula o pH intracelular e promove a força motora para a elevação de nutriente. Uma marcante característica desta enzima é o fato desta ser ativada em presença de glicose que causa a acidificação interna aumentando o nível de sua atividade em células de leveduras (BECHER DOS PASSOS *et al.*, 1992; SOUZA *et al.*, 2001).

A levedura para evitar que seu pH_i se torne muito ácido, libera H⁺ para o meio externo através da ativação de H⁺-ATPase, além de absorver K⁺ e aminoácidos básicos, excretar ácidos orgânicos e liberar gás carbônico. (CONWAY e BRADY, 1950; COOTE e KIRSOP, 1976).

A H⁺-ATPase plasmática sofre alterações conformacionais em função de H⁺ (BLANPAIN *et al.*, 1992), assim em pH igual a 4,0 triplica sua atividade, dobrando a afinidade por ATP, sem porém, causar mudanças no pH ótimo (6,0) (ERASO e GANCEDO, 1987). Quando o pH diminui de 6 para 3, existe um aumento da sensibilidade da levedura ao etanol (GAO e FLET, 1988), dissipando a força protomotiva da membrana.

Quando a célula sofre um dano metabólico a H⁺-ATPase presumivelmente a ajuda ativando a força proto-motora através da membrana plasmática com o gasto de ATP. A acidificação intracelular ocorre na presença de

estressores que afetam a organização da membrana plasmática. (VIEGAS e SÁ-CORREIA, 1991; ALEXANDRE *et al.*, 1996; CARMELO *et al.*, 1997; VIEGAS *et al.*, 1998; FERNANDES *et al.*, 1998).

Etanol (ROSA E SÁ-CORREIA, 1991), ácidos octanóico, decanóico (VIEGAS e SÁ-CORREIA, 1997), succínico, acético (CARMELO *et al.*, 1997), cinâmico (CHAMBEL *et al.*, 1999), pH ácido (ERASO e GANCEDO, 1987), escassez de fonte de nitrogênio (BENITO *et al.*, 1992) e temperaturas supra-ótimas (VIEGAS *et al.*, 1995) estimulam *in vivo* a atividade de H^+ -ATPase da levedura. Segundo alguns pesquisadores, a ativação desta enzima não pode ser atribuída à sua síntese e sim a alterações pós-tradução desta proteína, uma vez que o número total de enzima diminui em condições de estresse e sua atividade é aumentada. (VIEGAS *et al.*, 1995; CARMELO *et al.*, 1997). Esta ativação de ATPase pode ser causada, ao menos em parte, pela alteração na porção lipídica da membrana plasmática que modifica a disposição de suas enzimas contribuindo para o maior contato com seu substrato (VIEGAS *et al.*, 1995; CARMELO *et al.*, 1997). CHANG e SLAMAN (1991) mostraram uma correlação entre a fosforilação da glicose e a ativação de H^+ -ATPase. Segundo estes autores, o mecanismo de ativação de H^+ -ATPase da levedura durante situações de estresse ainda não está totalmente esclarecido.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

Avaliação do estado fisiológico e metabólico da levedura *Saccharomyces cerevisiae* durante diferentes condições de estresses sinérgicos que são comuns ao processo de fermentação industrial de álcool, através de diferentes parâmetros analíticos, buscando aprimoramento em técnicas de controle do processo.

3.2. Objetivos específicos

- 1) Verificação dos efeitos sinérgicos de estresse do ácido láctico, sulfito, teor alcoólico e pH, durante o processo fermentativo das duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* - PE-2 e M-26.
- 2) Investigação dos efeitos sinérgicos de estresse causado pelo tratamento ácido na presença de ácido láctico, sulfito, etanol e pH, durante o processo fermentativo do microrganismo estudado.

- 3) Identificação o pH ótimo para o metabolismo da levedura durante fermentações com alto grau de estresse.
- 4) Verificação do efeito do pH do mosto junto ao tempo de tratamento ácido no metabolismo de *S. cerevisiae* PE-2 e rendimento etanólico, durante o processo fermentativo com contaminação de *L. fermentum* CCT 1396.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. *Microrganismos*

As fermentações foram conduzidas com duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. A linhagem Pedra-2 (PE-2) fornecida pelo Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da ESALQ- USP- Piracicaba/ SP. Esta linhagem 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 (CHERUBIN, 2003). A linhagem *S. cerevisiae* M-26, isolada por pesquisadores do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia da FCLA-UNESP- Assis/ SP da Usina Nova América, Município de Tarumã, Estado de São Paulo e usada em processos industriais além de apresentar, “in vitro”, atividade bacteriostática para o *Lactobacillus fermentum*, podendo esta estar atribuída à maior produção (do que outras leveduras) de ácidos orgânicos como o succínico e o tartárico (OLIVA-NETO *et al.*, 2004).

A linhagem *Lactobacillus fermentum* CCT 1396, isolada de uma destilaria de álcool com sérios índices de contaminação (OLIVA-NETO e YOKOYA,

1994), foi utilizada como um contaminante padrão durante a condução de alguns processos fermentativos.

Tais leveduras e bactéria encontram-se armazenadas à -75°C, respectivamente, em Ependorfes com meios YM (com 10% de glicerol - Labsynth) a pH 5,0 e MRS (MAN, RAGOSA e SHARP; com 10% de glicerol) em pH 6,0, no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia da FCLA.

4.1.2. Meios de cultivo e fermentativo

_ Meio de cultivo para as leveduras: **Meio Formulado**: sacarose 2% (Difco P.A.), extrato de levedura 1% (Difco), sulfato de amônia 0.1% (Labsynth), Fosfato bipotássico $3\text{H}_2\text{O}$ 0.1140% (Labsynth), Sulfato de magnésio $7\text{H}_2\text{O}$ 0.024% (Labsynth), Sulfato de manganês H_2O 0.00104% (Labsynth), Sulfato de zinco $7\text{H}_2\text{O}$ 0.0028% (Labsynth) (pH 5.0).

_ Meio de cultivo para as bactérias: MRS (pH 4,5 e pH 6,0).

_ Meio fermentativo: mesma composição básica do Meio Formulado, variando quanto à concentração de açúcar, ácido láctico, sulfito e pH como descrito no próximo item 4.2.

4.2. Condições de cultivo

4.2.1. Multiplicação dos microrganismos

A obtenção do inóculo para os processos fermentativos das linhagens *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e M-26 foi feita de forma asséptica através de seus sucessivos cultivos no **Meio Formulado** em tubos de cultura e posteriormente em Erlenmeyers à temperatura de 30°C, sob agitação constante de 135 rpm (Agitador orbital com refrigeração -Tecnal) por 24 h. Após atingirem a concentração celular desejada no cultivo, as leveduras foram centrifugadas (centrífuga refrigerada - Fanen) durante 25 min à 3500 x g.

Assim como a produção do inóculo das leveduras para o processo fermentativo, o de *Lactobacillus fermentum* CCT 1396 foi obtido através de seu cultivo sucessivo em meio estéril em MRS, incubado a 30°C na estufa bacteriológica (Tecnal). Após 3 sucessivas inoculações de 0,1 mL da bactéria em tubos de cultura com 6mL de

meio MRS (pH 6,0), a primeira com 72 h de crescimento e as demais com 48 h, a inoculação passou a ser feita em meio MRS com o valor de pH igual a 4,5. A bactéria só pôde ser centrifugada e utilizada no processo fermentativo quando houve maior adaptação desta com o meio ácido.

4.2.2. Processos fermentativos

4.2.2.1. Verificação dos fatores sinérgicos de estresse

Estas fermentações permitiram avaliar os efeitos sinérgicos de diferentes fatores de estresse e identificaram qual deles foi o mais relevante. Para a condução dos processos fermentativos foram pesadas 27 g de biomassa úmida das leveduras (M-26 e PE-2) e cada uma destas suspensas em 75 mL de água destilada em Erlenmeyers. Tais células foram alimentadas sob condições estressantes com mostos fermentativos semi-sintéticos, os quais simularam o mosto com o melaço. A TABELA 1 mostra como foram conduzidas as fermentações com alto grau de estresse, que tiveram seus respectivos pHs ajustados com NaOH (5M) durante todo o processo. Para tanto, junto aos componentes e condições relacionados na TABELA 1 foram adicionados aos mostos: sacarose a 16,4 ou 20,6% (w/v) (ajustada para a conversão etanólica a 7,5 ou 9,5%, respectivamente) como fonte de carboidrato, e os demais componentes do Meio Formulado (item 4.1.2.), representando "in vitro" uma fermentação no sistema de batelada alimentada. As leveduras foram alimentadas

TABELA 1: Formulação do meio fermentativo com fatores de estresse: etanol, ácido láctico, sulfito e pH a uma temperatura de 32°C.

<i>M (meio)</i>	<i>sulfito (mg/L)</i> <i>(NaHSO₃)</i>	<i>ácido láctico</i> <i>(g/L)</i>	<i>etanol</i> <i>(% p:v)</i>	<i>pH</i>	<i>toxicidade</i>
1	200	6,0	9,5	3,6	máxima
2	50	6,0	9,5	3,6	menos sulfito
3	200	2,0	9,5	3,6	menos ác. lát.
4	200	6,0	7,5	3,6	menos etanol
5	200	6,0	9,5	4,5	pH normal
6*	0	0	7,5	4,5	_____

* M6 = controle

com 15 mL de mosto nos tempos 0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8 e 9h de fermentação.

O processo foi interrompido após 12 h. As leveduras foram centrifugadas (centrífuga refrigerada – Fanen) a 4000 x *g* por 30 min e as amostras do vinho delevurado foram congeladas para análises posteriores. O mesmo procedimento de processo fermentativo foi repetido por mais 6 ciclos. Cada experimento das fermentações em meios semi-sintéticos foi conduzido em triplicata, junto ao controle onde não existiu condições estressantes.

4.2.2.2. Efeito do tratamento ácido associado a outros fatores de estresse fermentativo para a linhagem *S. cerevisiae* PE-2.

Apenas a linhagem PE-2 foi utilizada nesta segunda etapa do experimento por ser mais usada no processo industrial. Para tanto, foram pesadas 27 g de biomassa úmida de levedura e esta suspensa em um volume de 75 mL com água destilada. A alimentação desta foi feita sob condições estressantes com meios fermentativos semi-sintéticos. A TABELA 2 mostra como foram conduzidas as fermentações, junto aos componentes e condições relacionados foram adicionados aos

TABELA 2: Mostos com alto grau de estresse utilizados na fermentação a 32°C de *S. cerevisiae* PE-2, a qual foi submetida ao tratamento ácido por 45 min., pH 2,0.

<i>M</i> (Meio)	sulfito (mg/L) (NaHSO ₃)	ácido láctico (g/L)	etanol (% p:v)	pH	ácido sulfúrico (g/75mL)
1	0	0	7,5	4,5	0,158 (controle)
2	200	6,0	9,5	3,6	0,110
3	390	6,0	9,5	4,5	0,170
4	200	6,0	9,5	4,5	0,167

mostos: sacarose a 16,4 ou 20,6% (p:v) (ajustada para a conversão etanólica a 7,5 e 9,5% p:v, respectivamente) como fonte de carboidrato, e os demais componentes do **Meio Formulado**, representando "in vitro" uma fermentação no sistema de batelada alimentada. A levedura foi alimentada da mesma forma descrita no item anterior.

O processo foi cessado após 12 h. A levedura foi centrifugada (centrífuga refrigerada – Fanen) a 4000 x *g* por 30 min e as amostras obtidas de cada vinho delevurado congeladas para análises posteriores. O mesmo procedimento do processo fermentativo descrito foi repetido por mais 6 ciclos. O tratamento ácido foi feito a partir do 1º ciclo fermentativo, com ácido sulfúrico a 2N até a solução de levedura atingir pH 2,0 durante 45 min, sob agitação de 70 rpm a 30° C em um agitador orbital refrigerado. Após o tratamento ácido, a correção de pH do fermento foi feita com a adição do mosto e de NaOH 2N até o pH desejado. Cada experimento das fermentações em meios semi-sintéticos foi conduzido em triplicata, junto ao controle onde as condições estressantes se restringiram apenas ao tratamento ácido.

4.2.2.3. pH ótimo fermentativo em condições de fatores de estresse associados

O processo de fermentação e obtenção das amostras foi o mesmo utilizado nos itens 4.2.2.1. e 4.2.2.2. para a linhagem PE-2 com as devidas alterações descritas na TABELA 3, havendo a correção periódica de pH do mosto fermentativo com NaOH 2N. Nestes experimentos não se fez o tratamento ácido.

TABELA 3: Mostos com alto grau de estresse que foram utilizados na fermentação de *S. cerevisiae* PE-2, a 32° C para a verificação de pH ótimo.

<i>Meio</i>	<i>sulfito (mg/L)</i> <i>(NaHSO₃)</i>	<i>ácido láctico</i> <i>(g/L)</i>	<i>etanol</i> <i>(% p :v)</i>	<i>pH</i>
1	0	0,0	7,5	4,5 (controle)
2	200	6,0	9,5	3,5
3	200	6,0	9,5	4,0
4	200	6,0	9,5	5,0

4.2.2.4. Efeito do tratamento ácido e pH dos mostos durante a fermentação mista com *S. cerevisiae* PE-2 e *L. fermentum* CCT 1396

Foram pesados 27 g ($\sim 8 \times 10^8$ células/mL) de biomassa úmida da levedura PE-2 mais 1g ($\sim 3 \times 10^8$ células/mL) de biomassa úmida da bactéria e estas suspensas em um volume de 75 mL com água destilada. A alimentação da levedura mais a bactéria foi feita com o Meio Formulado descrito no item 4.1.2., o qual reproduziu o mosto com o melaço. Entretanto, a concentração de sacarose inicial foi de 16,4% (p:v). A TABELA 4 mostra como foi conduzido o tratamento ácido do fermento. A alimentação foi feita com 30 mL de mosto nos tempos 0; 2; 4; 6 e 8 h de fermentação. O processo, após sucessivas correções de pH do mosto com NaOH (2N), foi interrompido com 10 h de fermentação. A cultura mista foi centrifugada (centrífuga refrigerada – Fanen) a 4000 x g por 30 min, tratada com ácido sulfúrico, o vinho delevurado congelado para análises posteriores e o processo fermentativo foi repetido por mais 6 ciclos. O tratamento ácido foi feito a partir do final do 2º ciclo fermentativo, com ácido sulfúrico 2N até a solução de levedura atingir pH 2,5 durante 1 ou 2 h, sob agitação de 70 rpm, a 30 °C, em um agitador orbital refrigerado.

TABELA 4: Tempo de tratamento ácido* e o pH dos mostos durante os processos fermentativos de *S. cerevisiae* PE-2 e *L. fermentum* CCT 1396 a 32° C.

Tratamento	Tempo de tratamento ácido da levedura (h)	pH do mosto fermentativo
1	0	3,8 (controle)
2	2	4,8
3	1	4,8
4	2	3,8
5	1	3,8

* pH = 2,5. Foram usadas em média 1,5mg /mL de ácido sulfúrico durante o tratamento.

Após o tratamento ácido, a correção do pH do fermento foi feita com a adição do mosto e de NaOH 2N até o pH desejado. Cada experimento das fermentações em meios semi-sintéticos foi conduzido em triplicata, junto ao controle que não foi submetido ao tratamento ácido.

4.3. Técnicas Analíticas

4.3.1. Técnicas analíticas para a análise microbiana

4.3.1.1. Determinação da biomassa seca

Para o cálculo da biomassa seca foram feitas suspensões de células puras das linhagens estudadas, lavadas em solução EDTA (0,015M) e água destilada e, ao final, centrifugadas. O material centrifugado foi depositado em placa de Petri (previamente pesada em balança analítica Tecnal, Mod. AG 200), sendo seco em estufa (Tecnal-Mod. TE 394/1) a 105°C, até que atingisse um peso constante. (AOAC, 1975).

4.3.1.2. Viabilidade e brotamento das leveduras

A porcentagem de brotamento e de células vivas (viabilidade) em relação ao total de células foi determinada através do microscópio óptico em câmara de Neubauer. Para tanto, as células de leveduras foram coradas com solução eritrosina (diluição 5000 X), sendo tomado como parâmetro, amostras do final de cada ciclo fermentativo. Os resultados foram dados em porcentagem de células vivas (células descoradas) e porcentagem de brotos vivos (descorados) em função do número total de células contadas.

4.3.1.3. Contagem de leveduras e bactérias

A contagem de células totais foi determinada através do microscópio óptico em câmara de Neubauer, sendo tomado como parâmetro, amostras do final de cada ciclo fermentativo. A equação abaixo representa o cálculo para obtenção do número de células por mL:

$$\text{Número de células} = \text{Média de } 5 \times 25 \times 10^4 \times F,$$

onde F = fator de diluição.

4.3.1.4. Contagem de células viáveis de bactérias

O cultivo em placas para a contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL) da bactéria foi realizado através da técnica de semeadura em profundidade (SPECK, 1978), utilizando o meio MRS-ágar com 10 ppm de actidiona para inibição do crescimento da levedura. Antes do plaqueamento, 1 mL de cada amostra coletada ao final do 3º, 5º e 7º ciclos foi diluído de forma seriada decimal em tubos de cultura com 9,0 mL de água peptonada (0,1%) esterilizada. As placas foram incubadas a 32º C por 48h para o crescimento e posterior contagem das colônias de bactérias. A UFC/ mL foi determinada multiplicando-se o total de colônias contadas pelo fator de diluição.

4.3.1.5. Produção de biomassa seca

Ao final do 3º, 5º e 7º ciclos fermentativos foi feita a medida da massa úmida da cultura mista estudada, e em seguida feita a conversão para a biomassa seca.

4.3.1.6. Determinação da acidez total expressa em ácido láctico

A quantia de 5mL de uma amostra foi completada para 50 mL com água destilada e, em seguida, titulada com hidróxido de sódio a 0,1 N até a mudança para a coloração rosa (pH 8,3) (método AOAC 22038-22039, 1984). Para a padronização de NaOH foi usado o biftalato de potássio (dessecado a 120º C/ 2 horas antes de usado). O cálculo da acidez foi feito através da seguinte equação:

$$\text{Acidez total} = \frac{V \text{ NaOH } 0,1N \text{ (mL)} \times 9,008 \times \text{fator de correção NaOH}}{\text{volume da amostra (mL)}} ;$$

sendo a Acidez total expressa em g de ácido láctico/ L.

4.3.1.7. Quantificação e identificação dos ácidos orgânicos

A quantificação e identificação dos ácidos orgânicos presentes nas amostras coletadas dos processos fermentativos descritos no item 4.2.2.1 foram determinadas através da análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE- SHIMADZU), sendo esta constituída por uma Bomba (LC-10AD), forno para a coluna (CTO-10AVP), de um detector UV (SPD-10A), uma coluna (SCR 101 H), uma pré-coluna (SCR-H) e o módulo de comunicação CBM 101. Para a referida análise, um sistema composto por ácido perclórico (Merck) diluído a 10mM em água ultrapurificada (pH = 2,0) foram usados como solvente e a velocidade de fluxo em 1,2 mL/min, com temperatura a 50°C, o comprimento de onda do detector a 210 nm com atenuação de 6x. O volume da injeção foi de 20 µL e o tempo para cada análise foi de 9 min. A padronização externa foi feita através de uma curva padrão com ácidos: aconítico, cítrico, tartárico, málico, succínico, láctico e acético.

4.3.1.8. Cálculo da atividade da Bomba de prótons

Segundo SERRANO (1980), a atividade da Bomba de prótons está diretamente relacionada com a atividade de H^+ -ATPase na célula, desta maneira, neste trabalho foi usado somente o primeiro método de análise como uma forma de quantificação indireta da atividade da referida enzima. Para tanto, as células das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e *S. cerevisiae* M-26 que foram submetidas a condições estressantes durante os processos fermentativos, tiveram sua atividade da Bomba de prótons quantificada através do método utilizado por SERRANO (1980) adaptado por SOUZA *et al.* (2001) com algumas alterações. Para tal procedimento, células de levedura após a fermentação (3º, 5º e 7º ciclos) foram coletadas por centrifugação a 1000 g (centrífuga – Fanen) por 10 minutos e lavadas 2 vezes em água destilada. Foi pesada 0,4 g dessas células, coletando-as em 2 béqueres de 5 mL, contendo 4,5 mL de tampão Tris/ HCl/ KCl 100 mM pH 4,5. No primeiro béquer foi adicionado 0,5 mL de água destilada e a suspensão de células foi homogeneizada, acompanhando a estabilização do pH (pHmetro-Tec-2). Em seguida, foram adicionados 10 µL de HCl (100 mM), acompanhando-se a variação do pH por 2 minutos e meio, cujos valores foram anotados de 30 em 30 segundos (controle). No outro béquer, após

estabilização do pH, foi adicionado 0,5 mL de glicose (1 M) acompanhando-se a variação do pH por 10 minutos. Ao final de cada experimento fez-se a massa seca.

Para o cálculo da extrusão de prótons foram feitos 2 gráficos (um com os dados obtidos das células que estavam no primeiro béquer e o outro com os dados das que estavam no segundo) para cada amostra, onde se calculou a variação de pH e do tempo através da seguinte fórmula:

$$\mu\text{moles H}^+/\text{h/g} = \frac{\Delta y \text{ cm} / \Delta \text{ cm}}{\Delta x \text{ cm} \times \text{massa seca em g}} \times 60$$

sendo;

- _ $\Delta y \text{ cm}$ = variação de pH dada em cm em função da adição de glicose;
- _ $\Delta \text{ cm}$ = à variação de pH em cm após a adição de $1 \mu \text{ Mol H}^+$ (controle);
- _ $\Delta x \text{ cm}$ = tempo referente à variação do pH em cm convertido por escala em minuto;
- _ multiplicado por 60 para conversão em hora;
- _ dividido pela massa seca para obter o resultado em g.

Como os experimentos fermentativos descritos no item 4.2.2.4. foram feitos através de cultura mista, primeiramente obteve-se o gráfico de acidificação do meio através da adição de glicose para uma análise prévia do comportamento da levedura e bactéria em culturas puras frente à atividade da Bomba de prótons.

4.3.1.9. Determinação da trealose

A trealose endógena das leveduras foi quantificada através da reação com antrona (P.A. Merck) em meio com ácido sulfúrico (P.A. Merck), após a extração seletiva com ácido tricloroacético a 0°C , de acordo com o método descrito por THEVELEIN (1984), sendo dosada em mg/ 100 mg de massa seca. O cálculo da trealose foi feito na biomassa das leveduras estudadas antes da fermentação (Tempo 0) e após o 7º ciclo fermentativo.

4.3.1.10. Determinação da proteína residual

A quantificação protéica foi feita através do método adaptado de LOWRY (1951), onde 1 mL da amostra diluída foi incubado com 0,9 mL da solução A por 10min a 50° C. Acrescentou-se 0,1 mL da solução B mais 3 mL da solução de Folin (diluição 1/15), a 50° C por mais 10 min. Para o branco foi utilizado 1 mL de água destilada e feito o mesmo procedimento descrito acima. Foi feita uma curva padrão com a caseína (Merk) e assim obtida a equação da reta. Fez-se a leitura das amostras no espectrofotômetro (Amersham Pharmacia BIOTECH/ ABSE-75184) a 650 nm.

4.3.1.11. Determinação de Açúcares Redutores Residuais Totais (ARRT)

Primeiramente foi feita a hidrólise ácida da amostra (diluída 90X) misturando 1mL desta com 1mL de HCl a 2N, aquecendo-se durante 10 minutos a 100°C. Após o resfriamento foi adicionado 1mL de NaOH a 2N para a neutralização da solução. Em seguida determinado o ARRT pelo método de SOMOGYI e NELSON (1944). Simultaneamente, foi feita uma curva de calibração para dosagens conhecidas de glicose (P.A. Labsynth). A leitura em espectrofotômetro foi feita a 535nm. Os resultados foram expressos em porcentagem.

4.3.1.12. Determinação da concentração de etanol

A concentração do etanol foi calculada por meio de um cromatógrafo gasoso (Mod. CG 37- Instrumentos CG Ltda – SP), equipado e uma coluna (PAD 2499 CG- empacotada) e a leitura feita através de um integrador (Mod.CG 200) do mesmo fabricante. A amostra foi submetida a uma diluição de forma que se apresentava no integrador na faixa de 1 a 2 g de etanol /L. As seguintes condições para a análise foram fixadas: temperatura da coluna igual a 96° C , temperatura de vaporização = 150° C, temperatura de ionização de chama = 250° C, o fluxo dos gases nitrogênio e hidrogênio = 30 ml/min e o volume da injeção foi de 1 µL. A curva de calibração foi feita por padronização externa com solução de etanol 1,5 g/L.

4.4. Cálculos relacionados à produção etanólica

O rendimento do etanol foi calculado através da seguinte fórmula:

$$R_{\text{etanólico}} = \frac{(M_{12} - M_0)}{M_{\text{teórica}}} \times 100 \quad (\%)$$

onde,

$$M_{\text{teórica}} = 0,511 \times S_0$$

S_0 = concentração de ART no substrato inicial (g/L)

M_{12} = massa de etanol produzida (g) ao final de 12 h de fermentação (ou de 10h para as fermentações de cultura mista).

M_0 = massa de etanol inicial (g) (tempo 0).

0,511= coeficiente de transformação de ART em etanol.

O cálculo de produtividade etanólica é uma grandeza cinética que expressa a velocidade média de produção da referida substância, sendo calculada da seguinte forma:

$$P_e = \frac{(M_{12} - M_0)}{t \times V} \quad (\text{g/L.h}) \quad \text{onde,}$$

M_{12} = massa de etanol produzida (g) ao final de 12 h de fermentação (ou de 10 h para as fermentações de cultura mista).

M_0 = massa de etanol inicial (g) (tempo 0).

t = tempo de fermentação (h)

V = volume (L)

P_e = produtividade do etanol expressa em g/ L.h

4.5. Forma de análise dos resultados

Os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados amostrais do 3º ao 7º ciclo fermentativo foram submetidos à análise de variância (**ANOVA**) e das médias comparadas por testes de **TUKEY e KRAMER** através do programa **GRAPHPAD INSTAT** (Rutgers University). O **Teste-t** e **Teste-F** foram aplicados através do mesmo programa quando houve necessidade de comparar médias entre dois grupos amostrais.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. *Processos fermentativos com fatores sinérgicos de estresse*

Estes experimentos foram realizados através das amostras retiradas dos processos fermentativos mostrados na TABELA 1 (p. 21). Tais fermentações foram feitas com as linhagens de levedura *S. cerevisiae* PE-2 e M-26.

5.1.1. *Viabilidade e brotamento*

Após submeter os dados à análise de Variância, verificou-se que os diferentes tratamentos realizados durante a fermentação alcoólica das linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e M-26 foram significativos (ANOVA, $p < 0,001$) para a viabilidade celular e brotamento. A FIGURA 1 mostra que o pH e a concentração de etanol foram os principais fatores de estresse para a viabilidade celular dos dois microrganismos estudados. O pH 4,5 (Meio 5 ou M5) repercutiu em um aumento significativo (TUKEY, $p < 0,05$) da viabilidade de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e M-26, respectivamente, de até 43,5% e 31,3% em relação aos meios em que se utilizou o pH 3,6 e alta concentração de etanol (M1, M2 e M3). A FIGURA 2 mostra as células da linhagem PE-2 fotografadas em um microscópio ótico (aumento 400X)

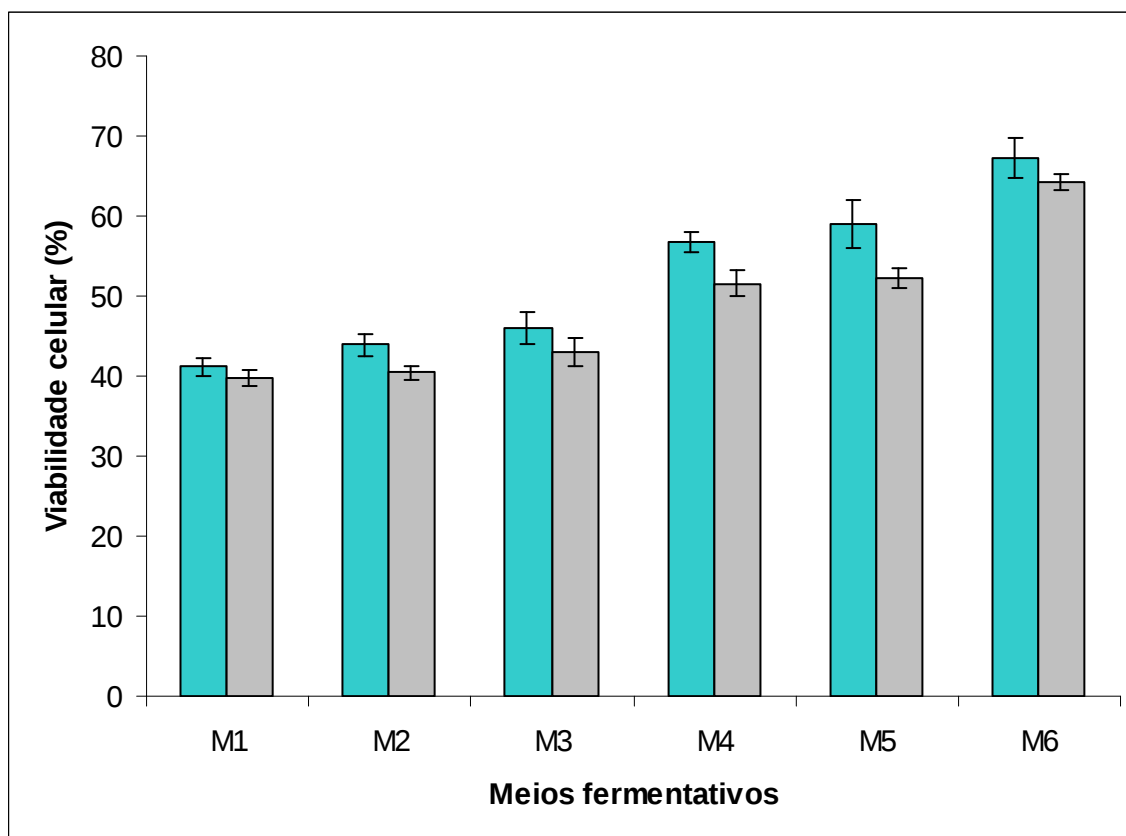


FIGURA 1: Efeito de diferentes fatores de estresse associados na viabilidade celular das linhagens de levedura ■ *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e ■ M-26 após a fermentação etanólica a 32° C.

Médias obtidas do 3° ao 7° ciclo fermentativo.

M1 = 200 mg de NaHSO₃/L, 6g de ácido láctico/L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M2 = **50 mg de NaHSO₃/L**, 6g de ácido láctico/L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M3 = 200 mg de NaHSO₃/L, **2 g de ácido láctico /L**, 9,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M4 = 200 mg de NaHSO₃/L, 2 g de ácido láctico /L, **7,5% (p:v) de etanol** e pH 3,6.

M5 = 200 mg de NaHSO₃/L, 2 g de ácido láctico /L, 9,5% (p:v) de etanol e **pH 4,5**.

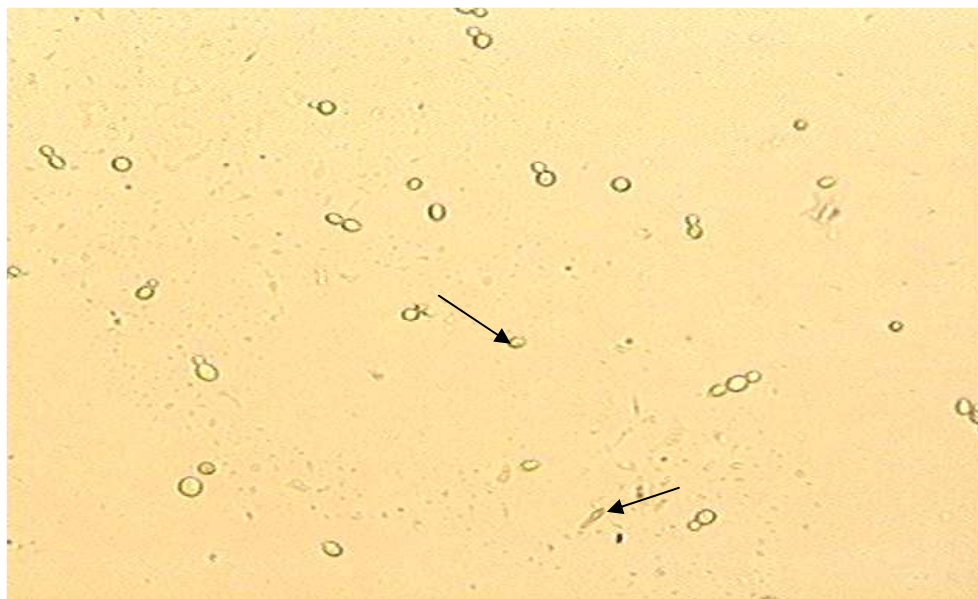
M6 (controle) = **0 mg de NaHSO₃/L, 0 g de ácido láctico /L, 7,5% (p:v) de etanol e pH4,5**.

após sua fermentação no M1 e no M5, respectivamente. As células resultantes da fermentação do M5 mostram-se visivelmente mais regulares e maiores. A concentração etanólica estimada 7,5% (p:v) utilizada no M4 refletiu em um aumento significativo da viabilidade de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e M-26 de até 38% e 29%, respectivamente, em relação ao M1, M2 e M3. Não existiu diferença significativa (TUKEY, $p > 0,05$) entre M4 e M5 para as duas linhagens estudadas, ainda que tais meios mostrem através da FIGURA 1 uma viabilidade significativamente (TUKEY, $p < 0,05$) menor que o controle M6, indicando que todos os fatores de estresse estudados atuam de forma sinérgica sobre a viabilidade, entretanto, o pH baixo e a concentração de etanol são fatores que se sobressaem. O pH muito baixo ocasiona perda de nutrientes como nitrogênio e potássio, segundo GOMES (1988), além de aumentar a sensibilidade ao etanol, aos ácidos orgânicos e ao SO₂ (CARTWRIGHT *et al.*, 1989). A toxicidade do etanol em concentração elevada (acima de 10% p:v), limita o seu rendimento durante a fermentação industrial (WALKER-CAPRIOLO *et al.*, 1985). Os efeitos tóxicos do etanol são conhecidos, e envolvem modificação na composição da camada lipídica da membrana, na síntese de proteínas de choque térmico, na modulação dos processos de troca iônica, tão bem quanto à redução de atividades metabólicas como causa da inibição do transporte de glicose, diminuindo a viabilidade, formação do produto (ALEXANDRE *et al.*, 2001, apud MARTINI *et al.*, 2004) e causando o estresse hídrico (HALLSWORTH, 1998).

O fator de maior impacto para a taxa de brotamento das duas linhagens estudadas foi o pH. A FIGURA 3 mostra que a utilização do M5 resultou em um brotamento celular próximo ao do controle, e cerca de 80% significativamente (TUKEY, $p < 0,05$) maior que o meio fermentativo de maior estresse (M1). A taxa de brotamento é importante para se avaliar a renovação celular, assim, quanto maior for este parâmetro a célula mostrará, provavelmente, melhores condições metabólicas.

Não existiram diferenças significativas entre as duas linhagens de leveduras testadas quanto à viabilidade celular e o brotamento, embora a PE-2 tenha mostrado uma tendência de maiores taxas. CHERUBIN (2003), ao estudar a fermentação das mesmas linhagens de leveduras, verificou, também, uma tendência da PE-2 mostrar maior viabilidade do que a M-26.

A)



B)

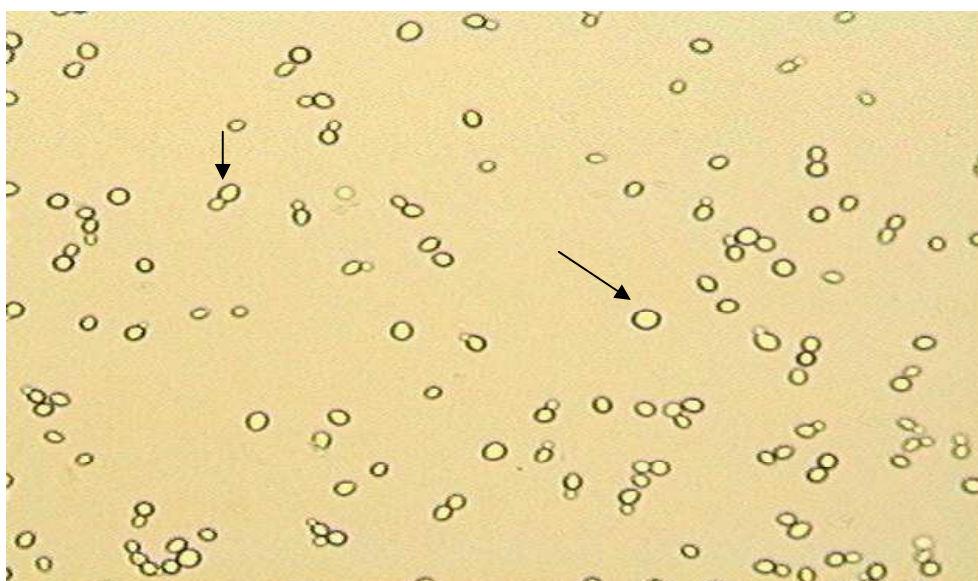


FIGURA 2: A) Células da linhagem *S. cerevisiae* PE-2 após a fermentação em M1. B) células da linhagem PE-2 após a fermentação em M5.

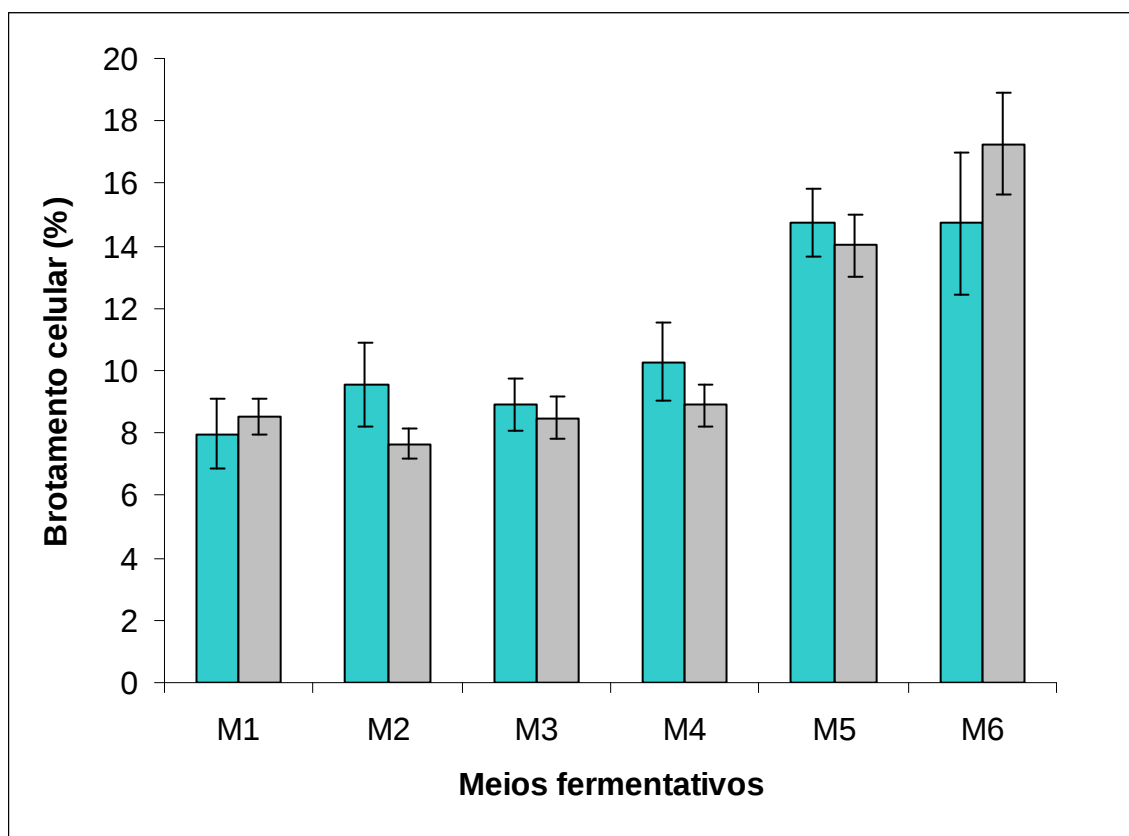


FIGURA 3: Efeito de diferentes fatores de estresse associados na taxa de brotamento das linhagens de levedura ■ *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e ■ M-26 após a fermentação etanólica a 32° C.

Médias obtidas do 3° ao 7° ciclo fermentativo.

M1 = 200 mg de NaHSO₃/L, 6g de ácido láctico/L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M2 = 50 mg de NaHSO₃/L, 6g de ácido láctico/L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M3 = 200 mg de NaHSO₃/L, 2 g de ácido láctico /L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M4 = 200 mg de NaHSO₃/L, 2 g de ácido láctico /L, 7,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M5 = 200 mg de NaHSO₃/L, 2 g de ácido láctico /L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 4,5.

M6 (controle) = 0 mg de NaHSO₃/L, 0 g de ácido láctico /L, 7,5% (p:v) de etanol e pH 4,5.

5.1.2. Produção de Biomassa

A FIGURA 4 mostra que houve tendência significativa (Anova, $p = 0,0002$) para o aumento de biomassa após o processo fermentativo das duas leveduras estudadas em relação ao primeiro inóculo. Tal resultado está de acordo com CHERUBIN (2003), que mostrou a mesma tendência de crescimento para as linhagens PE-2 e M-26. Não existiu diferença significativa (TUKEY, $p > 0,05$) quanto à produção de biomassa entre os dois microrganismos testados. O meio controle proporcionou um aumento da biomassa seca de 45% e 28%, respectivamente, para a linhagem M-26 e PE-2 em relação à biomassa seca inicial (T_0).

5.1.3. Acidez total expressa em ácido láctico e ácidos orgânicos

A TABELA 5 mostra que a maior produção de ácidos orgânicos totais ocorreu no M2, no qual a linhagem *S. cerevisiae* PE-2 e M-26 superaram em cerca de 50% o meio controle, sendo esta diferença significativa (TUKEY, $p < 0,05$; Teste-t, $p = 0,0009$). Os mostos fermentados pela linhagem M-26 apresentaram em torno de 48% a mais (Test-t, $p < 0,05$) de ácidos orgânicos totais quando comparados aos da outra levedura, exceto para o controle (M6). Este resultado está de acordo com CHERUBIN (2003), o qual mostrou que a linhagem M-26 obteve menores valores de pH no vinho deleiturado que a linhagem PE-2, sugerindo que a primeira levedura produziu mais ácidos orgânicos do que a segunda. Segundo OLIVA-NETO *et al.* (2004) o sobrenadante obtido após o cultivo de M-26 apresentou um certo poder bacteriostático sobre o *Lactobacillus fermentum*, o que poderia ser justificado por uma maior produção de ácidos orgânicos como o ácido succínico junto ao etanol (BASSO *et al.* 1997).

Através da FIGURA 5 foi possível verificar uma tendência de maior produção de ácido succínico pela linhagem M-26, embora não seja significativa (TUKEY, $p > 0,05$). Entretanto, tal FIGURA mostra não haver uma relação positiva significativa (TUKEY, $p > 0,05$) entre os diferentes meios e a produção de ácido láctico pela bactéria contaminante do processo fermentativo das duas linhagens de leveduras estudadas.

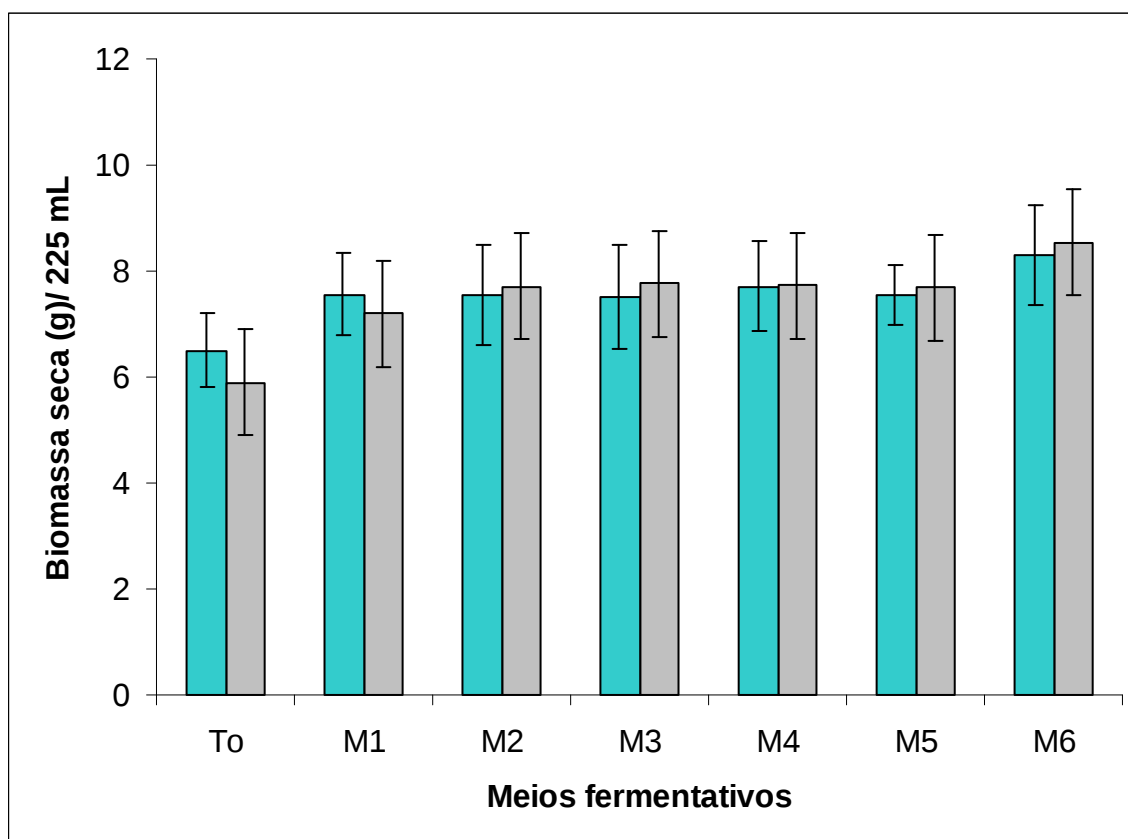


FIGURA 4: Efeito de diferentes fatores de estresse associados na formação de biomassa seca pelas linhagens de levedura ■ *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e ■ M-26 após a fermentação, a 32 °C, etanólica.

Médias obtidas do 3º, 5º e 7º ciclos fermentativos.

To = início da fermentação.

M1 = 200 mg de NaHSO_3/L , 6g de ácido láctico/L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M2 = 50 mg de NaHSO_3/L , 6g de ácido láctico/L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M3 = 200 mg de NaHSO_3/L , 2 g de ácido láctico /L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M4 = 200 mg de NaHSO_3/L , 2 g de ácido láctico /L, 7,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M5 = 200 mg de NaHSO_3/L , 2 g de ácido láctico /L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 4,5.

M6 (controle) = 0 mg de NaHSO_3/L , 0 g de ácido láctico /L, 7,5% (p:v) de etanol e pH4,5.

TABELA 5. Ácidos orgânicos* produzidos durante a fermentação alcoólica, a 32° C por *S. cerevisiae* M-26 e PE-2 em diferentes condições de estresses.

ácidos orgânicos													
(g/ L)	M1		M2		M3		M4		M5		M6		
	M**	SD***	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	
<i>Aconítico</i>													
M-26	0.81	0.19	1.00	0.20	0.80	0.29	0.73	0.20	1.50	0.70	1.30	0.08	
PE-2	0.62	0.17	0.75	0.23	0.60	0.18	0.50	0.13	1.18	0.39	0.92	0.20	
<i>Cítrico</i>													
M-26	0.19	0.02	0.26	0.23	0.10	0.11	0.19	0.23	0.00	0.00	0.08	0.05	
PE-2	0.09	0.06	0.12	0.12	0.07	0.10	0.03	0.04	0.03	0.06	0.03	0.14	
<i>Tartárico</i>													
M-26	0.67	0.05	0.72	0.12	0.42	0.50	0.42	0.05	0.44	0.05	0.31	0.03	
PE-2	0.43	0.12	0.60	0.23	0.36	0.05	0.39	0.07	0.32	0.15	0.15	0.03	
<i>Málico</i>													
M-26	5.08	0.57	4.90	0.42	3.00	0.42	0.34	0.13	5.14	0.68	2.42	0.25	
PE-2	3.70	1.00	4.25	1.26	2.63	0.60	3.07	0.98	3.85	0.91	2.21	0.39	
<i>Succínico</i>													
M-26	3.89	0.25	4.20	0.85	3.87	0.54	4.38	0.33	4.30	0.28	4.20	0.43	
PE-2	2.86	1.03	3.12	1.04	2.84	0.92	3.04	1.03	3.17	1.00	3.06	1.00	
<i>Lático</i>													
M-26	1.39	0.44	1.55	0.21	1.02	0.36	1.62	0.29	1.21	0.07	1.00	0.07	
PE-2	1.10	0.43	1.27	0.39	0.85	0.31	1.11	0.19	1.50	0.25	1.11	0.12	
<i>Acético</i>													
M-26	3.18	0.91	3.18	0.53	2.83	0.47	2.40	0.29	1.90	0.29	1.36	0.17	
PE-2	2.13	0.83	2.39	0.90	1.78	0.43	1.58	0.37	1.14	0.58	0.74	0.18	
<i>Ácidos orgânicos totais</i>													
M-26	14,80	2,57	15,80	0,25	12,10	1,00	13,30	0,44	14,65	1,37	10,60	1,0	
PE-2	10,90	3,68	12,30	2,60	8,50	2,00	8,10	2,90	11,00	2,27	8,04	2,0	

*Quantificados por CLAE. **M= Médias obtidas do 3º, 5º e 7º ciclos fermentativos. ***SD= desvio padrão.

TABELA 6: Composição média de acidez total (expressa em ácido láctico) e ácido láctico total (quantificado por CLAE) após a fermentação, a 32° C, de *S. cerevisiae* M-26 e PE-2.

Meios	<i>S. cerevisiae</i> M-26				<i>S. cerevisiae</i> PE-2			
	Acidez total (g ácido láctico /L)		ácido láctico total (g/L) (CLAE)		Acidez total (g ácido láctico /L)		ácido láctico total (g/L) (CLAE)	
	M *	DP**	M	DP	M	DP	M	DP
M1	9,0	0,85	7,4	1,0	8,7	0,80	7,1	0,90
M2	9,0	0,70	7,5	0,2	8,4	0,90	7,3	0,75
M3	6,7	0,45	3,0	0,4	6,1	0,50	2,8	0,47
M4	8,2	0,70	7,6	0,3	7,7	0,43	7,1	0,74
M5	5,8	0,60	7,2	0,5	5,6	0,50	7,5	0,96
M6	4,2	0,80	1,0	0,1	3,9	1,00	1,1	0,12

*M= Médias obtidas do 3º, 5º e 7º ciclos fermentativos. **DP=desvio padrão.

É importante observar, através da TABELA 6, que o método de quantificação do ácido láctico por CLAE não sofreu influência dos diferentes pHs dos meios, entretanto, o mesmo não ocorreu com o método de acidez total (expressa em g de ácido láctico/ L), no qual se usou a titulação com NaOH. Assim, enquanto o vinho delevurado do M1 (pH 3,6) fermentado pela linhagem M-26 mostrou em sua composição 7,4 g de ácido láctico/ L e do M5 (pH 4,5) 7,2 g/ L após a análise em CLAE, o teste de acidez apresentou os valores de 9,0 g de ácido láctico/ L para o M1 e 5,8 g/ L para o M5. Dessa forma, o método de quantificação por acidez não foi confiável para comparar a produção de ácido láctico em mostos com pHs diferentes.

5.1.4. Atividade da Bomba de próton

A ativação de H^+ -ATPase na membrana plasmática ocorre quando células de levedura são expostas à glicose (SERRANO,1983; SOUZA *et al.*, 2001), etanol, acidificação intracelular, temperaturas supra-ótimas (abaixo de 40° C), presença de ácidos orgânicos e pH baixo. (VIEGAS *et al.*, 1998). Ou seja, fatores muitas vezes estressantes são responsáveis pelo aumento da atividade da referida enzima, e

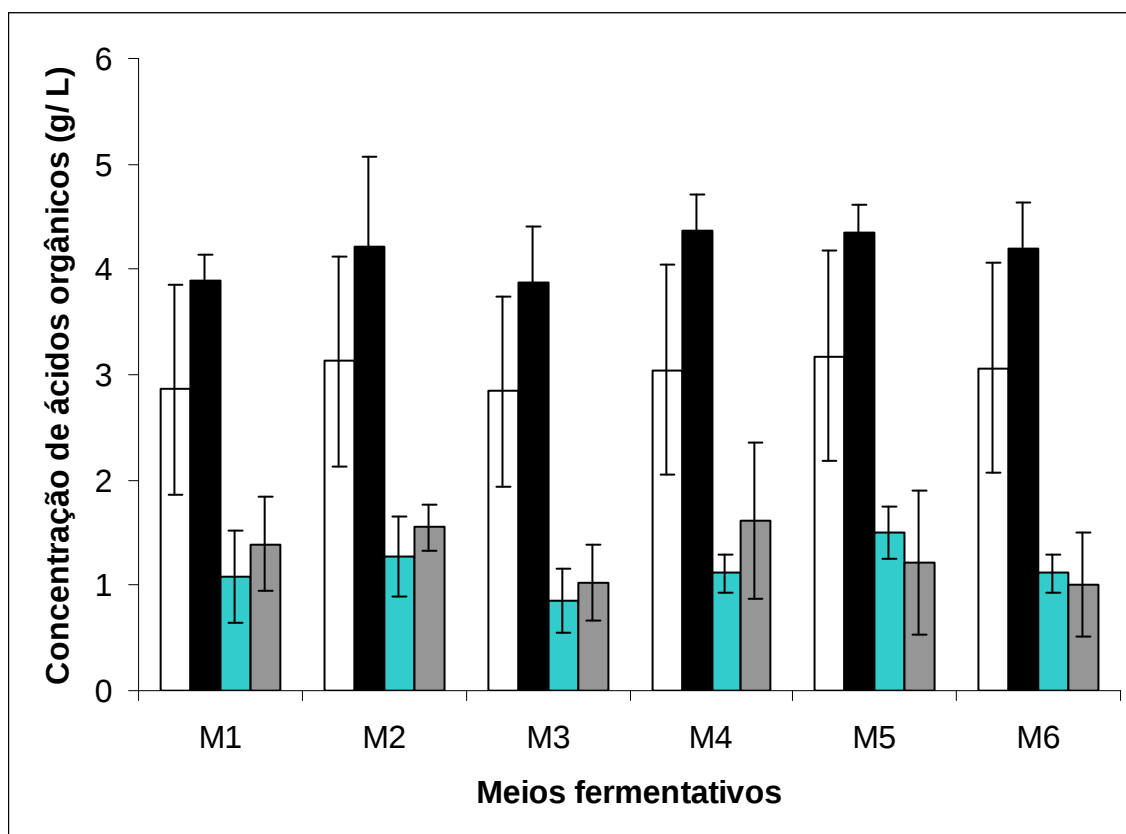


FIGURA 5: Efeito de diferentes fatores de estresse associados na produção de ácido succínico e ácido láctico durante o processo fermentativo a 32° C das linhagens *S. cerevisiae* PE-2 e M-26. PE-2: □ Ácido succínico e ■ ácido láctico ; M-26: ■ ácido succínico e ■ ácido láctico.

Médias obtidas do 3º, 5º e 7º ciclos fermentativos.

M1 = 200 mg de NaHSO_3/L , 6g de ácido láctico/L , 9,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M2 = 50 mg de NaHSO_3/L , 6g de ácido láctico/L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M3 = 200 mg de NaHSO_3/L , 2 g de ácido láctico /L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M4 = 200 mg de NaHSO_3/L , 2 g de ácido láctico /L, 7,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M5 = 200 mg de NaHSO_3/L , 2 g de ácido láctico /L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 4,5.

M6 (controle) = 0 mg de NaHSO_3/L , 0 g de ácido láctico /L, 7,5% (p:v) de etanol e pH 4,5.

conseqüentemente, da atividade da Bomba de prótons. Entretanto, segundo alguns pesquisadores, a levedura exposta a condições estressantes tem inicialmente uma redução do número total da enzima H^+ -ATPase e posteriormente ocorre sua ativação que pode ser atribuída a alterações pós-tradução desta proteína e não a sua síntese. (VIEGAS *et al.*, 1995; CARMELO *et al.*, 1997).

As FIGURAS 6 e 7 mostram que a variação das atividades da Bomba de prótons das leveduras está de acordo com as observações feitas por VIEGAS *et al.* (1995) e CARMELO *et al.* (1997). Assim, tais FIGURAS mostram, de uma forma geral, uma redução da atividade da Bomba de prótons que poderia ser atribuída à diminuição no número de H^+ -ATPase de membrana em resposta ao estresse que as leveduras foram expostas após o início da fermentação. No 7º ciclo fermentativo existiu uma tendência de aumento da atividade da Bomba de prótons para a maioria dos processos fermentativos testados, provavelmente, ocorrendo a ativação pós-tradução da enzima. Dessa forma, dentre todos os fatores sinérgicos de estresse testados, o pH mais elevado usado no meio fermentativo 5 (M5), foi responsável por uma maior manutenção do potencial de membrana da linhagem *S. cerevisiae* PE-2 (FIGURA 6), ou seja, este provavelmente proporcionou menor diminuição do número da enzima H^+ -ATPase na primeira resposta ao estresse. Entretanto, para a linhagem *S. cerevisiae* M-26, o fator de maior influência para a manutenção do potencial de membrana foi o ácido láctico a 2 g/L (M3), mostrando, provavelmente, que este ácido a 6 g/L associado a maior produção de ácidos orgânicos totais afetou mais a atividade de H^+ -ATPase de membrana do que na linhagem PE-2 (FIGURA 7).

5.1.5. Trealose

A FIGURA 8 mostra que os processos fermentativos testados estimularam a produção de trealose para as duas linhagens de levedura estudadas. O M4 e o controle, ambos com 16,4% de sacarose, foram responsáveis por uma maior produção de trealose pelos dois microrganismos. Este resultado está de acordo com a literatura, a qual mostra que menores concentrações de açúcares são responsáveis pelo maior acúmulo de trealose (PANEK, 1975 a; LILLIE e PINGLE, 1980).

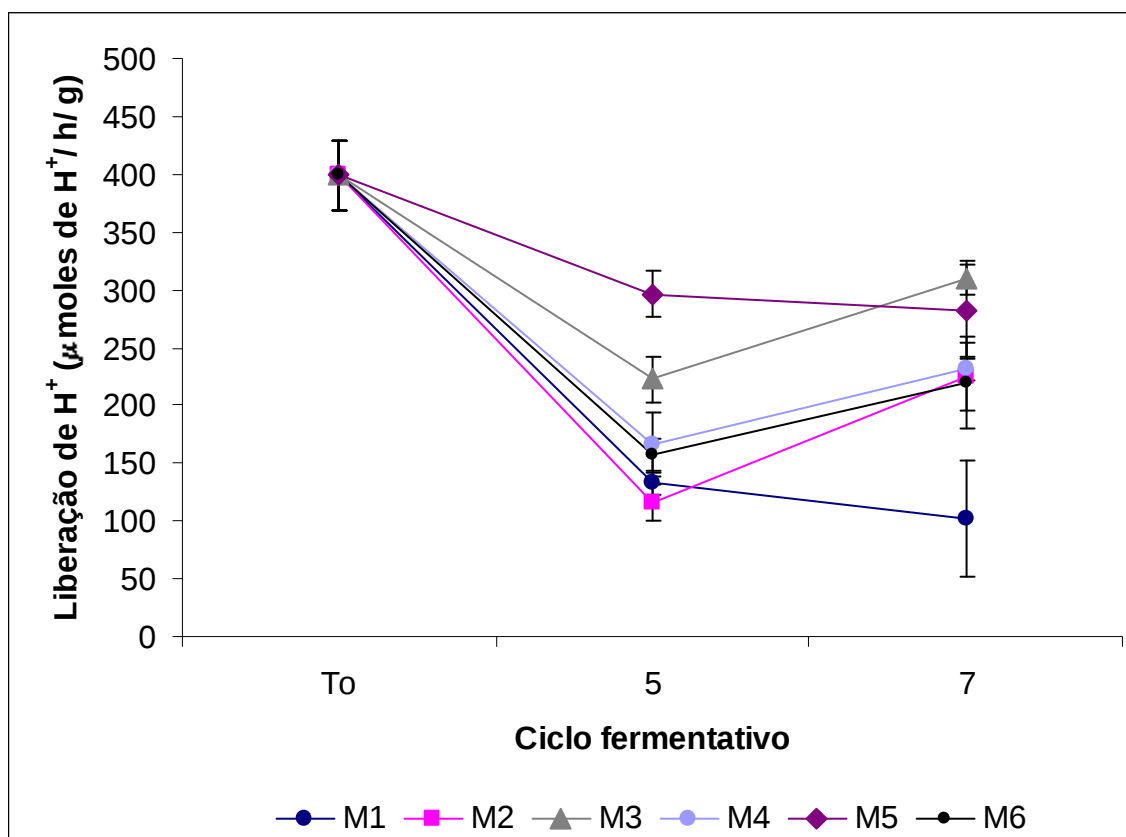


FIGURA 6: Efeito de diferentes fatores de estresse associados na atividade da Bomba de prótons, após o processo fermentativo, a 32° C, por *S. cerevisiae* PE-2. To = início da fermentação.

M1 = 200 mg de NaHSO₃/L, 6g de ácido láctico/L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M2 = 50 mg de NaHSO₃/L, 6g de ácido láctico/L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M3 = 200 mg de NaHSO₃/L, 2 g de ácido láctico /L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M4 = 200 mg de NaHSO₃/L, 2 g de ácido láctico /L, 7,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M5 = 200 mg de NaHSO₃/L, 2 g de ácido láctico /L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 4,5.

M6 (controle) = 0 mg de NaHSO₃/L, 0 g de ácido láctico /L, 7,5% (p:v) de etanol e pH 4,5.

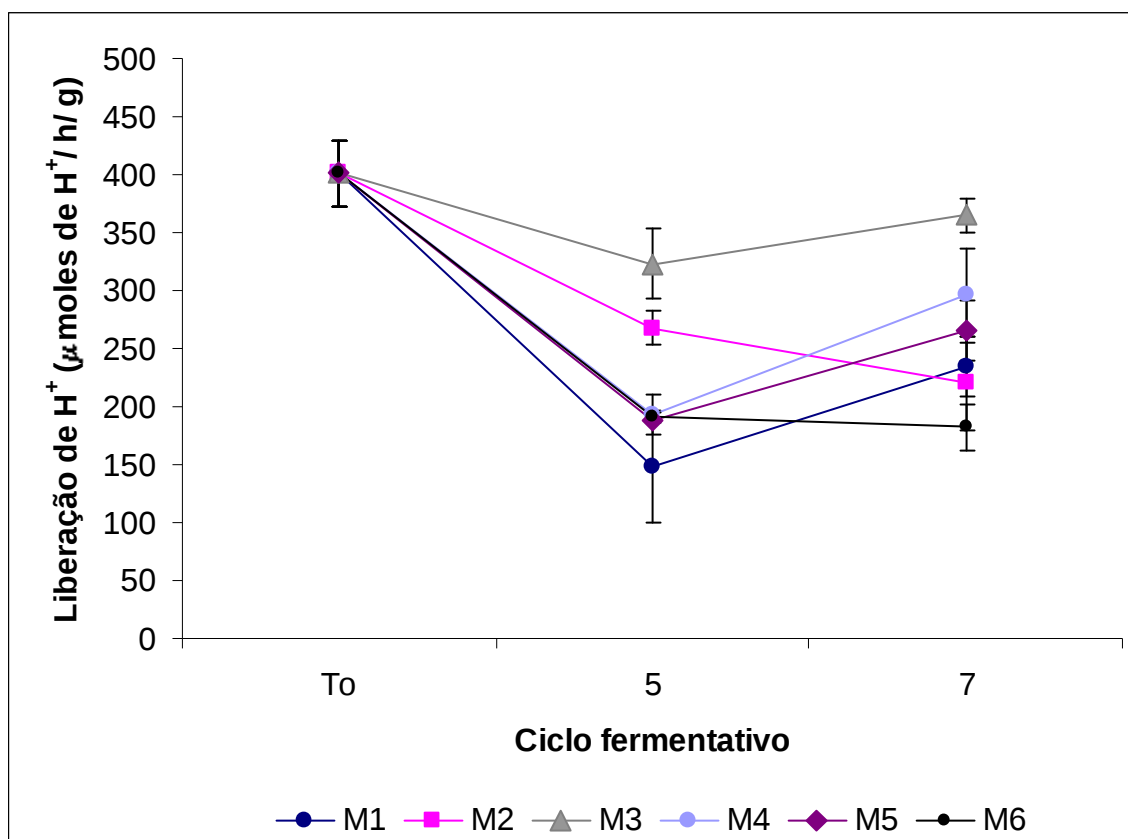


FIGURA 7: Efeito de diferentes fatores de estresse associados na atividade da Bomba de prótons, após o processo fermentativo, a 32° C, por *S. cerevisiae* M-26.

To = início da fermentação.

M1 = 200 mg de NaHSO₃/L, 6g de ácido láctico/L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M2 = 50 mg de NaHSO₃/L, 6g de ácido láctico/L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M3 = 200 mg de NaHSO₃/L, 2 g de ácido láctico /L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M4 = 200 mg de NaHSO₃/L, 2 g de ácido láctico /L, 7,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M5 = 200 mg de NaHSO₃/L, 2 g de ácido láctico /L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 4,5.

M6 (controle) = 0 mg de NaHSO₃/L, 0 g de ácido láctico /L, 7,5% (p:v) de etanol e pH 4,5.

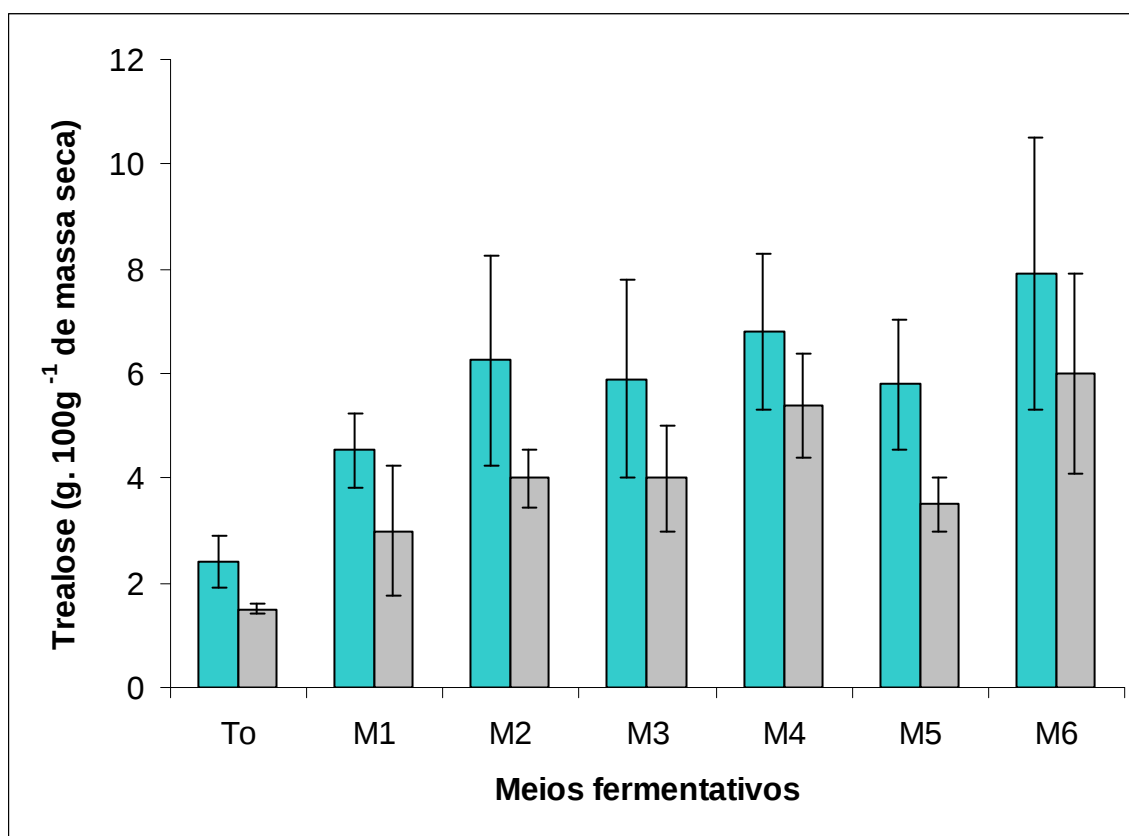


FIGURA 8: Efeito de diferentes fatores de estresse associados na formação de trealose através da fermentação, a 32°C, de ■ *S. cerevisiae* PE-2 e ■ M-26. Médias obtidas do 7º ciclo fermentativo.

To = início da fermentação.

M1 = 200 mg de NaHSO₃/L, 6g de ácido láctico/L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M2 = 50 mg de NaHSO₃/L, 6g de ácido láctico/L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M3 = 200 mg de NaHSO₃/L, 2 g de ácido láctico /L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M4 = 200 mg de NaHSO₃/L, 2 g de ácido láctico /L, 7,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M5 = 200 mg de NaHSO₃/L, 2 g de ácido láctico /L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 4,5.

M6 (controle) = 0 mg de NaHSO₃/L, 0 g de ácido láctico /L, 7,5% (p:v) de etanol e pH 4,5.

A linhagem *S. cerevisiae* PE-2, mostrou ter uma maior capacidade de estoque de trealose que a linhagem M-26, indicando que tal manutenção pode estar relacionada com a viabilidade, já que a primeira levedura apresentou uma tendência de obter o maior número de células viáveis. Segundo pesquisadores, a trealose é um carboidrato de reserva e de proteção das leveduras em situação de estresse como temperatura elevada, toxicidade do etanol, desidratação celular e aumento da pressão osmótica (THEVELEIN, 1984; HOTTINGER *et al.*, 1987; PANEK *et al.* 1990; ALCARDE e BASSO, 1997). Foi observada uma forte relação entre o acúmulo de trealose intracelular e a viabilidade celular por PATARO (2002) e CHERUBIN (2003).

5.1.6. Proteína residual

Ao submeter os valores de concentrações obtidos da proteína residual no vinho delevurado ao teste Anova, verificou-se que os diferentes tratamentos tiveram uma certa influência na obtenção de tais resultados (FIGURA 9). A linhagem de levedura PE-2 apresentou aumento significativo (TUKEY, $p < 0,05$) de proteína residual em cerca de 83% quando o meio controle (M6) foi substituído por M1 e M2. A FIGURA 9 mostra que a menor concentração de proteína residual entre os meios estressantes foi resultante da fermentação no M5, sem diferença significativa quando comparada ao controle. Este resultado indica que dentre os fatores de estresse associados, o pH 4,5 proporcionou menor lise celular, maior integridade da membrana da linhagem PE-2 e ou maior consumo de proteína no meio. Entretanto, para a linhagem M-26 os diferentes tratamentos não tiveram influência significativa (TUKEY, $p > 0,05$) na quantidade de proteína residual. Houve uma tendência de maior concentração de proteína residual nos mostos da linhagem PE-2 em relação aos do M-26 após as fermentações (FIGURA 9). A concentração de proteína residual nos tratamentos M1 e M2 da linhagem PE-2 foi em média 80% significativamente maior que nos mesmos meios para a outra linhagem, o que pode ser desvantajoso, pois o excesso de aminoácido residual no meio estimula a contaminação bacteriana. Um dos motivos para a existência de menor concentração de proteína residual no vinho delevurado da linhagem M-26 talvez possa ser atribuído à maior síntese de ácido orgânico por tal levedura, pois segundo ALVES (1994), a síntese destes está, também, relacionada com o consumo de nitrogênio.

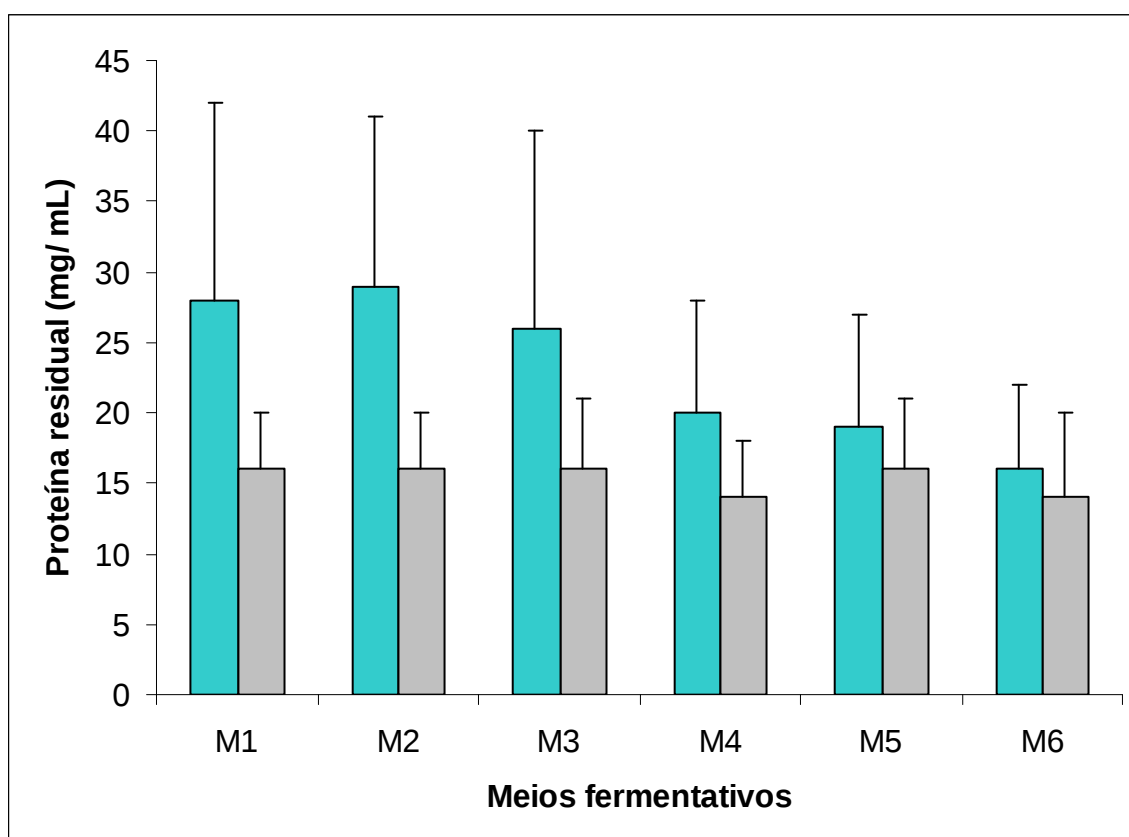


FIGURA 9: Efeito de diferentes fatores de estresse associados na formação de proteína residual no mosto fermentado, a 32° C, pelas linhagens ■ *S. cerevisiae* PE-2 e ■ M-26.

Médias obtidas do 3° ao 7° ciclo fermentativo.

M1 = 200 mg de NaHSO₃/L, 6g de ácido láctico/L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M2 = 50 mg de NaHSO₃/L, 6g de ácido láctico/L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M3 = 200 mg de NaHSO₃/L, 2 g de ácido láctico /L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M4 = 200 mg de NaHSO₃/L, 2 g de ácido láctico /L, 7,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M5 = 200 mg de NaHSO₃/L, 2 g de ácido láctico /L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 4,5.

M6 (controle) = 0 mg de NaHSO₃/L, 0 g de ácido láctico /L, 7,5% (p:v) de etanol e pH4,5.

5.1.7. Determinação do açúcar redutor residual total (ARRT), rendimento e produtividade etanólica

A FIGURA 10 mostra que existiu uma tendência significativa (Anova, $p < 0,0001$) de haver um maior consumo da sacarose no controle, M4 e M5 para as duas linhagens estudadas, ainda que no último meio tenha se acrescentado cerca de 4% (p:v) a mais do açúcar. Dentre os fatores de estresse associados, mais uma vez o pH se destacou, pois ao se utilizar o M5 (pH 4,5) houve um aumento significativo (TUKEY, $p < 0,05$; Test-t, $p < 0,018$) do consumo de açúcar em cerca de 160% e 84% em relação a utilização do M1, respectivamente, para as linhagens PE-2 e M-26. Não foi detectada diferença estatística (TUKEY, $p > 0,05$) entre o consumo de açúcar pelos dois microrganismos, embora, tenha existido uma tendência da linhagem M-26 ter consumido mais açúcar principalmente nos M1 e M2, onde coincidiu com a menor liberação de proteína. Dessa forma, verifica-se que parte da proteína residual do vinho de PE-2, em tais meios, venha do fato desta não consumir todo o nitrogênio acrescentado no meio devido ao balanço de Carbono/ Nitrogênio ocorrido em uma célula.

Existiu uma tendência da influência dos diferentes tratamentos fermentativos no rendimento etanólico (Anova, $p = 0,015$), onde os fatores de estresse que mais se sobressaíram foram o pH para a linhagem M-26; pH e sulfito para a linhagem PE-2, entretanto, essa diferença não foi confirmada quanto ao teste de TUKEY ($p > 0,05$). (FIGURA 11). É importante observar que em uma fermentação com mais ciclos, ou até a industrial, provavelmente, tal diferença se tornaria relevante, associado ao fato de que o pH 4,5 foi responsável por uma maior viabilidade, brotamento e menor ARRT para as duas linhagens estudadas. Houve também uma tendência da linhagem M-26 produzir maiores rendimentos etanólicos do que a outra em cerca de 10%, sendo esta diferença não significativa (TUKEY, $p > 0,05$).

A FIGURA 12 mostra uma tendência significativa (Anova, $p < 0,0001$) do M5 ser responsável pelos maiores valores de produtividade etanólica para os dois microrganismos estudados, além da linhagem M-26 apresentar maiores valores que a PE-2 em cerca de 13%, embora, não significativa para o teste de TUKEY.

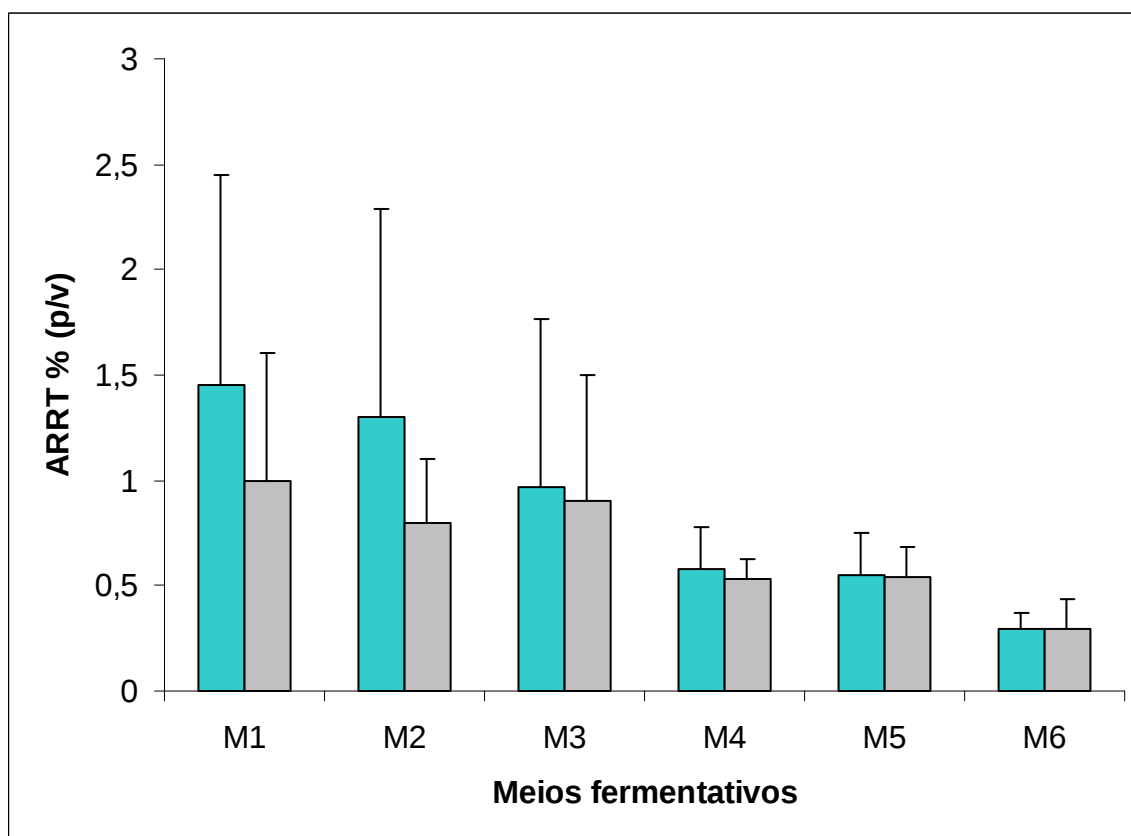


FIGURA 10: Efeito de diferentes fatores de estresse associados no ARRT após 12h de fermentação, a 32° C, de ■ *S. cerevisiae* PE-2 e ■ M-26.

Médias obtidas do 3° ao 7° ciclo fermentativo.

M1 = 200 mg de NaHSO₃/L, 6g de ácido láctico/L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M2 = 50 mg de NaHSO₃/L, 6g de ácido láctico/L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M3 = 200 mg de NaHSO₃/L, 2 g de ácido láctico /L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M4 = 200 mg de NaHSO₃/L, 2 g de ácido láctico /L, 7,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M5 = 200 mg de NaHSO₃/L, 2 g de ácido láctico /L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 4,5.

M6 (controle) = 0 mg de NaHSO₃/L, 0 g de ácido láctico /L, 7,5% (p:v) de etanol e pH4,5.

Após a análise de todos os parâmetros estressantes, o pH 3,6 foi o que mais interferiu no metabolismo das duas linhagens estudadas, entretanto, o pH 4,5 mostrou ser suficiente para minimizar os efeitos danosos de sulfito, etanol e ácido láctico sobre a célula.

Com pH nesta faixa a ação deletéria de tais substâncias foi minimizada, por se apresentarem em suas formas menos tóxicas. O metabissulfito de sódio em pH 4,5 está predominantemente na forma de bissulfito, não sendo a forma mais tóxica para a levedura quanto à de SO₂ (pK₁ = 1,77) (CARTWRIGHT *et al.* 1989). Com o pK_a = 3,86, o ácido láctico em pH 4,5 está predominantemente em sua forma dissociada e não atravessa passivamente a membrana plasmática (CASSIO *et al.*, 1987; NARENDRANATH *et al.*, 2001). Além disso, o pH muito baixo exacerba o efeito danoso do etanol ao metabolismo da levedura (CARTWRIGHT *et al.* 1989).

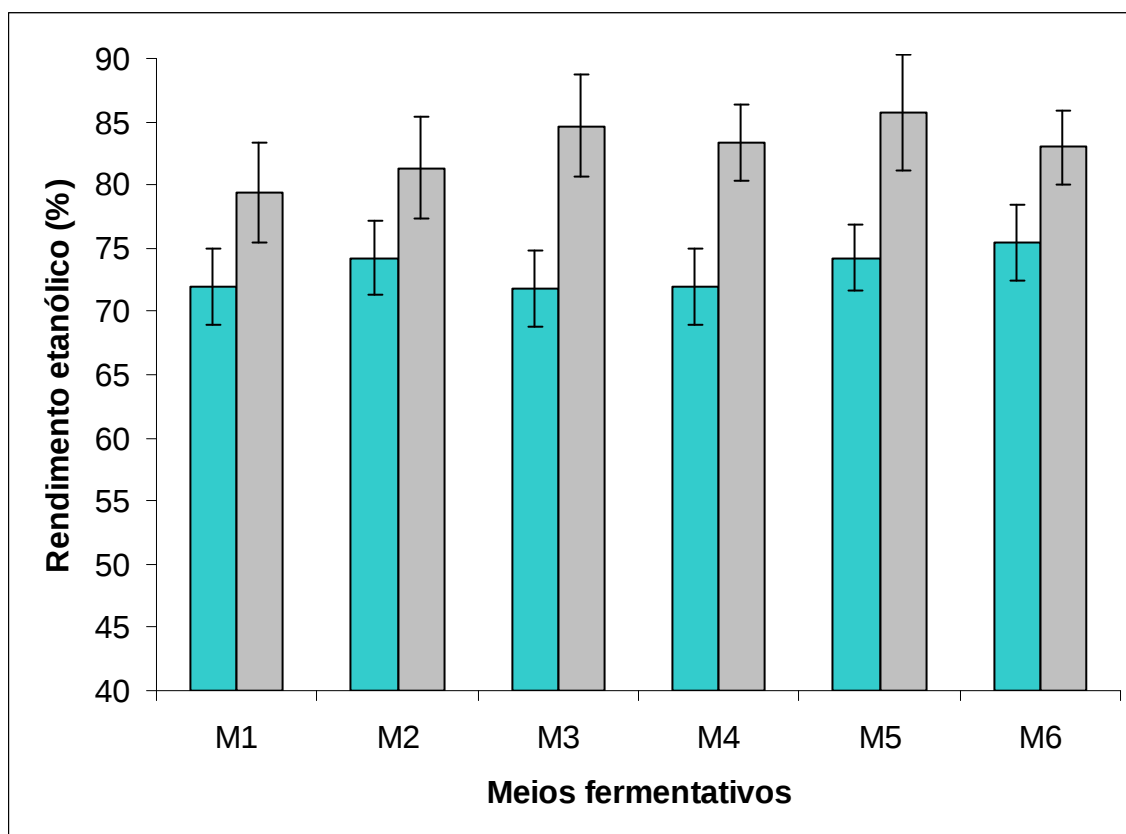


FIGURA 11: Efeito de diferentes fatores de estresse associados no rendimento etanólico obtido da fermentação, a 32° C, de ■ *S. cerevisiae* PE-2 e ■ M-26. Médias obtidas do 3° ao 7° ciclo fermentativo.

M1 = 200 mg de NaHSO₃/L, 6g de ácido láctico/L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M2 = 50 mg de NaHSO₃/L, 6g de ácido láctico/L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M3 = 200 mg de NaHSO₃/L, 2 g de ácido láctico /L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M4 = 200 mg de NaHSO₃/L, 2 g de ácido láctico /L, 7,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M5 = 200 mg de NaHSO₃/L, 2 g de ácido láctico /L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 4,5.

M6 (controle) = 0 mg de NaHSO₃/L, 0 g de ácido láctico /L, 7,5% (p:v) de etanol e pH 4,5.

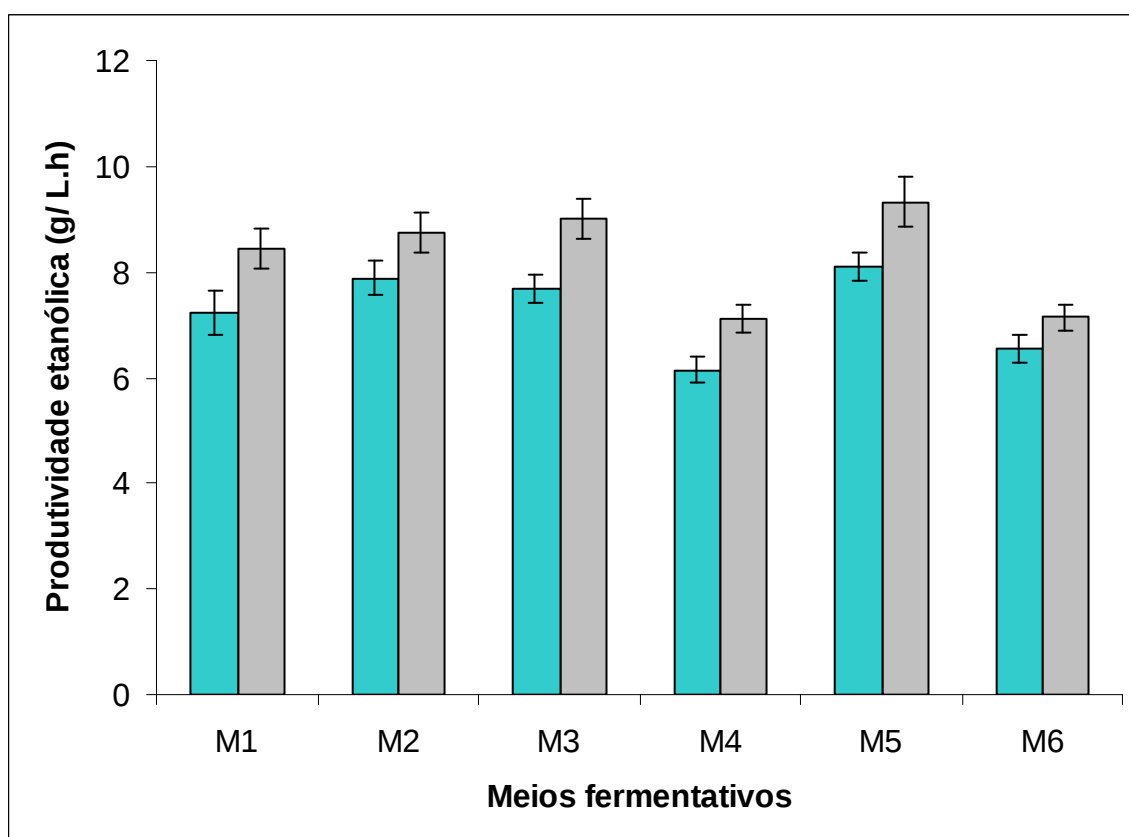


FIGURA 12: Efeito de diferentes fatores de estresse associados na produtividade etanólica obtida da fermentação, a 32° C, de ■ *S. cerevisiae* PE-2 e ■ M-26.

Médias obtidas do 3° ao 7° ciclo fermentativo.

M1 = 200 mg de NaHSO₃/L, 6g de ácido láctico/L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M2 = 50 mg de NaHSO₃/L, 6g de ácido láctico/L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M3 = 200 mg de NaHSO₃/L, 2 g de ácido láctico /L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M4 = 200 mg de NaHSO₃/L, 2 g de ácido láctico /L, 7,5% (p:v) de etanol e pH 3,6.

M5 = 200 mg de NaHSO₃/L, 2 g de ácido láctico /L, 9,5% (p:v) de etanol e pH 4,5.

M6 (controle) = 0 mg de NaHSO₃/L, 0 g de ácido láctico /L, 7,5% (p:v) de etanol e pH 4,5.

5.2. Efeito do tratamento ácido associado a outros fatores de estresse para a linhagem *S. cerevisiae* PE-2.

Como DORTA *et al.* (2006) verificaram que o pH baixo (3,6) foi o fator de maior estresse para as leveduras dentre outros testados, a segunda etapa deste trabalho foi pesquisar o efeito do tratamento ácido sobre o metabolismo da linhagem de levedura PE-2 em processos fermentativos também estressantes. Os dados analisados neste item foram obtidos das amostras retiradas dos processos fermentativos descritos na TABELA 2 (p.22).

5.2.1. Viabilidade e Brotamento

Ao submeter os dados obtidos da viabilidade e brotamento celular da linhagem PE-2 à análise de Variância verificou-se que houve diferença entre os diferentes tratamentos (Anova, $p < 0,05$). O Meio de fermentação 4 (M4) mostrou viabilidade (28%) e brotamento (103%) significativamente (TUKEY, $p < 0,05$) superiores que o M2. Não houve diferença estatística (TUKEY, $p > 0,05$) daquele meio em relação ao controle (M1). Desse modo, o pH 4,5 exerceu um efeito protetor sobre a levedura *S. cerevisiae* PE-2 contra a presença de sulfito, ácido lático, concentração alta de sacarose e etanol mesmo após o tratamento ácido (FIGURAS 13 e 14).

As FIGURAS 13 e 14 mostram ainda, que existiu uma tendência de diminuição da viabilidade e brotamento no M3 onde foi utilizada uma excessiva quantidade de NaHSO_3 (390mg/L) em relação ao M4. Entretanto, tal diferença não foi considerada significativa, mostrando que o pH 4,5 (utilizado no M3 e M4), mesmo nesta condição extrema, ainda exerceu um efeito protetor. Tais resultados confirmam os mostrados no item 5.1 e por DORTA *et al.* (2006), nos quais o pH mais elevado ocasionou menor entrada de ácidos orgânicos, SO_2 e um menor efeito tóxico associado à presença do etanol (CARTWRIGHT *et al.*, 1989).

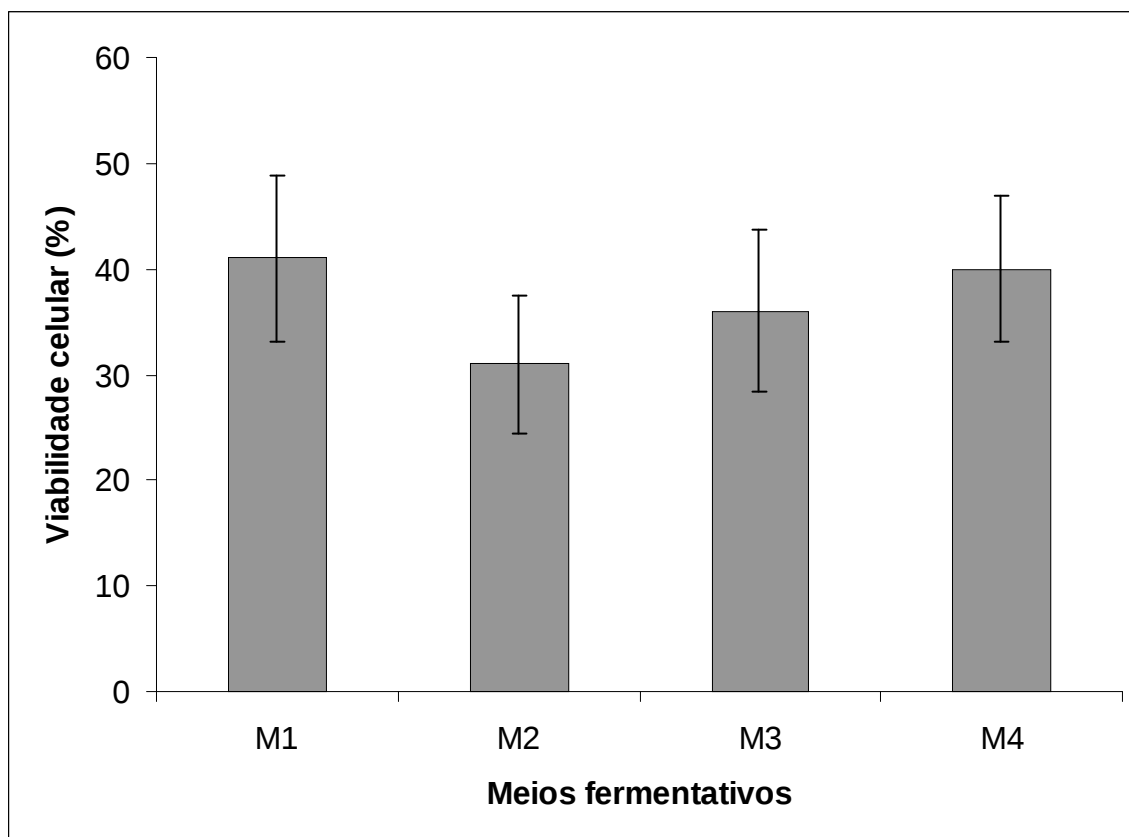


FIGURA 13: Efeito do tratamento ácido sobre a viabilidade da linhagem *S. cerevisiae* PE-2 durante a fermentação desta, a 32° C, em meios com alto grau de estresse.

Médias obtidas do 3° ao 7° ciclo fermentativo.

M1 (controle) = 0 mg de NaHSO₃/ L, 0 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 7,5% (p:v) de etanol, pH do mosto 4,5 e tratamento ácido sob pH 2,0 por 45 min.

M2 = 200 mg de NaHSO₃/ L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol, pH do mosto 3,6 e tratamento ácido sob pH 2,0 por 45 min.

M3 = 390 mg de NaHSO₃/ L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol, pH do mosto 4,5 e tratamento ácido sob pH 2,0 por 45 min.

M4 = 200 mg de NaHSO₃/ L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol, pH do mosto 4,5 e tratamento ácido sob pH 2,0 por 45 min.

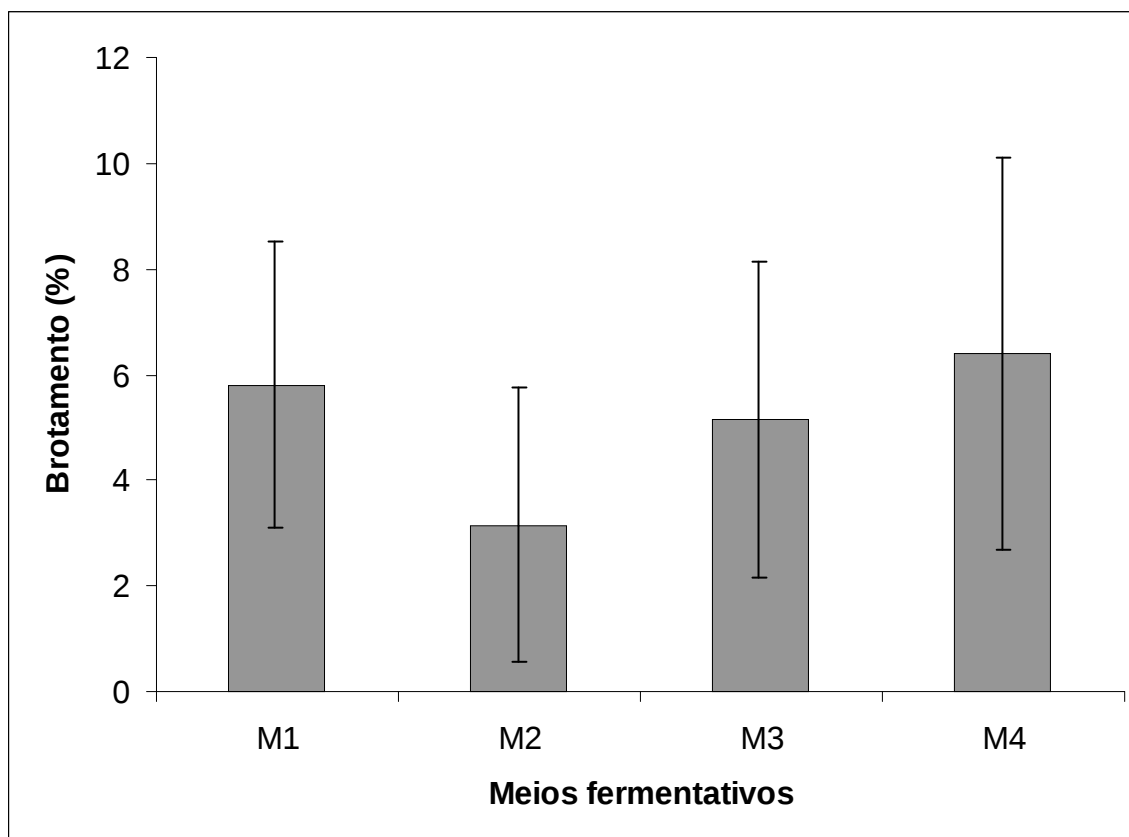


FIGURA 14: Efeito do tratamento ácido sobre o brotamento da linhagem *S. cerevisiae* PE-2 durante a fermentação desta, a 32° C, em meios com alto grau de estresse.

Médias obtidas do 3º ao 7º ciclo fermentativo.

M1 (controle) = 0 mg de NaHSO₃/ L, 0 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 7,5% (p:v) de etanol, pH do mosto 4,5 e tratamento ácido sob pH 2,0 por 45 min.

M2 = 200 mg de NaHSO₃/ L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol, pH do mosto 3,6 e tratamento ácido sob pH 2,0 por 45 min.

M3 = 390 mg de NaHSO₃/ L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol, pH do mosto 4,5 e tratamento ácido sob pH 2,0 por 45 min.

M4 = 200 mg de NaHSO₃/ L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol, pH do mosto 4,5 e tratamento ácido sob pH 2,0 por 45 min.

TABELA 7: Viabilidade e brotamento da linhagem *S. cerevisiae* PE-2 obtidos pelo processo fermentativo, a 32° C, em mostos com fatores de estresse associados* com ausência ou presença de tratamento ácido por 45 min, pH 2,0.

Tratamento Ácido	Viabilidade (%)		Brotamento (%)	
	M **	DP ***	M	DP
controle****				
ausente	67	8,7	14,5	7,8
presente	41	8,0	5,8	2,8
mosto com pH 3,6 mais fatores de estresse				
ausente	41	4,2	8,0	3,9
presente	31	6,5	3,0	2,7
mosto com pH4,5 mais fatores de estresse				
ausente	59	10,0	14,7	3,8
presente	40	7,0	6,4	3,7

* fatores de estresse associados : 200 mg NaHSO₃ / L, 6 g/L de ácido lático, 20,65% de sacarose (ajustada para 9,5% p:v de etanol) e pH = 3,6 ; **M= Médias obtidas do 3° ao 7° ciclo fermentativo; ***DP= Desvio Padrão. ****Controle: 7,5% (p:v) de etanol, ausência de sulfito e ácido lático, e mosto com pH 4,5.

A TABELA 7 mostra o efeito negativo do tratamento ácido sobre a viabilidade e brotamento da linhagem *S. cerevisiae* PE-2 quando comparado aos meios correspondentes sem tratamento apresentados no item 5.1.1. Este repercutiu em uma diminuição significativa (Teste-t, $p < 0,0001$) em torno de 32% e 59% das médias de viabilidade celular e brotamento, respectivamente.

5.2.2. Produção de Biomassa

A FIGURA 15 mostra que houve uma tendência significativa (Anova, $p = 0,0014$) de crescimento celular da linhagem de levedura PE-2, para cada meio testado, quando comparado ao primeiro inóculo. Tal resultado foi observado por CHERUBIN (2003) para a mesma linhagem em diferentes condições fermentativas. O maior crescimento obtido foi no meio controle o qual não ultrapassou 15%, sendo essa diferença considerada significativa (TUKEY, $p < 0,05$). O referido meio proporcionou,

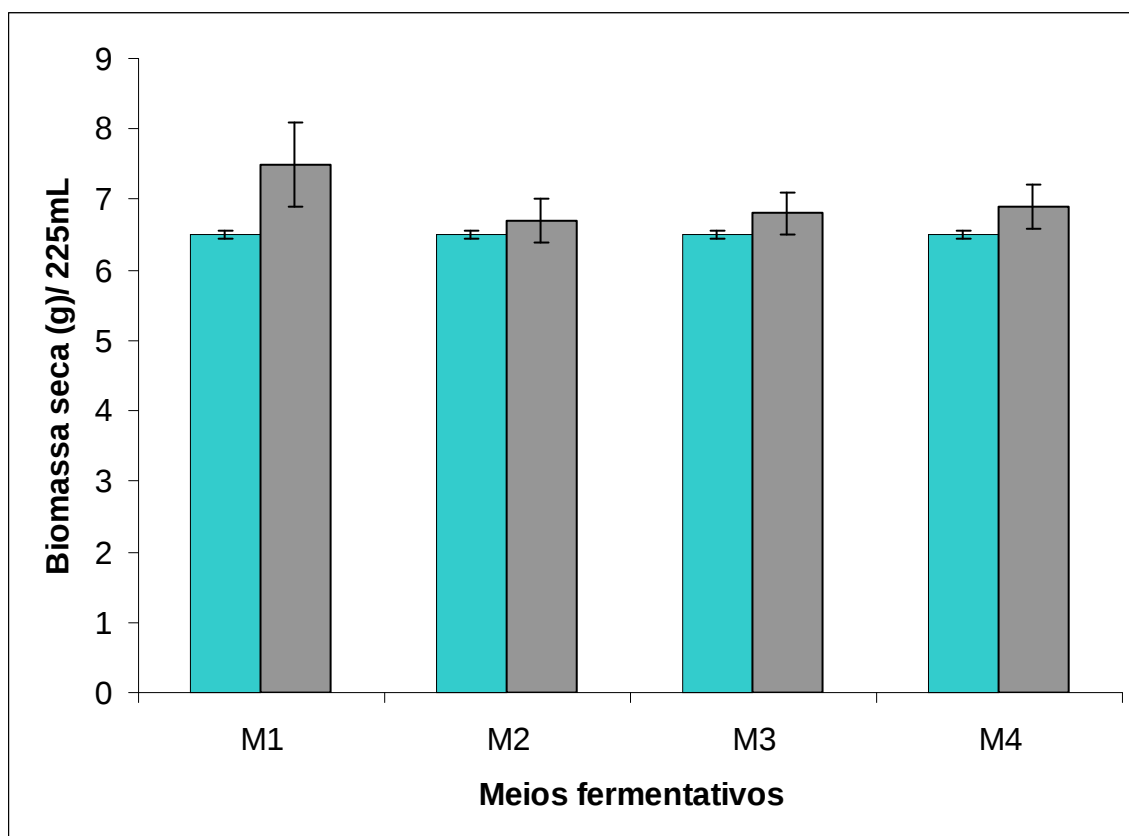


FIGURA 15: Efeito do tratamento ácido na formação de biomassa seca pela linhagem *S. cerevisiae* PE-2 durante a fermentação desta, a 32°C, em meios com alto grau de estresse. ■ Biomassa seca inicial, ■ biomassa seca média após a fermentação.

Médias obtidas do 3º, 5º e 7º ciclos fermentativos.

M1 (controle) = 0 mg de NaHSO₃/ L, 0 g de ácido láctico/ L, conversão teórica de sacarose para 7,5% (p:v) de etanol, pH do mosto 4,5 e tratamento ácido sob pH 2,0 por 45 min.

M2 = 200 mg de NaHSO₃/L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol, pH do mosto 3,6 e tratamento ácido sob pH 2,0 por 45 min.

M3 = 390 mg de NaHSO₃/ L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol, pH do mosto 4,5 e tratamento ácido sob pH 2,0 por 45 min.

M4 = 200 mg de NaHSO₃/ L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol, pH do mosto 4,5 e tratamento ácido sob pH 2,0 por 45 min.

ainda, o aumento da biomassa em cerca de 10 % perante aos demais meios.

A TABELA 8 mostra que o tratamento ácido causou diminuição significativa (Teste-t, $p < 0,03$) em torno de 10% no crescimento celular do

TABELA 8: Formação de biomassa seca pela linhagem *S. cerevisiae* PE-2 durante o processo fermentativo, a 32° C, em mostos com fatores de estresse associados* com ausência ou presença de tratamento ácido por 45 min, pH 2,0.

Tratamento ácido	Biomassa seca (g)	
	M **	DP ***
controle****		
ausente	8,30	0,95
presente	7,50	0,60
mosto com pH 3,6 mais fatores de estresse		
ausente	7,55	0,80
presente	6,70	0,30
mosto com pH 4,6 mais fatores de estresse		
ausente	7,55	0,60
presente	6,90	0,30

*fatores de estresse associados : 200 mg NaHSO₃/L, 6 g/L de ácido láctico, 20,65% de sacarose (ajustada para 9,5% p:v de etanol) e pH = 3,6 ; ** M = Médias obtidas do 3º, 5º e 7º ciclos fermentativos. *** DP = Desvio Padrão. **** Controle: 7,5% (p:v) de etanol, ausência de sulfito e ácido láctico e mosto com pH 4,5.

microrganismo cultivado nos meios com pH 3,6 e 4,5. Entretanto, no meio controle, tal influência não foi observada. Dessa forma, o tratamento ácido junto aos outros fatores estressantes dos meios induziu uma diminuição significativa no crescimento celular da linhagem PE-2.

5.2.3. Acidez total expressa em ácido láctico

Como anteriormente discutido no item 5.1.3, a comparação da acidez total (expressa em g de ácido láctico/ L) produzida durante a fermentação ficou comprometida quando feita em vinhos com diferentes pHs e substâncias tamponantes, uma vez que este método de análise é feito por titulação com NaOH (0,1N). Entretanto, esse método foi eficiente para verificar, de uma forma aproximada, o efeito do tratamento ácido na produção de ácido láctico por bactérias contaminantes em vinhos delevurados que tiveram as mesmas condições de pH e substâncias tamponantes (TABELA 9).

A TABELA 9 mostra que o tratamento ácido do fermento alimentado

TABELA 9: Acidez total (expressa em ácido láctico) produzido durante o processo fermentativo de *S. cerevisiae* PE-2, a 32° C, nos mostos com fatores de estresse associados* com ausência ou presença de tratamento ácido por 45 min, pH 2,0.

Tratamento ácido	Acidez (g de ácido láctico/L)	
	M **	DP ***
controle****		
ausente	4,0	1,00
presente	3,0	0,25
mosto com pH 3,6 mais fatores de estresse		
ausente	8,7	0,80
presente	8,4	0,40
mosto com pH4,5 mais fatores de estresse		
presente	5,6	0,50
ausente	6,0	0,60

*fatores de estresse associados : 200 mg NaHSO₃/ L, 6g/L de ácido láctico, 20,6% de sacarose (ajustada para 9,5% p:v de etanol) e pH = 3,6 ; ** M= Médias obtidas do 3°, 5° e 7° ciclos fermentativos. *** DP= Desvio Padrão. ****Con trole : 7,5% (p:v) de etanol, ausência de sulfito e ácido láctico, e mosto com pH 4,5.

com M1 (controle) resultou em menor produção significativa (Teste-t, $p < 0,0008$) de ácido láctico, cerca de 26%, exercendo um certo poder antibacteriano. Entretanto, nos demais meios o referido tratamento não resultou em menor produção (Teste-t, $p > 0,05$) do ácido. Este resultado pôde ter ocorrido, pois, nesta fermentação com alto grau de estresse, tal recurso pôde perder sua eficiência, pelo fato de elevar também o estresse da levedura, afetando seu metabolismo, causando a lise celular e favorecendo de certa forma o desenvolvimento de bactéria contaminante pela liberação de vitaminas e aminoácidos durante o processo fermentativo. A autólise da célula de *S. cerevisiae* pode liberar até 30% do nitrogênio total, sendo que os aminoácidos podem corresponder a 25% desse nutriente (LURTON *et al.*, 1989, Apud CHERUBIN, 2003). CHERUBIN (2003), também sugeriu a possibilidade da lise celular da levedura suprir alguma deficiência do mosto e então estimular o desenvolvimento bacteriano.

5.2.4. Atividade da Bomba de prótons

Os diferentes tratamentos tiveram uma tendência de influência significativa (Anova, $p = 0,0190$) na atividade da Bomba de prótons da linhagem *S. cerevisiae* PE-2. A FIGURA 16 mostra que o M2 apresentou, em média, o maior valor absoluto da atividade de Bomba de prótons no decorrer dos ciclos. Isto indica que o tratamento ácido associado ao baixo pH 3,6, em presença de ácidos orgânicos, sulfito, etanol e alta concentração de glicose promoveram um aumento gradativo de até 69% da atividade da Bomba de prótons em relação ao tempo zero. Este resultado está de acordo com os pesquisadores que mostraram os fatores pH baixo associado à presença de ácidos orgânicos, glicose e etanol (VIEGAS e SÁ-CORREIA, 1991; CARMELO *et al.*, 1997; VIEGAS *et al.*, 1998; SOUZA *et al.*, 2001) como sendo responsáveis pelo aumento da atividade de H^+ -ATPase; a qual está diretamente relacionada com a atividade da Bomba de prótons (SERRANO, 1980).

A TABELA 10 mostra que o tratamento ácido repercutiu no aumento significativo (Teste t, $p < 0,003$) de 204, 344 e 77% da atividade da Bomba de prótons nas células de levedura para os meios controle, o de pH 3,6 e 4,5,

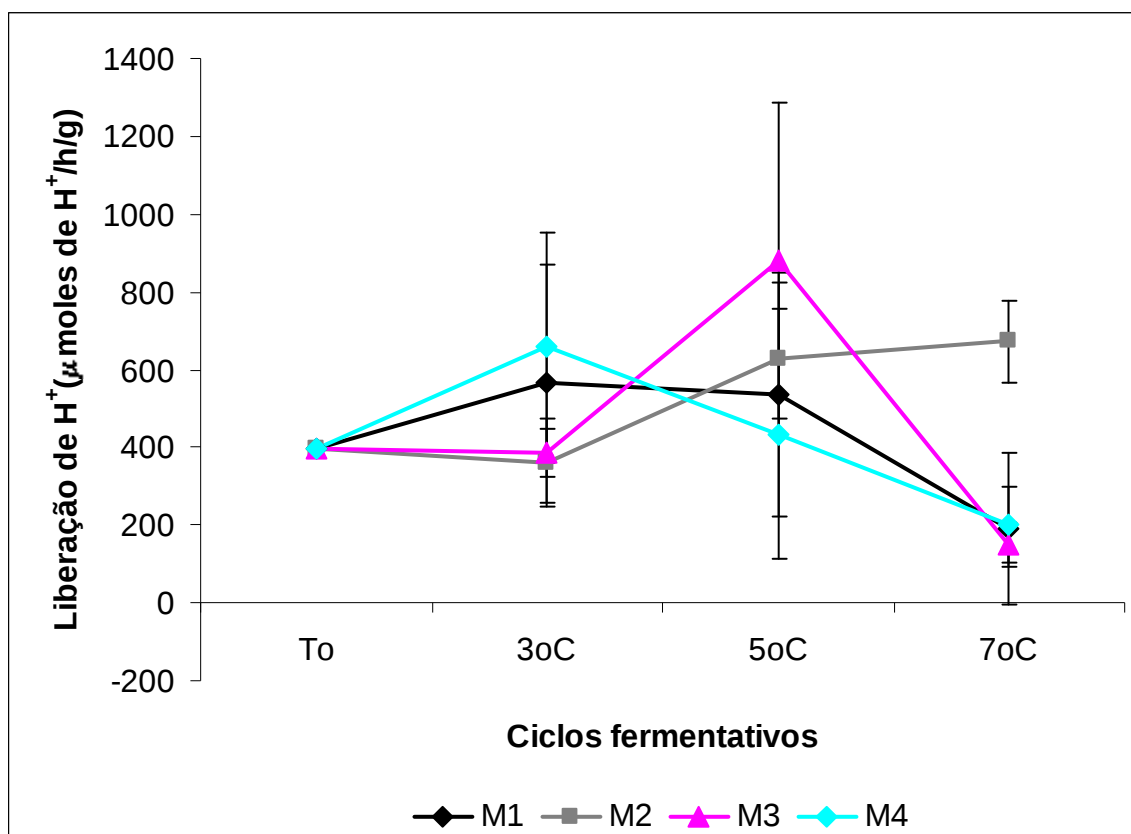


FIGURA 16: Efeito do tratamento ácido na atividade da Bomba de prótons da linhagem *S. cerevisiae* PE-2 durante a fermentação desta, a 32° C, em meios com alto grau de estresse.

T_0 = início da fermentação.

M1 (controle) = 0 mg de NaHSO_3/L , 0 g de ácido láctico/ L, conversão teórica de sacarose para 7,5% (p:v) de etanol, pH do mosto 4,5 e tratamento ácido sob pH 2,0 por 45 min.

M2 = 200 mg de NaHSO_3/L , 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol, pH do mosto 3,6 e tratamento ácido sob pH 2,0 por 45 min.

M3 = 390 mg de NaHSO_3/L , 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol, pH do mosto 4,5 e tratamento ácido sob pH 2,0 por 45 min.

M4 = 200 mg de NaHSO_3/L , 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol, pH do mosto 4,5 e tratamento ácido sob pH 2,0 por 45 min.

TABELA 10: Atividade da Bomba de prótons da linhagem *S. cerevisiae* PE-2 obtida pelo processo fermentativo, a 32° C, em mostos com fatores de estresse associados* com ausência ou presença de tratamento ácido por 45 min, pH 2,0.

Tratamento ácido	Atividade da Bomba de prótons ($\mu\text{moles de H}^+/\text{h/g}$)	
	M **	DP ***
controle****		
ausente	176,0	38,5
presente	535,9	255,0
mosto com pH 3,6 mais fatores de estresse		
ausente	124,8	20,5
presente	554,0	191,0
mosto com pH4,5 mais fatores de estresse		
ausente	296	14,0
presente	523	273,0

*fatores de estresse associados : 200 mg NaHSO_3/L , 6g/L de ácido lático, 20,6% de sacarose (ajustada para 9,5% p:v de etanol) e pH = 3,6 ; ** M= Médias obtidas do 3º, 5º e 7º ciclos fermentativos; *** DP= Desvio Padrão. **** Controle : 7,5% (p:v) de etanol, ausência de sulfito e ácido lático, e mosto com pH 4,5).

respectivamente, quando comparados com os mesmos meios sem tratamento. Esta elevação da atividade da Bomba de prótons se deu para evitar a acidificação intracelular que foi intensificada pelo tratamento ácido, entretanto, resultou em um aumento do gasto energético da célula. Segundo pesquisadores, o pH_i das leveduras é mantido constante pela ação conjunta das H^+ -ATPases plasmática, vacuolar e mitocondrial (BEAUVOIT *et al.*, 1991) com o gasto de ATP. O aumento excessivo de H^+ -ATPase resulta em uma significativa diminuição da energia necessária para o crescimento da levedura e outras funções metabólicas essenciais (BRUL e COOTE, 1999) e com o tempo não será possível a manutenção do pH intracelular levando a uma diminuição do crescimento e finalmente à morte celular (HALM *et al.*, 2004).

5.2.5. Trealose

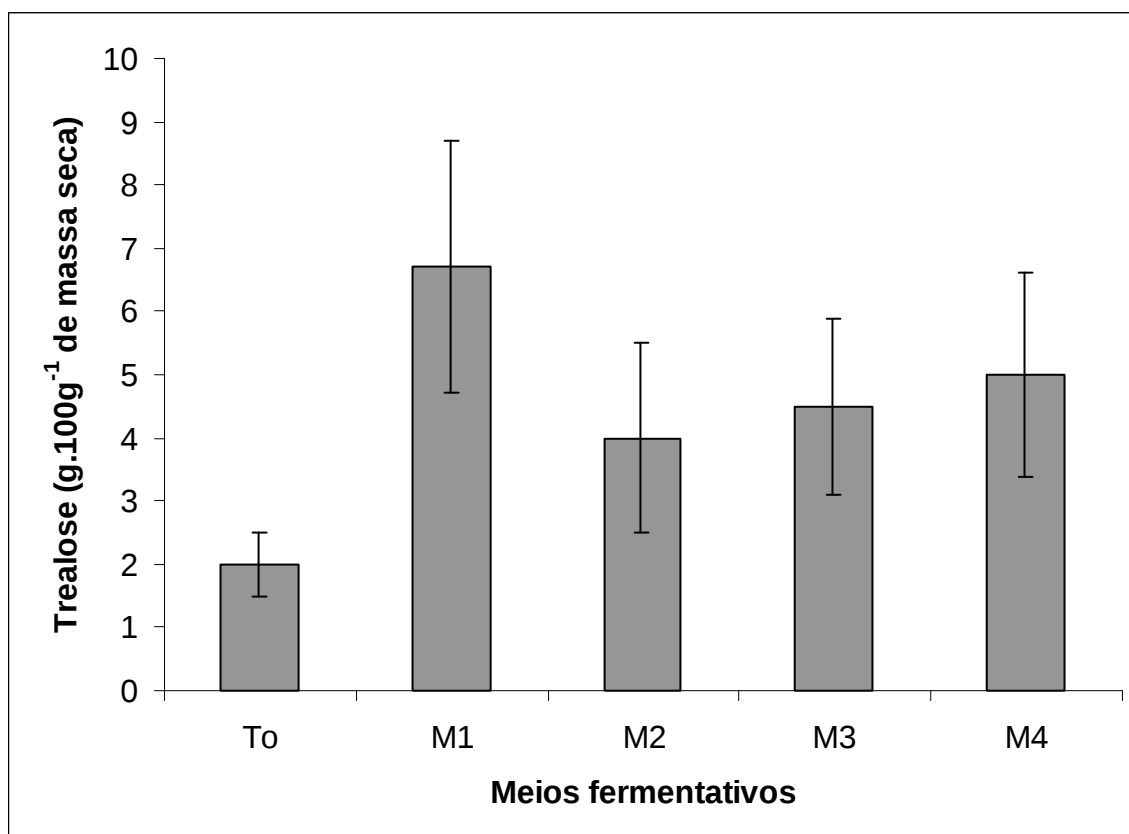


FIGURA 17: Efeito do tratamento ácido na formação de trealose pela linhagem *S. cerevisiae* PE-2 durante a fermentação desta, a 32° C, em meios com alto grau de estresse.

To = início da fermentação.

Médias obtidas do final do 7º ciclo fermentativo.

M1 (controle) = 0 mg de NaHSO₃/ L, 0 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 7,5% (p:v) de etanol, pH do mosto 4,5 e tratamento ácido sob pH 2,0 por 45 min.

M2 = 200 mg de NaHSO₃/ L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol, pH do mosto 3,6 e tratamento ácido sob pH 2,0 por 45 min.

M3 = 390 mg de NaHSO₃/ L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol, pH do mosto 4,5 e tratamento ácido sob pH 2,0 por 45 min.

M4 = 200 mg de NaHSO₃/ L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol, pH do mosto 4,5 e tratamento ácido sob pH 2,0 por 45 min.

A FIGURA 17 mostra que houve tendência de aumento na concentração de trealose pela levedura estudada em todos os meios testados em relação a concentração do início da fermentação (Anova, $p > 0,005$). A maior porcentagem deste carboidrato foi encontrada na biomassa da levedura alimentada com M1 (controle), no qual existiu uma menor concentração de sacarose. Assim, como discutido no item 5.1.5., a menor concentração de açúcar no mosto proporcionou maior estoque de trealose, estando este resultado de acordo com a literatura.

O tratamento ácido foi responsável por uma diminuição em torno de 13% do acúmulo de trealose pela levedura estudada nos meios controle, de pH 3,6 e pH 4,5 (TABELA 11). O aumento do AMPcíclico ocasionado pelo consumo de ATP por H^+ -ATPase em função do tratamento ácido, ativa a trealase a qual degrada a

TABELA 11: Formação de trealose pela linhagem *S.cerevisiae* PE-2 durante o processo fermentativo, a 32°C, em mostos com fatores de estresse associados* com presença ou ausência de tratamento ácido por 45 min, pH 2,0.

Tratamento ácido	Trealose (g 100 ⁻¹ de massa seca)	
	M **	DP***
controle****		
ausente	7,9	2,6
presente	6,7	2,0
mosto com pH 3,6 mais fatores de estresse		
ausente	4,5	0,7
presente	4,0	1,5
mosto com pH4,5 mais fatores de estresse		
ausente	5,8	1,2
presente	5,0	1,6

*fatores de estresse associados : 200 mg NaHSO₃/ L, 6g/ L de ácido láctico, 20,6% de sacarose (ajustada para 9,5% p:v de etanol) e pH = 3,6 ; ** M= Médias obtidas ao final do 7º ciclo fermentativo; *** DP= Desvio Padrão. **** Controle: 7,5% (p:v) de etanol, ausência de sulfito e ácido láctico, e mosto com pH 4,5.

trealose (VALLE *et al.*, 1987). A capacidade reduzida de estocar trealose em função do referido tratamento foi relacionada com a diminuição da viabilidade celular da linhagem PE-2. Desta maneira, o efeito protetor da trealose sobre a levedura foi diminuído.

5.2.6. Proteína residual

Após a análise estatística verificou-se que a proteína residual do vinho delevurado de *S. cerevisiae* PE-2 sofreu influência dos diferentes meios fermentativos (Anova, $p < 0,0001$). O meio controle foi responsável pela menor obtenção da proteína residual representando uma diminuição significativa (TUKEY, $p < 0,05$) de 64, 54 e 47% quando este mosto substituiu os M2, M3 e M4, respectivamente. (FIGURA 18). Isso mostra que existiu sinergismo entre a toxicidade do sulfito, ácido láctico, concentração elevada de sacarose, etanol e pH 3,6 no aumento da proteína no vinho delevurado.

O tratamento ácido causou um aumento significativo (Teste-t, $p = 0,0276$) de 37% da proteína residual apenas no meio com estresses associados e pH 4,5 do mosto (TABELA 12). Este resultado mostrou que o referido tratamento da levedura acabou diminuindo a integridade da membrana, aumentou a lise celular, e ou diminuiu o consumo de proteína no meio. Além disso, o tratamento ácido reduziu em parte o efeito protetor do pH 4,5 sobre o metabolismo do microrganismo, durante o processo fermentativo.

5.2.7. Determinação do açúcar redutor residual total, rendimento e produtividade etanólicos

A FIGURA 19 mostra que a concentração de açúcar residual do vinho delevurado de *S. cerevisiae* PE-2 sofreu influência significativa (Anova, $p < 0,0001$) dos diferentes meios fermentativos. A menor taxa de ARRT encontrada foi no meio controle, resultando em uma diminuição significativa (TUKEY, $p < 0,05$), cerca de 95%, em relação aos M2 e M3. Não existiu diferença significativa entre o M1 e o M4, mostrando, mais uma vez, que o pH 4,5 proporcionou um maior consumo do açúcar.

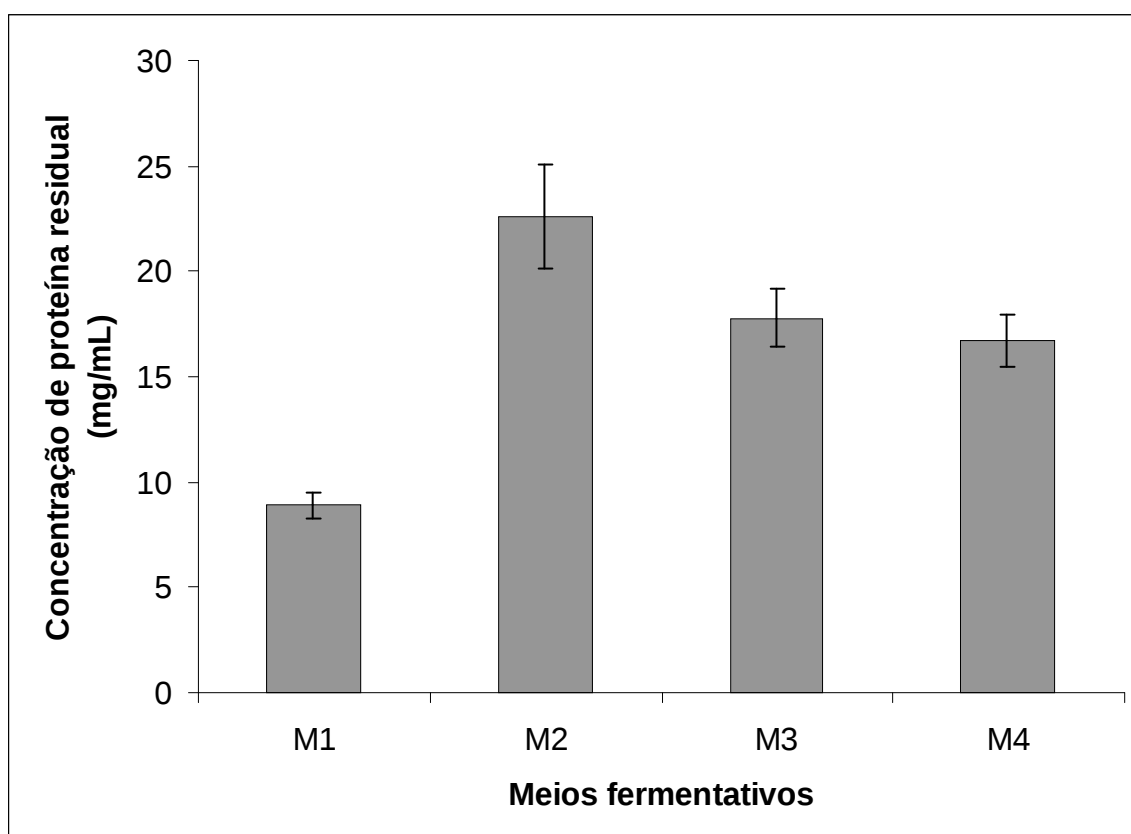


FIGURA 18: Efeito do tratamento ácido na liberação de proteína residual pela linhagem *S. cerevisiae* PE-2 durante a fermentação desta, a 32° C, em meios com alto grau de estresse.

Médias obtidas do 3° ao 7° ciclo fermentativo.

M1 (controle) = 0 mg de NaHSO₃/ L, 0 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 7,5% (p:v) de etanol, pH do mosto 4,5 e tratamento ácido sob pH 2,0 por 45 min.

M2 = 200 mg de NaHSO₃/ L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol, pH do mosto 3,6 e tratamento ácido sob pH 2,0 por 45 min.

M3 = 390 mg de NaHSO₃/ L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol, pH do mosto 4,5 e tratamento ácido sob pH 2,0 por 45 min.

M4 = 200 mg de NaHSO₃/ L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol, pH do mosto 4,5 e tratamento ácido sob pH 2,0 por 45 min.

TABELA 12: Proteína residual obtida pelo processo fermentativo de *S. cerevisiae* PE-2, a 32° C, em mostos com fatores de estresse associados *, com ausência ou presença de tratamento ácido por 45 min, pH 2,0.

Tratamento ácido	Proteína residual (mg/ mL)	
	M **	DP ***
controle****		
ausente	14	4,8
presente	14	3,4
mosto com pH 3,6 mais fatores de estresse		
ausente	26	12,0
presente	33	10,0
mosto com pH4,5 mais fatores de estresse		
ausente	19	8,0
presente	26	6,0

* fatores de estresse associados : 200 mg NaHSO₃/ L, 6g/ L de ácido láctico, 20,6% de sacarose (ajustada para 9,5% p:v de etanol) e pH = 3,6 ; ** M = Médias obtidas do 3° ao 7° ciclo fermentativo. *** DP = Desvio Padrão. **** Controle: 7,7% (p:v) de etanol, ausência de sulfito e ácido láctico, e mosto com pH 4,5.

Entretanto, no M3, mesmo sendo utilizado o pH 4,5, a taxa de sulfito empregada foi muito elevada, e este fator junto ao tratamento ácido repercutiu em um aumento do estresse. O excesso de sulfito presente no mosto mais o tratamento ácido diminuíram o consumo da sacarose pela levedura por afetarem seu metabolismo, pois, como discutido anteriormente, o sulfito nesta condição encontra-se em maior quantidade na forma de SO₂ que é mais tóxica para a levedura (CARTWRIGHT *et al.*, 1989).

Através da TABELA 13 é possível verificar que existiu uma tendência significativa (Teste F, $p < 0,0154$) do tratamento ácido ter aumentado a quantidade de açúcar redutor residual total nos três meios comparados. O tratamento com ácido sulfúrico repercutiu em um aumento significativo (Teste-t, $p < 0,0036$) de 221 e 300% de ARRT nos meios com pH 3,6 e 4,5, respectivamente. As diferenças entre as médias

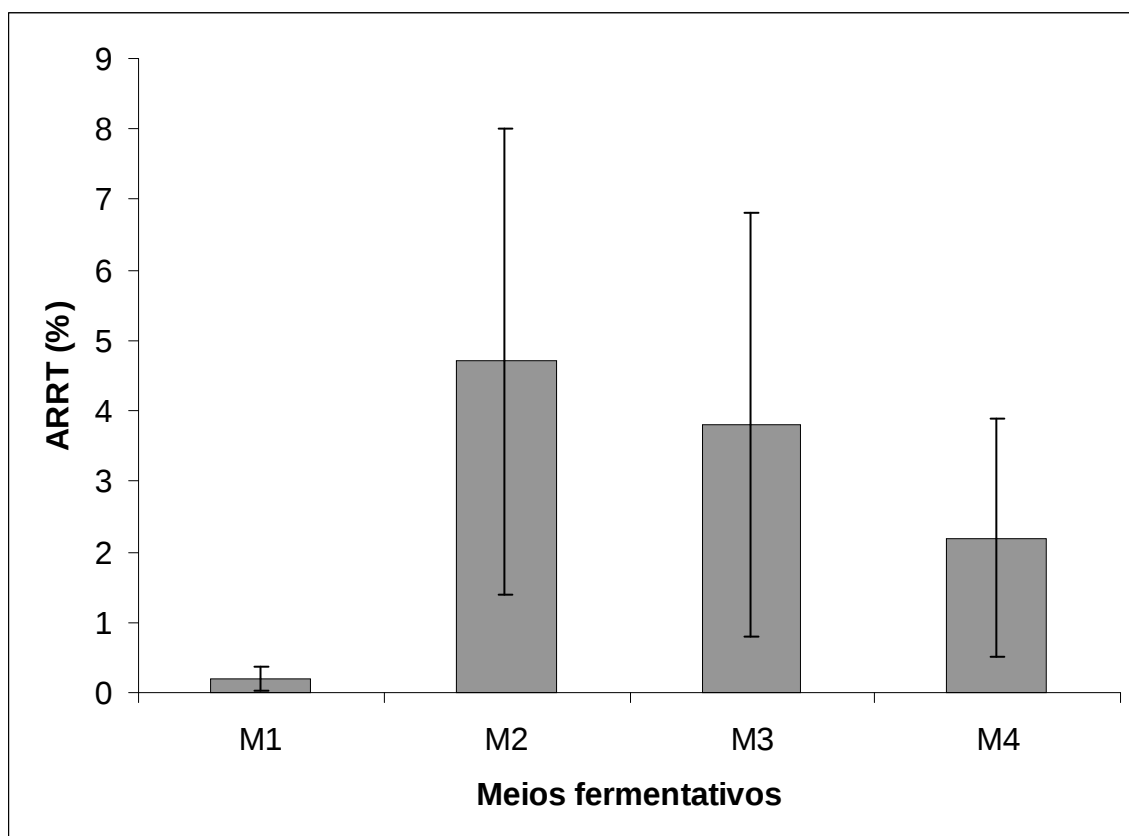


FIGURA 19: Efeito do tratamento ácido no açúcar redutor residual total após a fermentação, a 32° C, pela linhagem *S. cerevisiae* PE-2 em meios com alto grau de estresse.

Médias foram obtidas do 3° ao 7° ciclo fermentativo.

M1 (controle) = 0 mg de NaHSO₃/ L, 0 g de ácido láctico/ L, conversão teórica de sacarose para 7,5% (p:v) de etanol, pH do mosto 4,5 e tratamento ácido sob pH 2,0 por 45 min.

M2 = 200 mg de NaHSO₃/ L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol, pH do mosto 3,6 e tratamento ácido sob pH 2,0 por 45 min.

M3 = 390 mg de NaHSO₃/ L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol, pH do mosto 4,5 e tratamento ácido sob pH 2,0 por 45 min.

M4 = 200 mg de NaHSO₃/ L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol, pH do mosto 4,5 e tratamento ácido sob pH 2,0 por 45 min.

do meio controle não foram consideradas significativas (Teste-t, $p > 0,05$), mostrando que o tratamento ácido prejudicou o consumo de açúcar, quando esteve associado aos outros estresses.

A FIGURA 20 mostra que houve uma pequena tendência de influência dos diferentes tratamentos na obtenção do rendimento etanólico pela linhagem PE-2. No controle houve o maior valor absoluto do rendimento etanólico pela linhagem estudada. Embora, esta diferença tenha sido em torno de 11% maior em relação ao M2 e M3, e de 7% maior quando comparado ao M4, não foi considerada significativa (Anova, $p > 0,05$). Entretanto, a TABELA 14 mostra que o tratamento ácido resultou em uma diminuição significativa (Teste-t, $p < 0,0001$) das médias do rendimento etanólico, cerca de 33%, nos três meios estudados. Este resultado mostrou que o tratamento com ácido sulfúrico (pH 2,0 por 45 min) foi prejudicial ao processo fermentativo.

Quanto ao parâmetro produtividade etanólica, a FIGURA 21 mostra que existiu uma pequena tendência do M4 obter o maior valor absoluto. Mesmo esta diferença sendo de 13% em relação ao controle, não foi considerada significativa.

A TABELA 15 mostra que o tratamento com ácido sulfúrico causou decréscimo significativo (Teste-t, $p < 0,0001$), em torno de 34%, na produtividade etanólica nos três meios testados.

Dessa forma, através dos parâmetros analisados neste item (5.2.) foi possível verificar que o tratamento ácido interferiu negativamente no metabolismo da levedura, estando tal resultado de acordo com NUNES *et al.* 1991 e LUDWIG *et al.*, 2001. Principalmente quando este esteve associado aos efeitos negativos do sulfito, ácido láctico, pH 3,6, concentração de sacarose e etanol. Entretanto, os processos fermentativos estavam com o nível de contaminação controlado, e segundo HYNES *et al.*(1997) o crescimento das bactérias é o fator de maior estresse para a fermentação etanólica. Ainda assim, o emprego abusivo do tratamento ácido deve ser revisto, por este não conseguir exterminar toda a bactéria contaminante; a qual pode se multiplicar quando o metabolismo da levedura estiver danificado durante o processo fermentativo. O emprego de enzimas desfloculantes (OLIVEIRA-FREGUGLIA e HORII, 1998; LUDWIG, 2005), a centrifugação da biomassa de levedura após o tratamento ácido para eliminar bactérias ainda vivas (SOUZA e MUTTON, 2004) e o repouso desta antes de

retornar ao processo, poderiam ser mecanismos utilizados para amenizar o efeito prejudicial deste tratamento e diminuir sua intensa aplicação.

TABELA 13: Açúcares redutores residuais totais obtidos pelo processo fermentativo de *S. cerevisiae* PE-2, a 32° C, em mostos com fatores de estresse associados *, com ausência ou presença de tratamento ácido por 45 min, pH 2,0.

Tratamento ácido	ARRT (%)	
	M **	DP ***
controle****		
ausente	0,29	0,09
presente	0,22	0,17
mosto com pH 3,6 mais fatores de estresse		
ausente	1,45	1,00
presente	4,65	3,00
mosto com pH4,5 mais fatores de estresse		
ausente	0,55	0,22
presente	2,22	1,7

* fatores de e stresse associados : 200 mg NaHSO₃/ L, 6g/L de ácido láctico, 20,6 % de sacarose (ajustada para 9,5% p:v de etanol) e pH = 3,6 ; ** M = Médias obtidas do 3º ao 7º ciclo fermentativo.; *** DP = Desvio Padrão. ****Controle: 7,5% (p:v)de etanol, ausência de sulfito e ácido láctico, e pH do mosto 4,5.

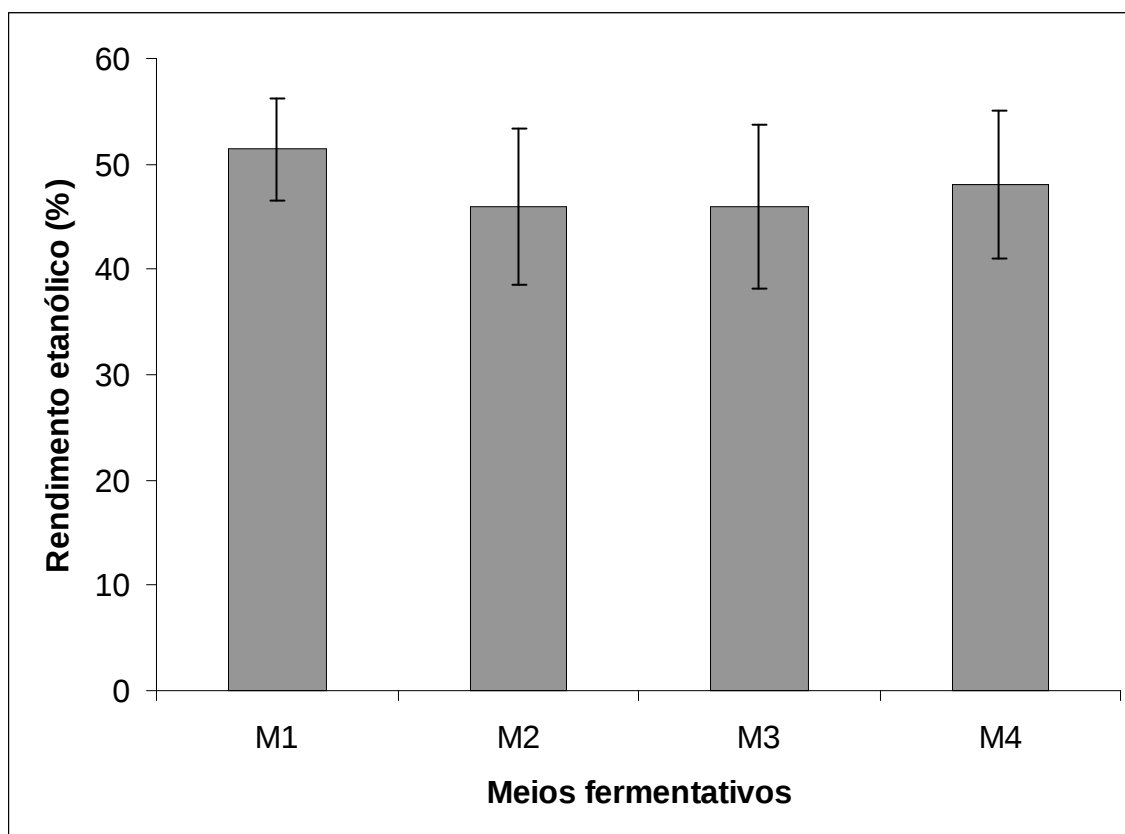


FIGURA 20: Efeito do tratamento ácido no rendimento etanólico obtido pela linhagem *S. cerevisiae* PE-2 durante a fermentação, a 32° C, desta em meios com alto grau de estresse.

Médias obtidas das amostras do 3 ao 7º ciclo fermentativo.

M1 (controle) = 0 mg de NaHSO₃/ L, 0 g de ácido láctico/ L, conversão teórica de sacarose para 7,5% (p:v) de etanol, pH do mosto 4,5 e tratamento ácido sob pH 2,0 por 45 min.

M2 = 200 mg de NaHSO₃/ L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol, pH do mosto 3,6 e tratamento ácido sob pH 2,0 por 45 min.

M3 = 390 mg de NaHSO₃/ L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol, pH do mosto 4,5 e tratamento ácido sob pH 2,0 por 45 min.

M4 = 200 mg de NaHSO₃/ L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol, pH do mosto 4,5 e tratamento ácido sob pH 2,0 por 45 min.

TABELA 14: Rendimento etanólico obtido pela linhagem *S. cerevisiae* PE-2 durante o processo fermentativo, a 32° C, em mostos com fatores de estresse associados*, com ausência ou presença de tratamento ácido por 45 min, pH 2,0.

Meios	Rendimento etanólico (%)	
	M **	DP ***
controle****		
ausente	75	10
presente	51	5
mosto com pH 3,6 mais fatores de estresse		
ausente	69	14
presente	46	7
mosto com pH4,5 mais fatores de estresse		
ausente	74	9
presente	48	7

* fatores de estresse associados : 200 mg NaHSO₃/L, 6g/L de ácido láctico, 20,6% de sacarose (ajustada para 9,5% p:v de etanol) e pH = 3,6 ; ** M = Médias obtidas do 3º ao 7º ciclo fermentativo.; *** DP = Desvio Padrão. **** Controle: 7,5% (p:v) de etanol, ausência de sulfito e ácido láctico, e mosto com pH 4,5.

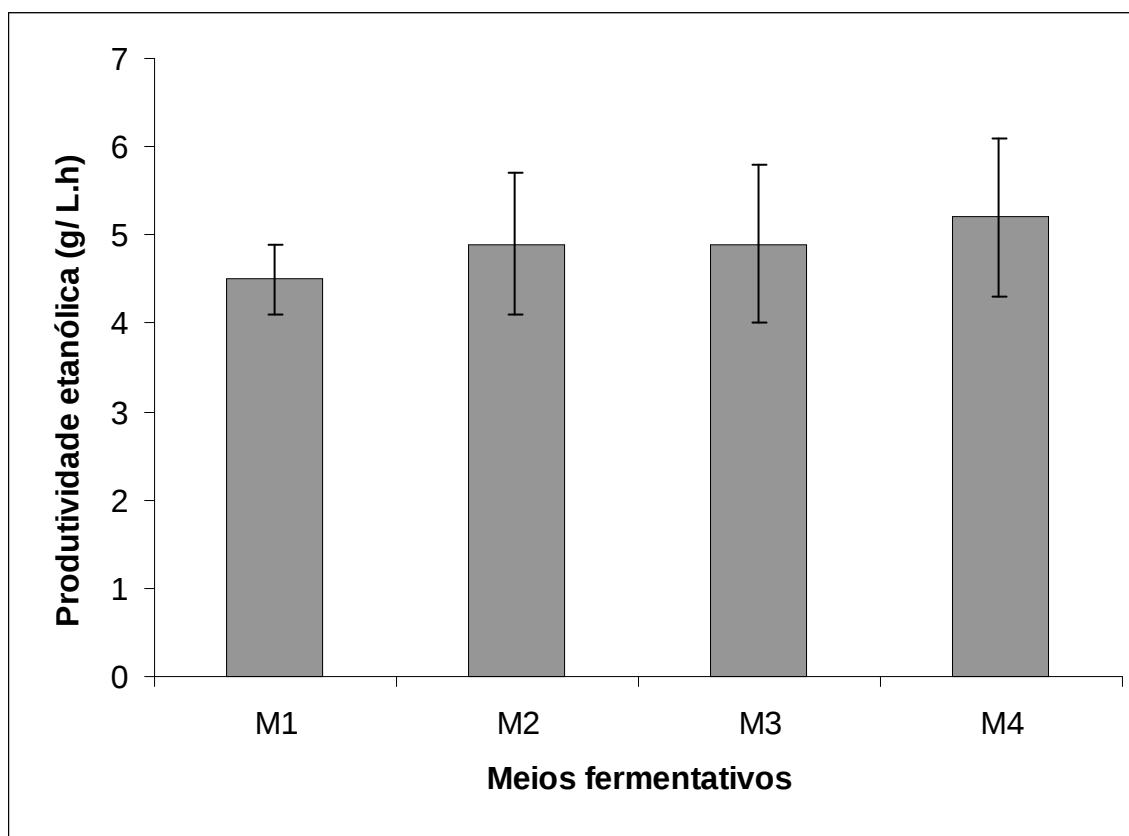


FIGURA 21: Efeito do tratamento ácido na produtividade etanólica obtida pela linhagem *S. cerevisiae* PE-2 durante a fermentação, a 32° C, desta em meios com alto grau de estresse.

Médias obtidas do 3º ao 7º ciclo fermentativo.

M1 (controle) = 0 mg de NaHSO_3 / L, 0 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 7,5% (p:v) de etanol, pH do mosto 4,5 e tratamento ácido sob pH 2,0 por 45 min.

M2 = 200 mg de NaHSO_3 / L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol, pH do mosto 3,6 e tratamento ácido sob pH 2,0 por 45 min.

M3 = 390 mg de NaHSO_3 / L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol, pH do mosto 4,5 e tratamento ácido sob pH 2,0 por 45 min.

M4 = 200 mg de NaHSO_3 / L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol, pH do mosto 4,5 e tratamento ácido sob pH 2,0 por 45 min.

TABELA 15: Produtividade etanólica obtida pela linhagem *S. cerevisiae* PE-2 durante o processo fermentativo, a 32° C, em mostos com fatores de estresse associados*, com presença ou ausência de tratamento ácido por 45 min, pH 2,0.

Tratamento ácido	Produtividade etanólica (g/ L.h)	
	M **	DP ***
controle****		
ausente	6,5	0,9
presente	4,5	0,4
mosto com pH 3,6 mais fatores de estresse		
ausente	7,3	1,4
presente	4,9	0,8
mosto com pH4,5 mais fatores de estresse		
ausente	8,1	0,9
presente	5,1	0,9

* fatores de estresse associados : 200 mg NaHSO₃/ L, 6g/ L de ácido láctico, 20,6% de sacarose (ajustada para 9,5% p:v de etanol) e pH = 3,6 ; ** M= Médias obtidas do 3^o ao 7^o ciclo fermentativo.; *** DP = Desvio Padrão. ****Controle: 7,5% (p:v) de etanol, ausência de sulfito e ácido láctico, e mosto com pH 4,5.

5.3. pH ótimo fermentativo sob condições de fatores de estresse associados

Nesta terceira etapa do trabalho foi verificado o pH ótimo para um melhor funcionamento do metabolismo da linhagem de levedura PE-2 em processos fermentativos com diferentes fatores de estresses: sulfito, ácido láctico e etanol. Os dados analisados neste item foram obtidos das amostras retiradas dos processos fermentativos descritos na TABELA 3 (p. 23).

5.3.1. Viabilidade e Brotamento

Ao submeter os dados obtidos da viabilidade e brotamento celulares de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 à análise de Variância verificou-se que houve diferença estatística entre alguns tratamentos (Anova, $p < 0,05$). Quanto a estes dois parâmetros analisados, não existiu diferença estatística (TUKEY, $p > 0,05$) entre os mostos com pH 4,5 (controle) e pH 5,0. (FIGURAS 22 e 23). Entretanto, a utilização dos pHs 3,5 e 4,0 repercutiu em uma diminuição significativa (TUKEY, $p < 0,05$) da viabilidade em média de 25% e do brotamento de 50%. Desse modo, o pH 5,0, assim como o pH 4,5 analisado nos experimentos anteriores (item 5.1.1. e 5.2.1.), exerceram um efeito protetor sobre o metabolismo de *S. cerevisiae* PE-2 perante ao sulfito, ácido láctico e etanol.

Como já mencionado anteriormente, esses resultados devem estar associados ao fato de que o pH mais elevado ocasiona menor entrada de ácidos orgânicos, SO_2 para o espaço intracelular e tem menor efeito tóxico associado à presença do etanol (CARTWRIGHT *et al.*, 1989).

A viabilidade e brotamento celulares são importantes parâmetros para a verificação de um bom estado fisiológico da levedura; assim, o pH inferior a 4,0 mostrou interferir no metabolismo deste microrganismo de modo sinérgico com outros fatores estressantes.

5.3.2. Produção de Biomassa

A FIGURA 24 mostra que houve uma tendência de crescimento celular

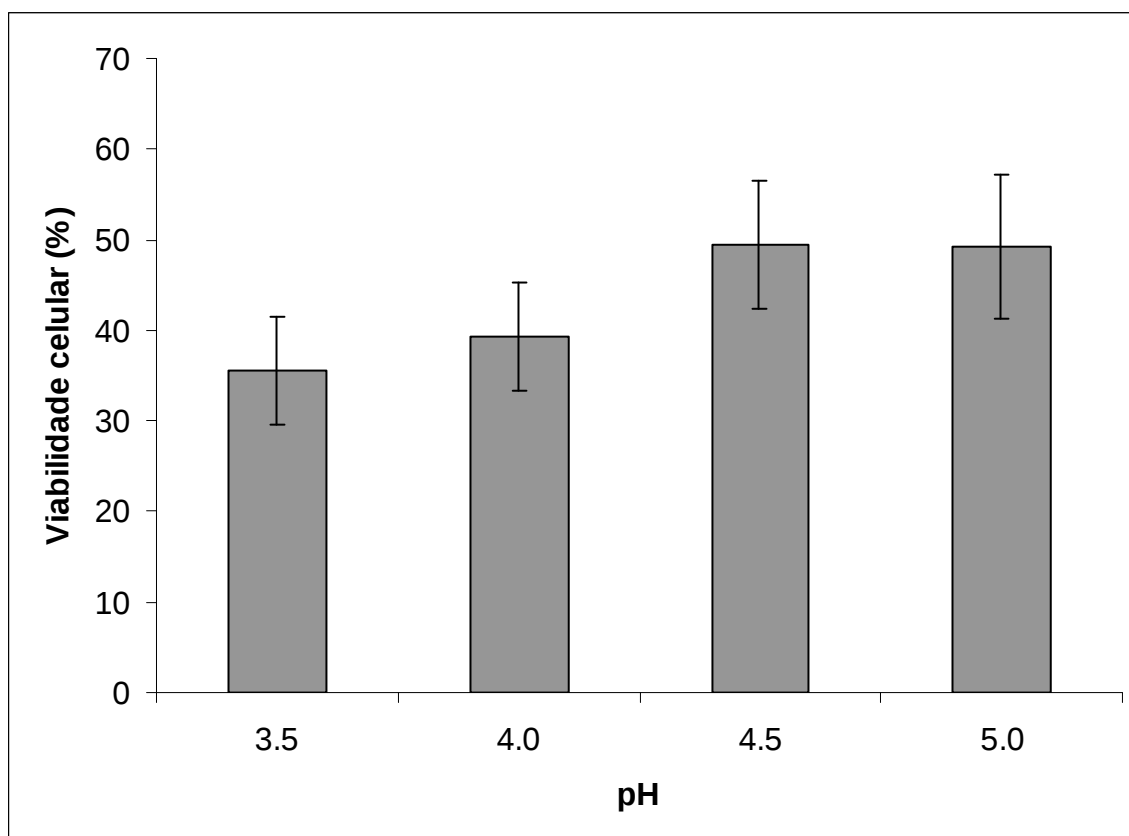


FIGURA 22: Viabilidade celular da linhagem *S. cerevisiae* PE-2 após sua fermentação, a 32° C, em mostos com alto grau de estresse em diferentes pHs.

Médias obtidas do 3º ao 7º ciclo fermentativo.

pH 3,5 (mosto): 200 mg de NaHSO₃/ L, 6 g de ácido láctico/ L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol.

pH 4,0 (mosto): 200 mg de NaHSO₃/ L, 6 g de ácido láctico/ L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol.

pH 4,5 (controle): 0 mg de NaHSO₃/ L, 0 g de ácido láctico/ L, conversão teórica de sacarose para 7,5% (p:v) de etanol.

pH 5,0 (mosto): 200 mg de NaHSO₃/ L, 6 g de ácido láctico/ L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol.

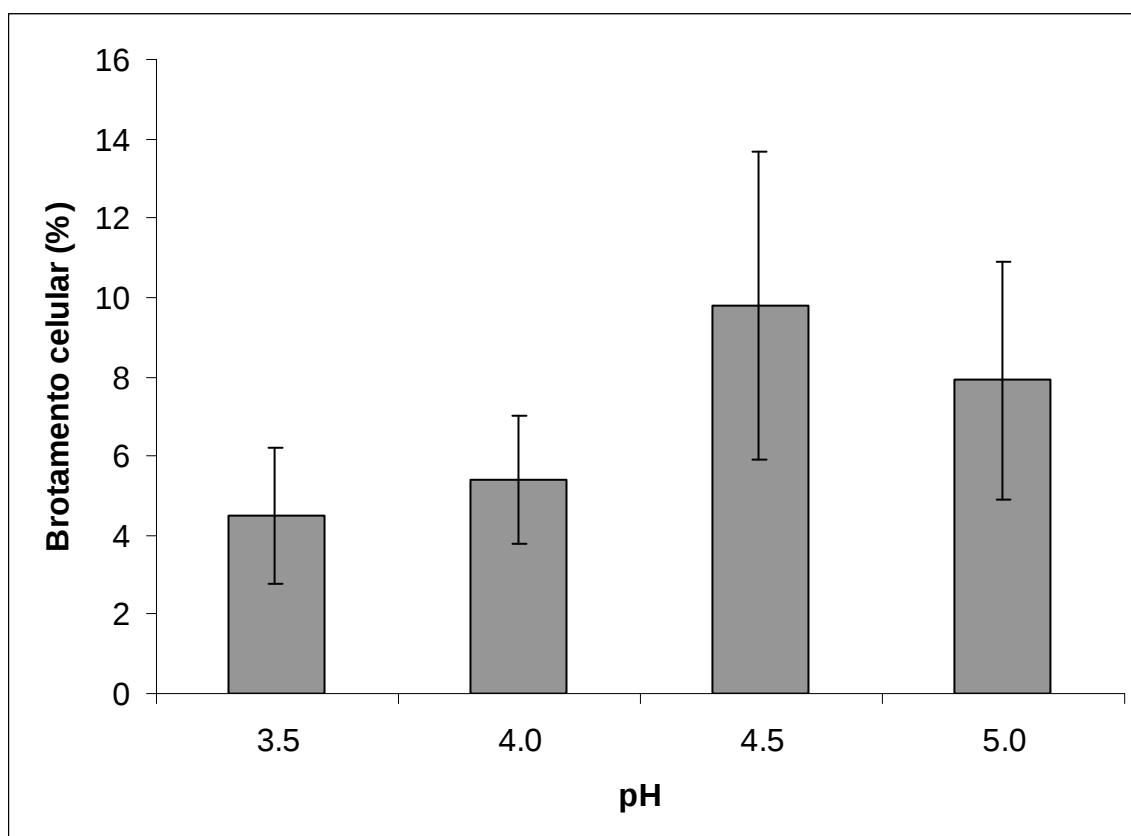


FIGURA 23: Brotamento celular da linhagem *S. cerevisiae* PE-2 após sua fermentação, a 32° C, em mostos com alto grau de estresse em diferentes pHs.

Médias obtidas do 3° ao 7° ciclo fermentativo.

pH 3,5 (mosto): 200 mg de NaHSO₃/L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol.

pH 4,0 (mosto): 200 mg de NaHSO₃/L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol.

pH 4,5 (controle): 0 mg de NaHSO₃/L, 0 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 7,5% (p:v) de etanol.

pH 5,0 (mosto): 200 mg de NaHSO₃/L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol.

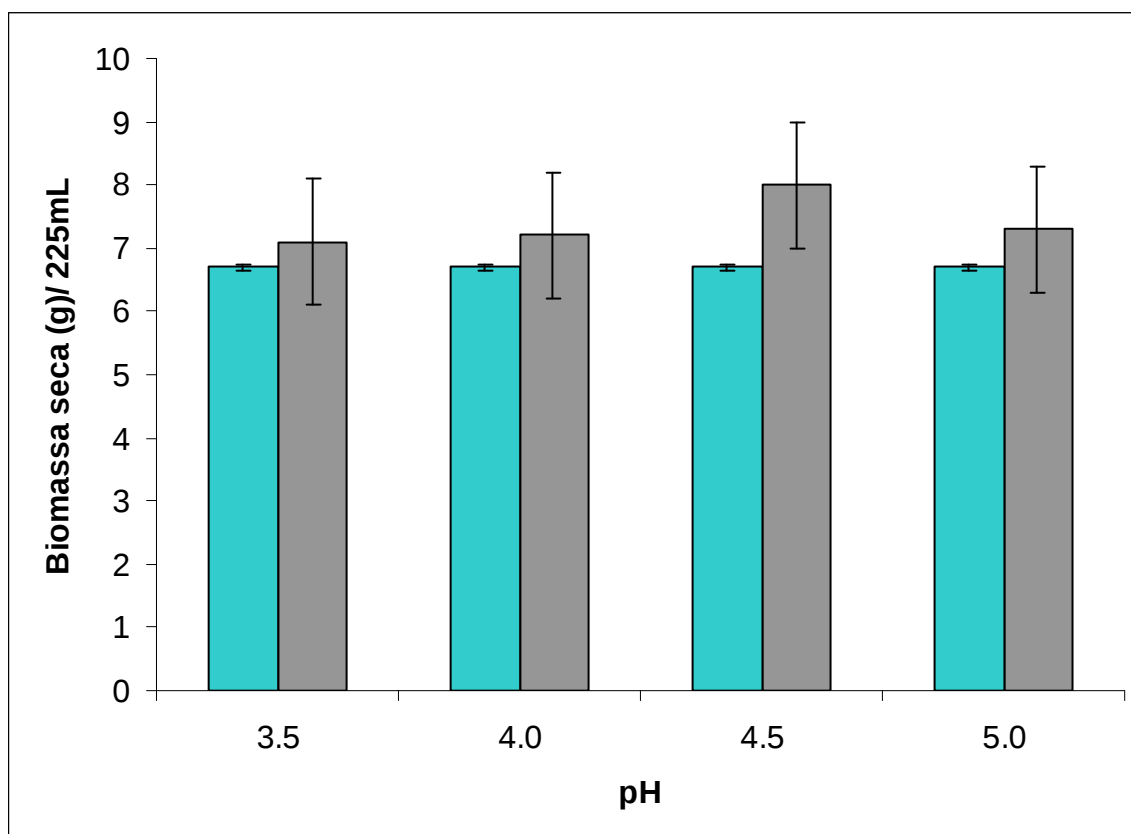


FIGURA 24: Biomassa seca da linhagem *S. cerevisiae* PE-2 após sua fermentação, a 32°C, em mostos com alto grau de estresse em diferentes pHs.

■ Biomassa seca inicial, ■ biomassa seca após a fermentação.

Médias obtidas do 3º, 5º e 7º ciclos fermentativos.

pH 3,5 (mosto): 200 mg de NaHSO₃/L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol.

pH 4,0 (mosto): 200 mg de NaHSO₃/L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol.

pH 4,5 (controle): 0 mg de NaHSO₃/L, 0 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 7,5% (p:v) de etanol.

pH 5,0 (mosto): 200 mg de NaHSO₃/L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol.

atividade da Bomba de prótons já que a enzima H^+ -ATPase tem que transportar para o exterior da membrana o excesso de H^+ que entra na célula em condições mais ácidas, pela linhagem estudada após os processos fermentativos. Tal resultado era esperado já que a levedura produz álcool na fase exponencial de crescimento. O maior valor absoluto de crescimento obtido foi no controle (pH 4,5) onde não ultrapassou 19%, sendo essa diferença considerada não significativa (TUKEY, $p > 0,05$), entretanto, se houvesse um maior número de repetições, talvez, essa diferença se tornasse significativa. O controle proporcionou, ainda, um aumento da biomassa, cerca de 10 %, em relação aos demais meios, mostrando que os fatores associados exerceram uma certa influência na inibição do crescimento.

5.3.3. Acidez total expressa em ácido láctico

A FIGURA 25 mostra que no mosto delevurado do controle (pH 4,5), após a fermentação por *S. cerevisiae* PE-2, foi obtido o menor valor de acidez total (expressa em g de ácido láctico/ L). Este resultado era previsto, pois em tal mosto fermentativo não foi adicionado 6 g de ácido láctico/L como nos outros. Entretanto, a comparação da produção de ácido láctico entre os demais meios ficou comprometida, pois os diferentes pHs utilizados interferiram, como visto nos itens anteriores, no teste de acidez que é feito por titulação com NaOH (0,1N). É importante salientar que a TABELA 5 mostra, através de análise em CLAE, que não ocorreu diferença significativa na produção de ácido láctico entre os diferentes pHs dos mostos com o alto grau de estresse, pois não foi induzida uma contaminação significante.

5.3.4. Atividade da Bomba de prótons

A Figura 26 mostra que os diferentes tratamentos tiveram uma tendência de influência significativa (Anova, $p < 0,0001$) na atividade da Bomba de prótons da linhagem *S. cerevisiae* PE-2. Os maiores valores médios da atividade da Bomba de prótons foram obtidos no pH 5,0 e 3,5. Entretanto, sob pH 3,5 a levedura mostrou tendência significativa de aumento da atividade no 7º ciclo fermentativo, e sob pH 5,0 tendência de diminuição. Este resultado está de acordo com a literatura, pois como discutido anteriormente, o pH mais baixo, no decorrer de alguns ciclos, eleva a

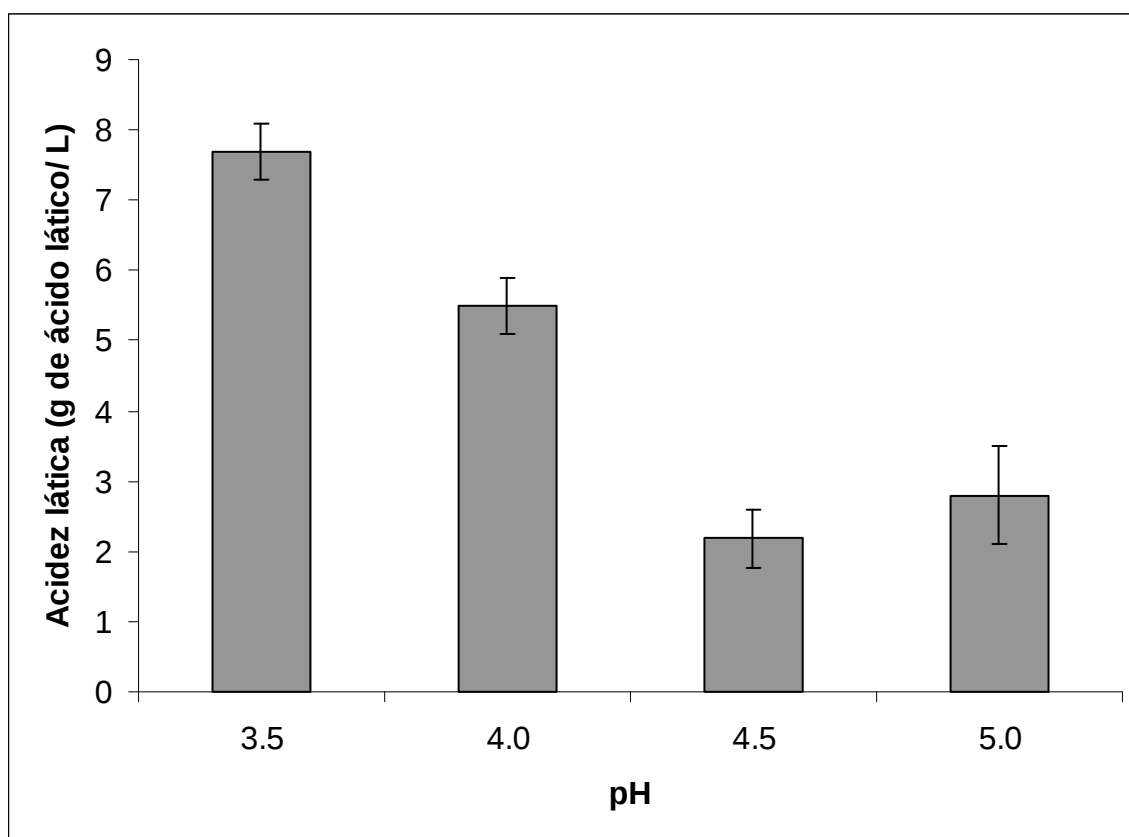


FIGURA 27: Acidez láctica produzida após a fermentação por *S. cerevisiae* PE-2, a 32° C, em mostos com alto grau de estresse em diferentes pHs.

Médias obtidas do 3^o ao 7^o ciclo fermentativo.

pH 3,5 (mosto): 200 mg de NaHSO₃/L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol.

pH 4,0 (mosto): 200 mg de NaHSO₃/L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol.

pH 4,5 (controle): 0 mg de NaHSO₃/L, 0 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 7,5% (p:v) de etanol.

pH 5,0 (mosto): 200 mg de NaHSO₃/L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol.

havendo um gasto elevado de ATP e déficit energético para as manutenções fisiológicas e metabólicas.

5.3.5. Trealose

A formação de trealose antes do início da fermentação pela linhagem *S. cerevisiae* PE-2 foi igual a zero, assim a FIGURA 27 mostra que houve um aumento significativo (TUKEY, $p < 0,05$) da concentração desse dissacarídeo pela levedura em todos os meios testados. A maior porcentagem deste carboidrato foi encontrada na biomassa da levedura alimentada com o meio pH 5,0 e 4,5, nos quais existiu maior viabilidade celular. Este fato reforça que a capacidade da levedura estocar trealose está relacionada com um melhor estado fisiológico que esta se encontra. (D'AMORE *et al.*, 1991).

5.3.6. Proteína residual

Após a análise estatística verificou-se que a proteína residual do vinho delevurado de *S. cerevisiae* PE-2 sofreu influência dos diferentes meios fermentativos (Anova, $p < 0,0001$). A FIGURA 28 mostra que a faixa de pH 4,0 ao 5,0 nos mostos proporcionou uma menor concentração de proteína residual nos vinhos delevurados sem diferenças significativas (TUKEY, $p > 0,05$). O meio com pH 3,5 mostrou um aumento significativo da proteína residual em até 56% em relação aos demais testados. Desse modo, o pH mais elevado proporcionou menor lise celular, maior integridade da membrana da linhagem PE-2 e ou maior consumo de proteína no meio, como observado nos experimentos anteriores.

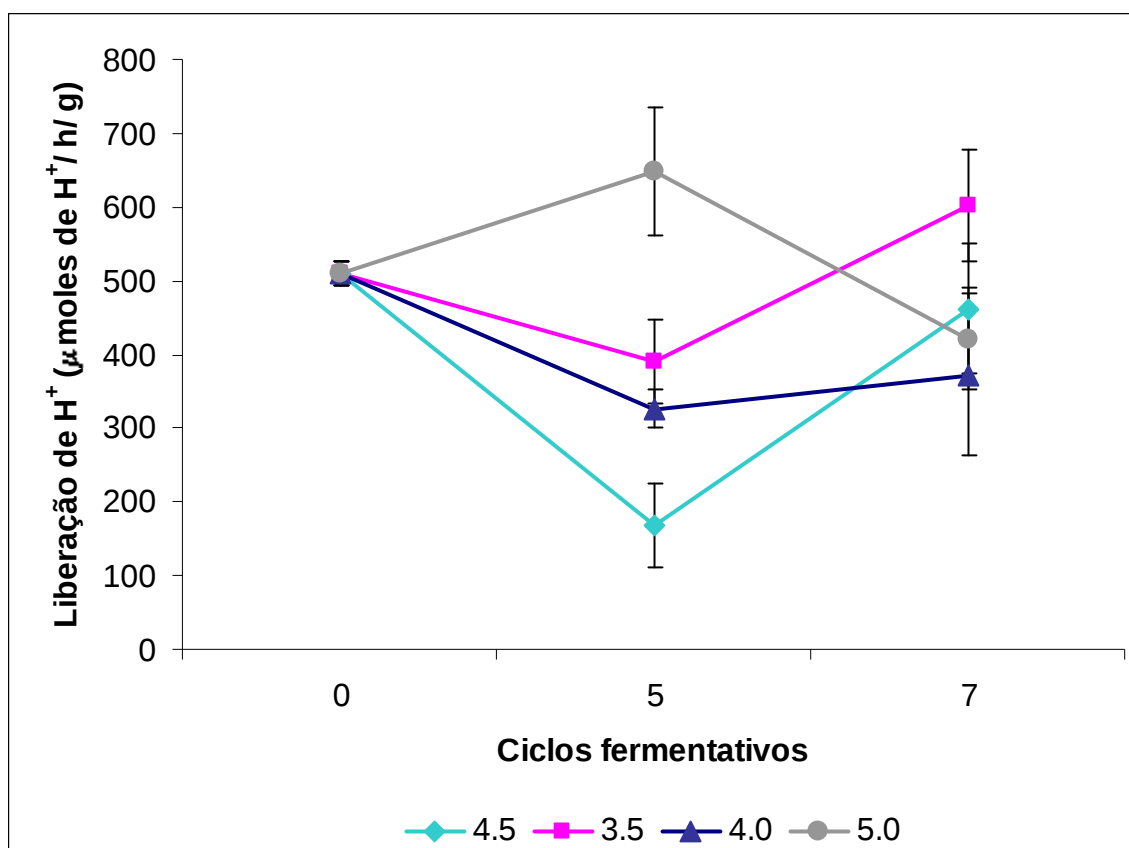


FIGURA 26: Atividade da Bomba de prótons da linhagem *S. cerevisiae* PE-2 durante o processo fermentativo, a 32° C, em mostos com alto grau de estresse em diferentes pHs.

pH 3,5 (mosto): 200 mg de NaHSO_3/L , 6 g de ácido láctico/ L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol.

pH 4,0 (mosto): 200 mg de NaHSO_3/L , 6 g de ácido láctico/ L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol.

pH 4,5 (controle): 0 mg de NaHSO_3/L , 0 g de ácido láctico/ L, conversão teórica de sacarose para 7,5% (p:v) de etanol.

pH 5,0 (mosto): 200 mg de NaHSO_3/L , 6 g de ácido láctico/ L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol.

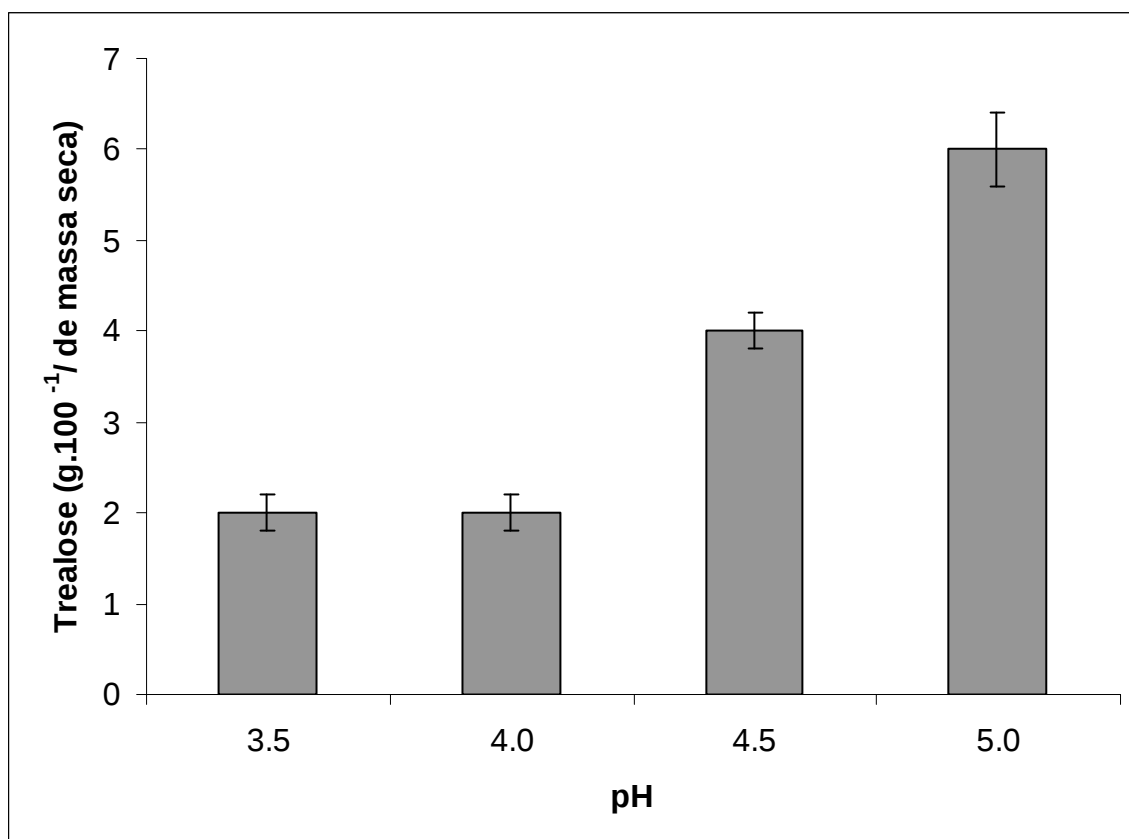


FIGURA 27: Concentração de trealose após a fermentação pela linhagem *S. cerevisiae* PE-2, a 32° C, em mostos com alto grau de estresse em diferentes pHs.

Médias obtidas do 7º ciclo fermentativo.

pH 3,5 (mosto): 200 mg de NaHSO₃/L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol.

pH 4,0 (mosto): 200 mg de NaHSO₃/L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol.

pH 4,5 (controle): 0 mg de NaHSO₃/L, 0 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 7,5% (p:v) de etanol.

pH 5,0 (mosto): 200 mg de NaHSO₃/L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol.

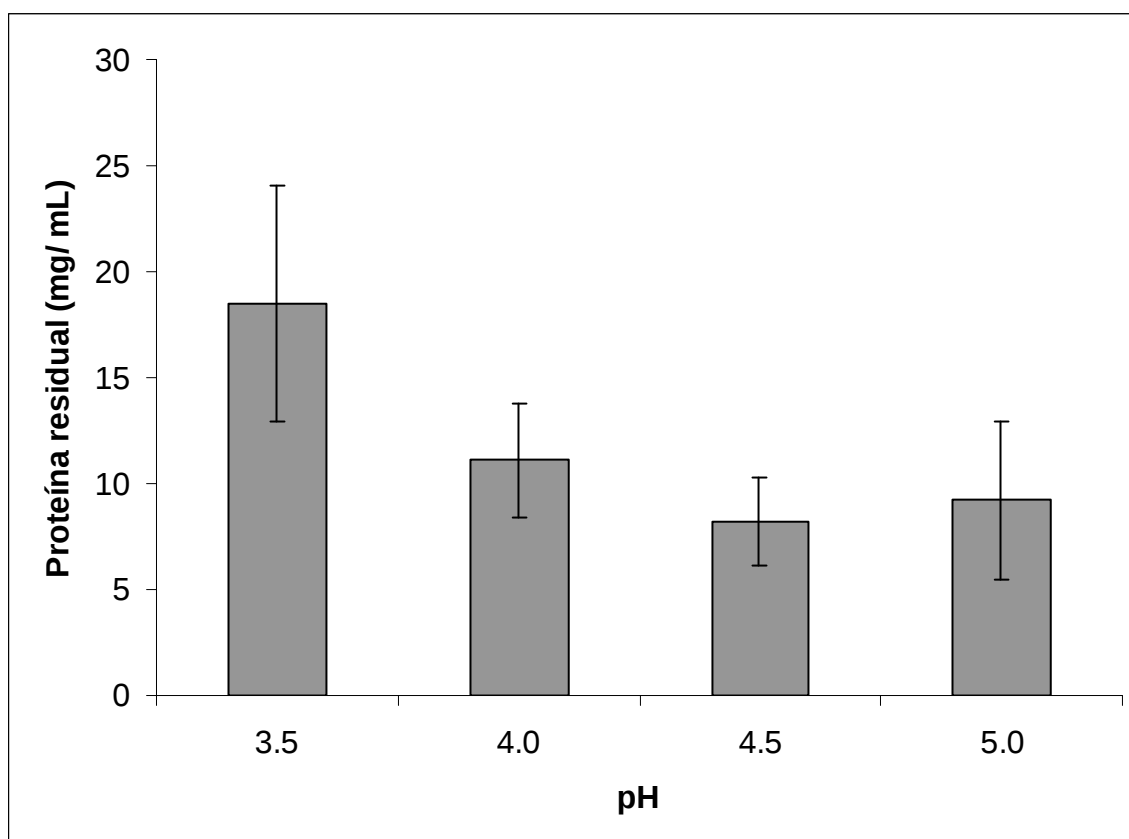


FIGURA 28: Proteína residual após a fermentação, a 32° C, pela linhagem *S. cerevisiae* PE-2 em mostos com alto grau de estresse em diferentes pHs.

Médias obtidas do 3° ao 7° ciclo fermentativo.

pH 3,5 (mosto): 200 mg de NaHSO₃/L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol.

pH 4,0 (mosto): 200 mg de NaHSO₃/L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol.

pH 4,5 (controle): 0 mg de NaHSO₃/L, 0 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 7,5% (p:v) de etanol.

pH 5,0 (mosto): 200 mg de NaHSO₃/L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol.

5.3.7. Determinação do açúcar redutor residual total, rendimento e produtividade etanólica

A FIGURA 29 mostra que o açúcar redutor residual total do vinho delevurado de *S. cerevisiae* PE-2 sofreu influência significativa (Anova, $p < 0,0001$) dos diferentes meios fermentativos. A faixa de pH 4,0 ao 5,0 proporcionou uma redução significativa (TUKEY $p < 0,05$) do açúcar redutor em relação ao pH 3,5 em até 48%. Dessa forma, através do equilíbrio Carbono/ Nitrogênio efetuado pela levedura durante seu crescimento, existiu o menor consumo de sacarose no meio com pH 3,5, e conseqüentemente, uma menor absorção de nitrogênio que nos demais meios testados. A maior sobra de açúcares no vinho indica, segundo ALTERTHUM *et al.* (1984), que as células de leveduras estão enfraquecidas e mais incapacitadas de utilizar adequadamente o substrato disponível.

A FIGURA 30 mostra que houve tendência da influência dos diferentes tratamentos na obtenção do rendimento etanólico pela linhagem PE-2 (Anova, $p = 0,049$). O controle (pH 4,5) e o meio com pH 5,0 e 4,0 tiveram uma tendência de apresentar as maiores médias de rendimento, embora, tal diferença não tenha sido considerada significativa (TUKEY, $p > 0,05$), chegou até 13% em relação ao meio com pH 3,5. É comum fatores estressantes atingirem em maior grau a viabilidade celular ao invés da produção etanólica, entretanto, se as fermentações destes experimentos seguissem por vários ciclos, provavelmente, aumentaria o impacto sobre o rendimento etanólico, já que sua viabilidade foi bastante afetada em poucos ciclos. Quanto ao parâmetro produtividade etanólica, a FIGURA 31 mostra que existiu uma pequena tendência dos meios com pH 4,0 e 5,0 obterem as maiores médias, embora, esta não tenha sido significativa.

Através dos parâmetros analisados nesses experimentos, foi possível verificar que no pH mais elevado, principalmente próximo ao 5,0, houve uma maior proteção dos fatores sinérgicos de estresse, em aspectos fisiológicos, para a levedura, destacando-se viabilidade celular, brotamento celular e estoque de trealose. A faixa de pH 4,0 a 5,0 foi responsável pela menor concentração de proteína residual no meio, menor ARRT, e ainda tendência de maiores rendimentos etanólicos. Esta faixa de pH coincide com a descrita por LEITÃO *et al.* (1988) como a que favorece a levedura e

inibe o desenvolvimento de bactérias contaminantes durante o processo fermentativo. É importante ressaltar que, segundo GOMES (1988), existe perdas de nutrientes em valores baixos de pH (abaixo de 4,0), principalmente nitrogênio e potássio, elementos essenciais para o metabolismo da levedura.

Segundo JONES *et al.* (1981), os valores de pH dos meios fermentativos industriais geralmente encontram-se na faixa de 4,5 a 5,0; embora, possam atingir pH mais baixo como 3,8, dependendo do processo. Dessa forma, estes resultados mostram que o processo fermentativo ocorrendo na faixa mais elevada de pH nas indústrias, acaba beneficiando a integridade fisiológica da levedura em fermentações com altas concentrações de ácido láctico, SO₂, sacarose e etanol. Além disso, quando é feito o tratamento ácido de forma exacerbada sobre a levedura, os danos fisiológicos podem ser intensificados como mostrado no item 5.2. deste trabalho.

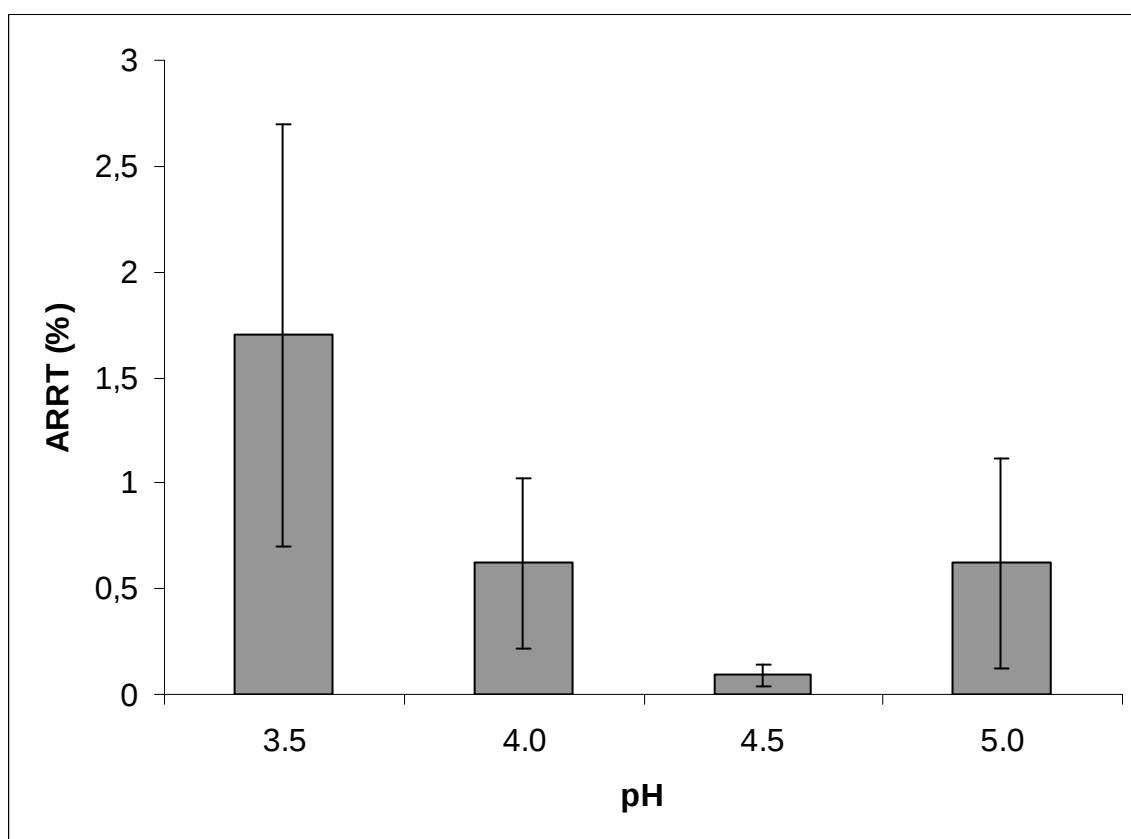


FIGURA 29: Açúcares redutores residuais totais após a fermentação pela linhagem *S. cerevisiae* PE-2, a 32° C, em mostos com alto grau de estresse em diferentes pHs.

Médias obtidas do 3 ao 7º ciclo fermentativo.

pH 3,5 (mosto): 200 mg de NaHSO₃/ L, 6 g de ácido láctico/ L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol.

pH 4,0 (mosto): 200 mg de NaHSO₃/ L, 6 g de ácido láctico/ L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol.

pH 4,5 (controle): 0 mg de NaHSO₃/ L, 0 g de ácido láctico/ L, conversão teórica de sacarose para 7,5% (p:v) de etanol.

pH 5,0 (mosto): 200 mg de NaHSO₃/ L, 6 g de ácido láctico/ L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol.

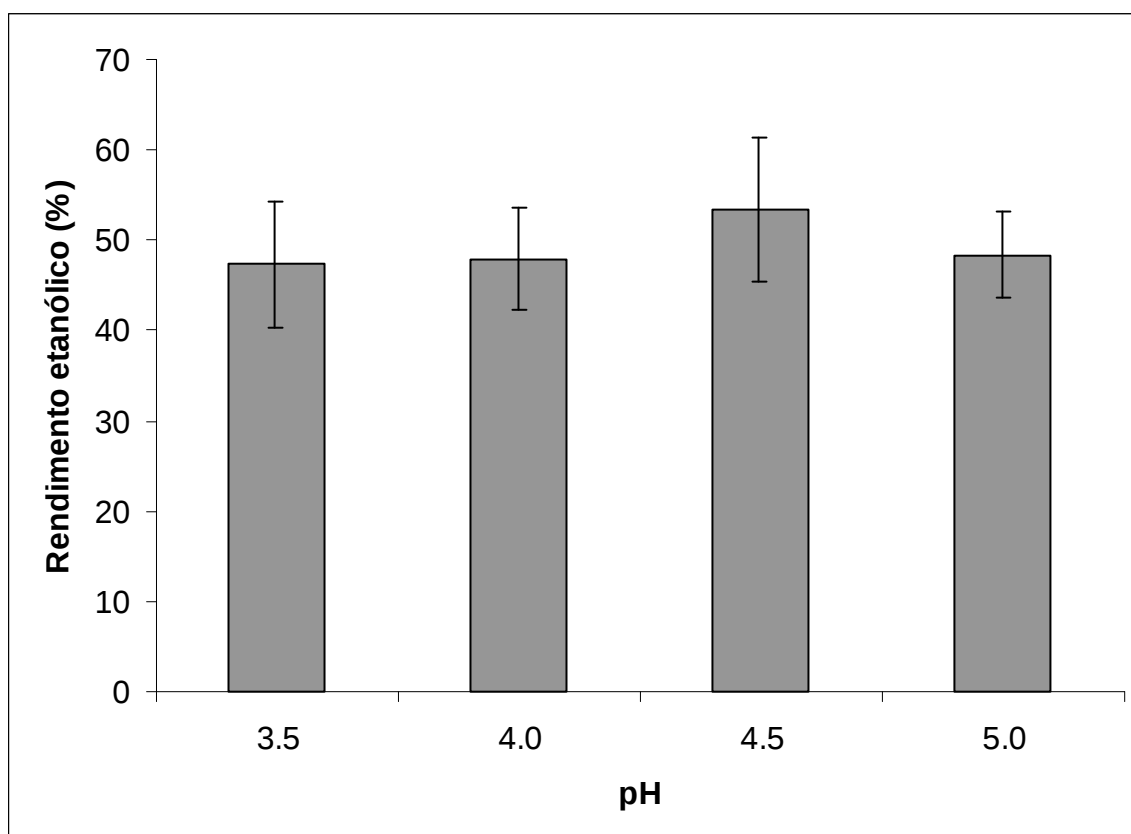


FIGURA 30: Rendimento etanólico após a fermentação pela linhagem *S. cerevisiae* PE-2, a 32° C, em mostos com alto grau de estresse em diferentes pHs.

Médias obtidas do 3º ao 7º ciclo fermentativo.

pH 3,5 (mosto): 200 mg de NaHSO_3/L , 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol.

pH 4,0 (mosto): 200 mg de NaHSO_3/L , 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol.

pH 4,5 (controle): 0 mg de NaHSO_3/L , 0 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 7,5% (p:v) de etanol.

pH 5,0 (mosto): 200 mg de NaHSO_3/L , 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol.

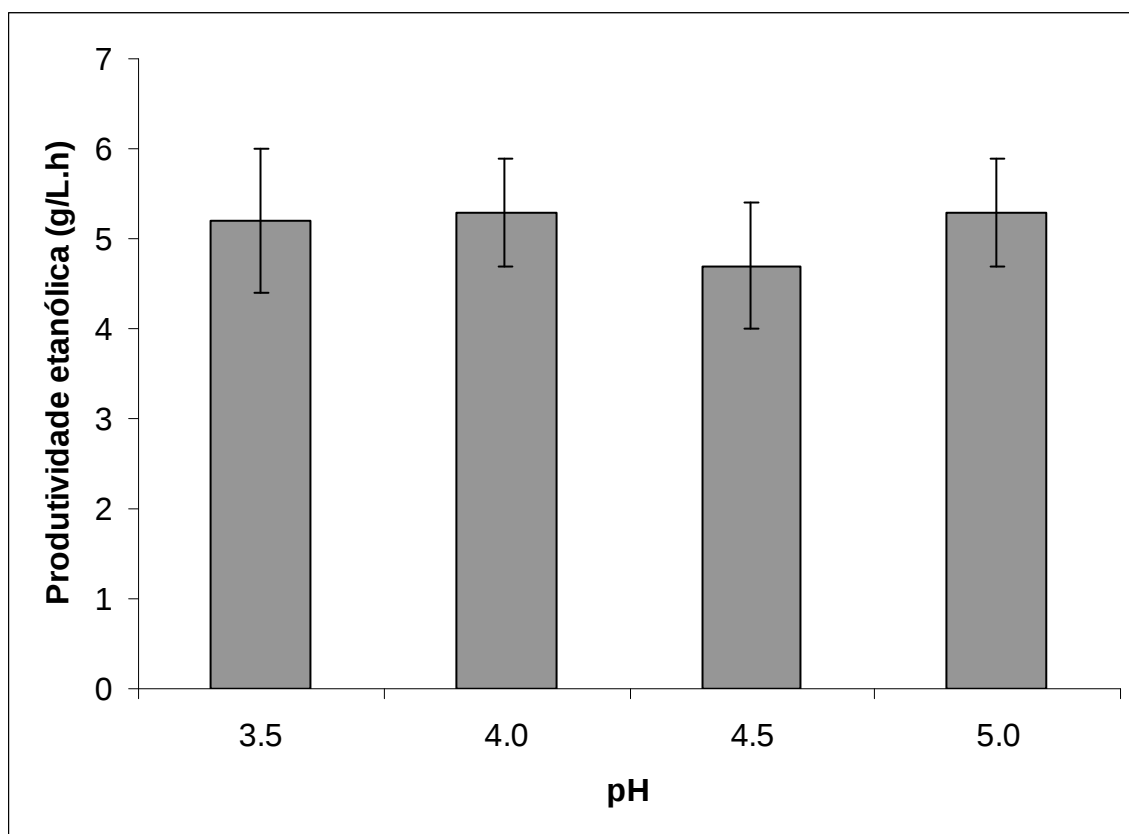


FIGURA 31: Produtividade etanólica após a fermentação pela linhagem *S. cerevisiae* PE-2, a 32° C, em mostos com alto grau de estresse em diferentes pHs. Médias foram obtidas das amostras do 3º ao 7º ciclo fermentativo.

pH 3,5 (mosto): 200 mg de NaHSO₃/L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol.

pH 4,0 (mosto): 200 mg de NaHSO₃/L, 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol.

pH 4,5 (controle): 0 mg de NaHSO₃/L, 0 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 7,5% (p:v) de etanol.

pH 5,0 (mosto): 200 mg de NaHSO₃/ , 6 g de ácido láctico/L, conversão teórica de sacarose para 9,5% (p:v) de etanol.

5.4. Efeito do tratamento ácido e pH dos mostos durante a fermentação mista de *S. cerevisiae* PE-2 e *L. fermentum* CCT 1396

Dentre os fatores de estresse estudados nas três primeiras etapas deste trabalho, o pH baixo, principalmente o obtido pelo tratamento ácido, foi o que teve maior relevância. Entretanto, as fermentações anteriores não foram avaliadas sob alto índice de contaminação. Assim, nesta última fase do trabalho foram testados diferentes tempos de tratamento com o ácido sulfúrico e os mostos foram ajustados para pH 3,8 ou 4,8 durante fermentações com alto nível de contaminação. A TABELA 4 (p. 24) mostra como foi realizado cada um destes processos fermentativos.

5.4.1. Viabilidade e Brotamento

Ao submeter os dados obtidos da viabilidade e brotamento celulares de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 à análise Variância, verificou-se que não houve diferença estatística entre os tratamentos (Anova, $p > 0,05$). Entretanto, ao observar a TABELA 16 pode-se verificar que existiu uma tendência das maiores viabilidades médias se encontrarem no processo fermentativo do controle (T1: tratamento ácido ausente e mosto fermentativo com pH 3,8) e do Tratamento 5 (T5: tratamento ácido por 1h e mosto fermentativo com pH 3,8); e provavelmente se a fermentação fosse continuada por vários ciclos tais diferenças se tornariam significativas. Dessa forma, estes resultados indicam que a utilização do pH 3,8 durante o processo fermentativo com elevado grau de contaminação bacteriana (acima de 10^8 cel/ mL) pode ser mais viável que o pH 4,8. Tais dados são coerentes, pois as bactérias, em geral, têm o metabolismo mais ativo em pHs menos ácidos; o que é confirmado na mesma TABELA 16 ao verificar que os maiores valores absolutos das unidades formadoras de colônias (UFC/ mL) de *Lactobacillus fermentum* se encontram nos tratamentos T2 e T3, cujo pH do mosto fermentativo foi igual a 4,8. As UFC que resultaram do T3 foram 123% maiores que as obtidas no T5, cujo tratamento ácido foi também de 1h, entretanto, o pH do mosto foi mais baixo. Outra observação importante é que o tratamento ácido não mostrou ser o principal fator para as maiores viabilidades, já que este não foi feito no T1 e obteve-se a viabilidade semelhante ao tratamento de 1h com ácido sulfúrico no T5. Além disso, não houve diferença estatística entre UFC/ mL da bactéria estudada entre estes dois tratamentos.

Esses resultados foram similares aos obtidos por OTENIO (1998), que após testar a retirada do tratamento ácido do fermento em uma Usina em Bandeirantes (PR), não verificou diferenças estatísticas para a viabilidade da levedura e UFC/ mL da bactéria em relação ao fermento tratado.

TABELA 16: Viabilidade e brotamento da linhagem *S. cerevisiae* PE-2 e UFC/mL de *L. fermentum* CCT 1396 após fermentação mista, a 32° C, e do tratamento com ácido sulfúrico do fermento (pH 2,5).

Tratamento s	Viabilidade média da levedura (%)		Brotamento médio da levedura (%)		UFC x 10 ⁹ / mL da bactéria	
	M*	DP**	M	DP	M	DP
T1	30,7	8,8	4,6	2,6	1,2	0,9
T2	27,0	7,8	4,6	3,7	1,6	0,6
T3	27,0	9,0	3,4	3,8	2,2	1,2
T4	28,0	8,0	2,8	1,7	1,2	0,6
T5	31,3	10,3	2,9	2,4	1,0	0,4

*M= médias obtidas do 3º ao 7º ciclo fermentativo; **DP = desvio padrão. **T1** (controle) = tratamento ácido ausente e mosto com pH 3,8; **T2** = tratamento ácido por 2h e mosto com pH 4,8; **T3** = tratamento ácido por 1h e mosto com pH 4,8; **T4** = tratamento ácido por 2h e mosto com pH 3,8; **T5** = tratamento ácido por 1h e mosto com pH 3,8.

NUNES *et al.* (1991) mostraram que a retirada do tratamento ácido além de outros antimicrobianos do processo de fermentação alcoólica, em duas destilarias de Alagoas, não elevou significativamente o número de bactérias contaminantes. Estes autores alegam que o emprego dos referidos tratamentos é inoportuno por ser responsável por uma infinidade de reações químicas e pelo desequilíbrio do importante sistema enzima-substrato no meio fermentativo.

Muitos pesquisadores defendem a prática do tratamento ácido, mas desde que seja feito com cautela, e em determinados períodos do processo fermentativo. (BOVI e MARQUES, 1982; YOKOYA, 1989). Por outro lado STUPIELLO e HORII (1981) mostraram que o tratamento ácido é um dos pontos fundamentais para o bom desempenho da fermentação. Segundo estes pesquisadores, o tempo de retenção deve

ser de duas a três horas, e será suficiente para provocar a eliminação de grande parte da contaminação sem afetar, de maneira sensível, a viabilidade celular da levedura do processo.

Nas usinas o tratamento ácido é normalmente empregado como meio de controlar a contaminação e promover a desfloculação do fermento. Ainda existem muitas dúvidas quanto à intensidade do tratamento ácido. É importante lembrar que após a destilação do vinho a vinhaça vai conduzir o ácido sulfúrico ao solo causando desequilíbrio no meio ambiente, além de gerar custo, perigo no transporte e no manuseamento do produto (OTÊNIO, 1998).

A TABELA 16 mostra que existiu uma tendência, embora não significativa, da obtenção das menores taxas de brotamento no T4 e T5, assim, o tratamento ácido associado ao pH 3,8 do mosto pode ter uma certa influência negativa sobre a renovação celular pela levedura. Entretanto, a interpretação do percentual de brotamento numa fermentação é particularmente difícil. Segundo CARVALHO (2001) a taxa de brotamento não apresenta tendência definida e não guarda necessariamente relação com o crescimento do fermento e nem com a viabilidade, pois esta é uma medida pontual e pode sofrer a crítica de que o broto demora mais ou não se desprende da célula mãe se a condição nutricional assim induzir.

A contaminação bacteriana resultou numa diminuição da viabilidade e brotamento iniciais da levedura em torno de 70% e 83%, respectivamente, nos diferentes meios fermentativos testados. Resultado semelhante foi obtido no mosto fermentativo de maior estresse (M2) discutido no item 5.2.1., no qual utilizou-se de 200mg de sulfito/L, 6 g de ácido láctico/L, 20,6% de sacarose, pH 3,6 do mosto e o tratamento com ácido sulfúrico 2N sob pH 2,0 por 45 min. Em tal processo houve uma diminuição da viabilidade de 68% e do brotamento de 79% para a linhagem estudada de *S. cerevisiae* PE-2. Segundo HYNES *et al.* (1997), a contaminação por bactéria é o pior fator de estresse para a fermentação, entretanto, o experimento discutido no item 5.2.1. mostrou que os outros fatores de estresses testados de forma associada, mas sem uma contaminação significativa de bactéria, são também de elevada importância.

AMORIM e OLIVEIRA (1982) mostraram que as bactérias contaminantes causaram prejuízos à fermentação e inibiram o crescimento da levedura

através da produção de ácido láctico e outros ácidos orgânicos. OLIVA-NETO e YOKOYA (1994) verificaram que houve uma diminuição da viabilidade celular da levedura estudada em cerca de 66% quando o número de células de *L. fermentum* CCT 1407 atingiu $5,8 \times 10^8$ cel/mL no 17º ciclo fermentativo. FREGUGLIA (1997) relatou uma queda de 97% na viabilidade de *S. cerevisiae* após 12h em cultura mista com *L. fermentum*. THOMAS *et al.* (2001) mostraram uma inibição de 55% da viabilidade da levedura estudada em função da contaminação por *L. fermentum* durante 6 ciclos fermentativos em batelada de mosto a base de milho. NOBRE (2005) chegou a conclusão que após 72h de fermentação mista com *S. cerevisiae* e *L. fermentum* (10^7 cel/ mL) houve uma diminuição da viabilidade e brotamento da levedura em cerca de 75% e 73%, respectivamente. Dessa forma, é importante observar que os resultados obtidos no atual trabalho foram semelhantes aos encontrados na literatura.

CHERUBIN (2003), num experimento comparativo entre linhagens de *S. cerevisiae* PE-2 ou M-26 em cultura mista com *L. fermentum* CCT 1407, durante 6 ciclos fermentativos, constatou que não houve relação significativa entre a contaminação bacteriana e a viabilidade das leveduras. Entretanto, é interessante salientar que tal pesquisador utilizou-se da concentração inicial de $1,5 \times 10^6$ UFC/ mL de bactéria chegando a uma concentração máxima de 6×10^7 UFC/mL ao final do 6º ciclo fermentativo. Provavelmente, foram poucos ciclos com contaminação não muita elevada, para não ter surtido efeito na viabilidade da levedura. Segundo o mesmo pesquisador, para fermentações industriais, as contaminações bacterianas acima de $5,0 \times 10^6$ UFC/ mL são consideradas prejudiciais, acima de $1,0 \times 10^7$ UFC/ mL os prejuízos econômicos são significativos e acima de $1,0 \times 10^8$ UFC/ mL ocorrem quedas nos rendimentos fermentativo e industrial, dificuldades de operação de centrífugas, floculação e aumento de consumo de ácido sulfúrico e antibióticos.

5.4.2. Produção de Biomassa e Relação Bactéria/ Levedura

Após a análise estatística verificou-se que os diferentes tratamentos empregados nas fermentações foram significativos para a diminuição da biomassa seca da levedura (Anova, $p < 0,0001$). Existiu uma redução significativa (TUKEY, $p < 0,05$) da biomassa em torno de 28%, durante as fermentações submetidas aos Tratamentos 1, 2, 3 e 4 em relação a biomassa inicial (F_0) (FIGURA 32). Este resultado mostrou que o

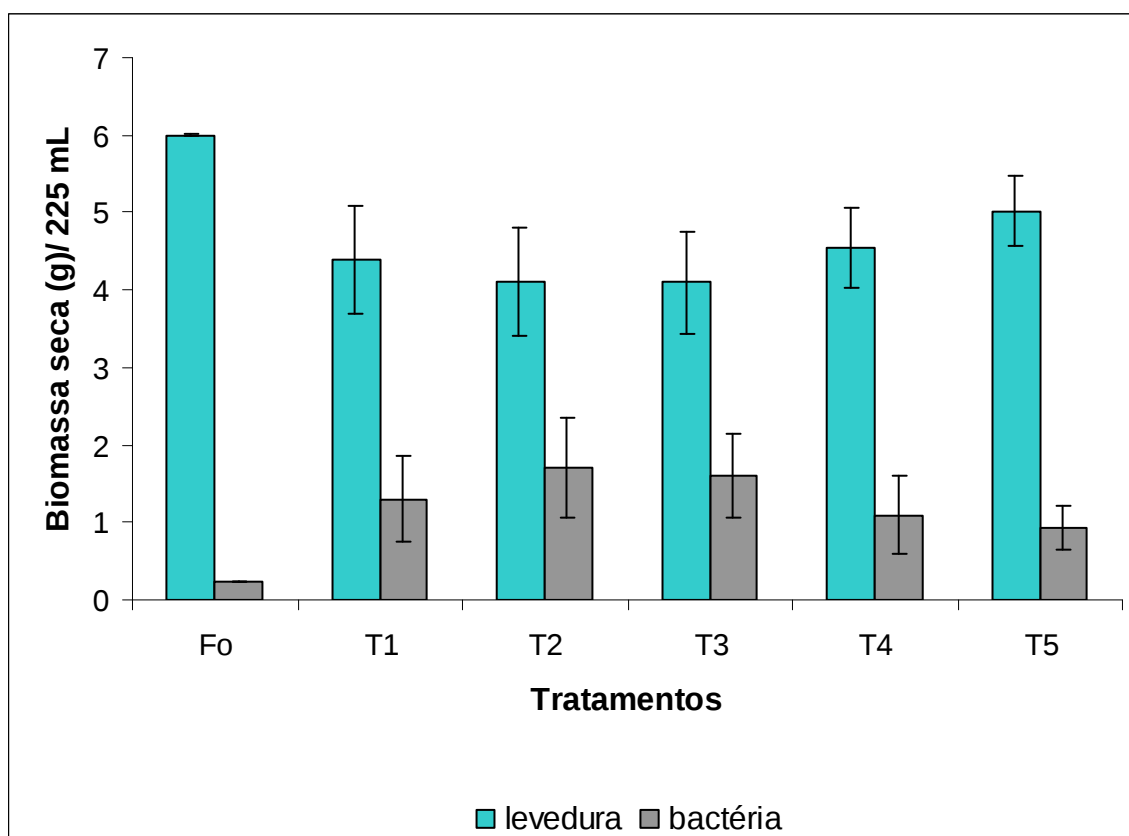


FIGURA 32: Biomassa seca média de *S. cerevisiae* PE-2 e *L. fermentum* CCT 1396 após fermentação, a 32° C, e tratamento ácido do fermento (pH 2,5).

Médias obtidas do 3º, 5º e 7º ciclos fermentativos.

Fo = biomassa seca inicial do processo fermentativo.

T1 (controle) = tratamento ácido ausente e mosto com pH 3,8.

T2 = tratamento ácido por 2h e mosto com pH 4,8.

T3 = tratamento ácido por 1h e mosto com pH 4,8.

T4 = tratamento ácido por 2h e mosto com pH 3,8.

T5 = tratamento ácido por 1h e mosto com pH 3,8.

T5 (pH do mosto igual a 3,8 e 1 h de tratamento ácido) foi o mais eficiente na formação de biomassa seca pela levedura, aumentando-a em torno de 22% (TUKEY, $p < 0,05$) quando esta é comparada com a do T2 e o T3, nos quais foram utilizados mostos com pH 4,8. Este resultado mostra, mais uma vez, que durante um alto grau de contaminação bacteriana é arriscado trabalhar com mostos de pHs mais elevados. OTENIO (1998) apresentou resultados semelhantes a estes, verificando em seus experimentos que a dorna fermentativa da levedura tratada com ácido sulfúrico apresentou uma concentração do fermento aproximadamente 16% maior do que da levedura não submetida ao tratamento.

A FIGURA 32 mostra, também, que existiu uma variação da formação de biomassa seca da bactéria em função dos diferentes tratamentos fermentativos; esta foi considerada significativa quando seus dados foram submetidos ao testes de Variância (Anova, $p = 0,0006$). Nos experimentos T5 e T4, em que se fez o tratamento ácido por 1 e 2 h do fermento, respectivamente, e utilizou-se o meio fermentativo com pH 3,8, a bactéria não apresentou um aumento significativo de sua biomassa em relação a sua concentração inicial (F_0). Entretanto, nos tratamentos T1 e principalmente nos T2 e T3, houve crescimento significativo deste contaminante. Isto mostrou que o tratamento ácido, associado ao pH 3,8 do mosto, teve influência na redução da contaminação bacteriana. É importante ressaltar que não existiu diferença significativa na produção de biomassa entre T1, T4 e T5, mostrando que o tratamento ácido não é tão vantajoso sobre a utilização do pH 3,8 para evitar o crescimento bacteriano em termos de biomassa seca.

Ao comparar a biomassa seca dos dois microrganismos (FIGURA 32), verificou-se que o maior crescimento médio da bactéria esteve relacionado à menor biomassa da levedura. Este resultado ocorreu porque a bactéria compete com a levedura pelos nutrientes do meio, desviando parte destes que seriam destinados ao fermento para a formação de sua biomassa e manutenção de seu metabolismo. Além disso, o *Lactobacillus* produz ácido lático, outros metabólitos tóxicos e causa a floculação que inibem o crescimento das leveduras (ALTERTHUM *et al.*, 1984; YOKOYA e OLIVANETO, 1991). A floculação nos tratamentos T2 e T3 foi visivelmente maior que nos

meios em que se utilizou pH 3,8 durante o processo fermentativo, inclusive no T1 onde não foi realizado tratamento ácido.

A TABELA 17 mostra as médias dos números de células de leveduras, bactérias e a relação numérica bactéria/ levedura após os diferentes tratamentos fermentativos. Após a análise estatística dos dados, verificou-se que houve uma tendência de aumento significativo da razão bactéria/levedura em relação ao início da fermentação entre os tratamentos (Anova, $p < 0,05$). T1 e principalmente T2 e T3 mostraram um aumento significativo (TUKEY, $p < 0,05$) desta razão em cerca de 600% quando comparado ao início da fermentação. T2 e T3 obtiveram relações bactéria/levedura em torno de 72% significativamente (TUKEY, $p < 0,05$) maiores que o T5. Entretanto, não houve diferença significativa entre T5 e T1, reforçando que o tratamento ácido em excesso nem sempre é necessário, desde que o pH do mosto não esteja elevado (em torno de 4,8) em condições de alta contaminação.

TABELA 17: Número total de células de *S. cerevisiae* PE-2 e de *L. fermentum* CCT 1396, e a relação entre o número de bactérias e o de leveduras após fermentação mista, a 32° C, e do tratamento com ácido sulfúrico do fermento (pH 2,5).

<i>Tratamentos</i>	Número de Leveduras x 10 ⁸ / mL		Número de Bactérias x 10 ⁹ / ML		Número de Bactérias/ Número de Leveduras	
	M*	DP**	M	DP	M	DP
Fo	8,0	1,0	0,30	0,1	0,38	0,01
T1	3,9	2,4	0,87	0,5	2,30	0,87
T2	3,8	2,0	0,95	0,4	2,73	1,00
T3	4,1	2,4	1,10	0,3	2,96	1,20
T4	5,7	3,0	1,04	0,2	1,97	0,94
T5	5,6	2,9	0,90	0,4	1,65	0,53

* M= médias obtidas do 3° ao 7° ciclo fermentativo. **DP = desvio padrão. **Fo** = número do microrganismo no início da fermentação; **T1** (controle) = tratamento ácido ausente e mosto com pH 3,8; **T2** = tratamento ácido por 2h e mosto com pH 4,8; **T3** = tratamento ácido por 1h e mosto com pH 4,8; **T4** = tratamento ácido por 2h e mosto com pH 3,8; **T5** = tratamento ácido por 1h e mosto com pH 3,8.

5.4.3. Acidez total expressa em ácido lático

Através da TABELA 18 (dados A) verifica-se que existiu interferência do pH 4,8 do mosto nos resultados da acidez láctica dos tratamentos T2 e T3, pois nestes

ocorreu maior contaminação bacteriana (quanto aos parâmetros: biomassa seca, UFC/mL, células bacterianas/mL e razão de bactérias/ leveduras) e mostrou menor acidez total (expressa em g de ácido láctico/ L). Esta interferência já foi discutida nos itens anteriores e ocorre porque a quantificação do ácido é resultante de um teste de titulação, onde o pH mais alto do mosto necessita de menos base para se atingir o pH 8,3, resultando em uma menor quantidade de ácido na amostra que uma outra com o pH menor. Dessa forma, foi necessário fazer a correção do vinho delevurado dos tratamentos T2 e T3 para pH 3,8 (igual aos dos tratamentos restantes) com HCL 5M para que houvesse uma padronização do pH entre os diferentes processos fermentativos.

Os dados **B** da TABELA 18 mostram que o ajuste do pH do vinho delevurado de T2 e T3 permitiu verificar maior acidez, coincidindo com as maiores médias de biomassas bacterianas, UFC de bactérias/ mL, células de bactérias/ mL e razão bactéria/ levedura, além das menores viabilidades celulares. A menor concentração média de ácido láctico foi obtida no tratamento T5, sendo esta significativamente menor que T1, T2 e T3 em 24, 37 e 36%, respectivamente. Quanto a este parâmetro, o tratamento ácido de 1h do fermento e o pH do mosto igual a 3,8 foram importantes, tendo em vista que o ácido láctico em excesso acaba se tornando tóxico para a levedura, além de desviar parte da glicose da rota de produção etanólica.

TABELA 18: Acidez total (expressa em ácido láctico) do vinho delevurado após a fermentação mista de *S. cerevisiae* PE-2 e de *L. fermentum* CCT 1396, a 32°C, e do tratamento com ácido sulfúrico (pH 2,5).

Tratamentos	g de ácido láctico/L^A		g de ácido láctico/L^B	
	M*	DP**	M	DP
T1	11,19	1,3	11,19	1,3
T2	7,70	2,7	13,51	2,0
T3	7,20	1,9	13,23	2,4
T4	9,30	2,2	9,30	2,2
T5	8,50	2,7	8,50	2,7

A= pH final do vinho delevurado não corrigido, **B** = correção dos pH final do vinho de T2 e T3 para pH 3,8 com HCL (5M). * M = médias obtidas do 3º ao 7º ciclo fermentativo.

DP** = desvio padrão. **T1** (controle) = tratamento ácido ausente e mosto com pH 3,8; **T2** = tratamento ácido por 2h e mosto com pH 4,8; **T3** = tratamento ácido por 1h e mosto com pH 4,8; **T4** = tratamento ácido por 2h e mosto com pH 3,8; **T5** = tratamento ácido por 1h e mosto com pH 3,8.

OLIVA-NETO e YOKOYA (1994) mostraram que em uma fermentação com contaminação de *L. fermentum* CCT 1407, 4,8g/ L de acidez total expressa em ácido láctico diminuiu em torno de 40% a viabilidade da levedura e 6g/ L reduziu o rendimento etanólico em 35%. No atual trabalho, 13g do ácido láctico/ L produzido por *L. fermentum* CCT 1396 causou uma diminuição próxima a 73% da viabilidade da levedura.

5.4.4. Atividade da Bomba de prótons

A FIGURA 33 mostra que o pico da atividade da Bomba de prótons da bactéria ocorreu a partir de 5 min, entretanto, este tempo marcou o final da atividade da levedura. Dessa forma, não houve problema em calcular a atividade da Bomba de

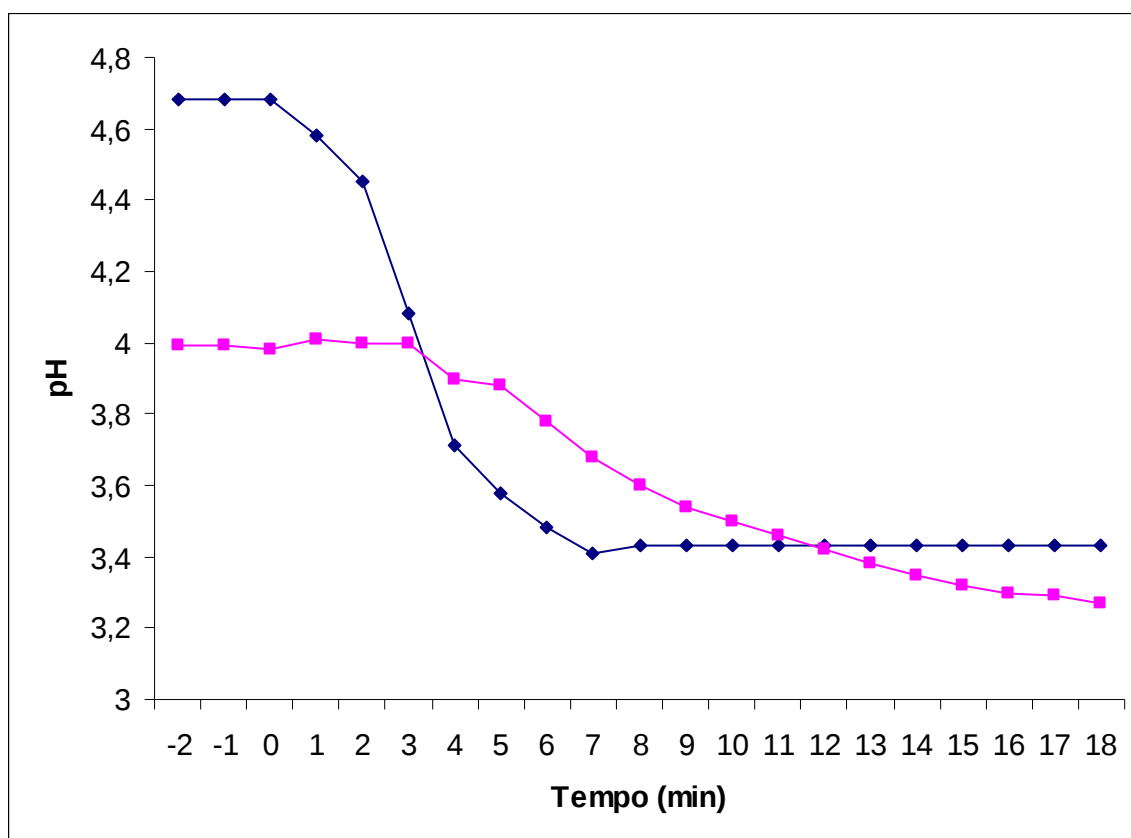


FIGURA 33: Acidificação do meio em função do tempo após a adição de glicose.

prótons da levedura em cultura mista, já que o pico de atividade desta ocorreu antes que a enzima da bactéria fosse ativada.

A FIGURA 34 mostra a atividade da Bomba de prótons das células de bactéria e levedura estudadas antes do início do processo fermentativo. Ao submeter os dados ao Teste t, verificou-se que a média da atividade da Bomba de prótons de *S. cerevisiae* PE-2 foi 278% ($p < 0,0001$) maior que a do *L. fermentum* CCT 1396, ou seja, houve maior atividade da enzima H^+ -ATPase de membrana no fungo.

A H^+ -ATPase de membrana é essencial para a estabilidade do potencial de membrana celular e manutenção do pH interno normal da célula (HARRIS *et al.*, 1994). Esta enzima gera ATP quando permite a entrada passiva de H^+ na célula e gasta energia no processo inverso, produzindo ADP+ Pi. Dessa forma, o resultado apresentado na FIGURA 34, demonstra fisiologicamente a desvantagem da bactéria frente ao pH mais ácido em relação à levedura. Esses dados sugerem que a levedura tem a enzima H^+ -ATPase bastante ativa e provavelmente em maior número do que o *Lactobacillus*, suportando dessa maneira, ambientes mais ácidos. O pH ótimo para o *L. fermentum* é de 5,5 a 5,9 (OLIVEIRA *et al.*, 1995), embora esta possa apresentar resistência sob pHs mais baixos. Muitas leveduras mantêm seu pH_i entre 6 e 7, na faixa de pH externo de 3,0 a 8,0 (SLAVIK e KOTYK, 1984).

Os diferentes tratamentos tiveram tendência de influência significativa (Anova, $p = 0,0001$) na atividade da Bomba de prótons da linhagem *S. cerevisiae* PE-2 (FIGURA 35). Como já citado, a ativação de H^+ -ATPase na membrana plasmática ocorre quando células de levedura são expostas a glicose (SERRANO, 1983; SOUZA *et al.*, 2001), etanol, acidificação intracelular, temperaturas supra-ótimas, abaixo de 40°C, presença de ácidos orgânicos e pH baixo (VIEGAS *et al.*, 1998), ou seja, em geral, respondendo ao estresse elevado.

A FIGURA 35 mostra que houve uma redução significativa (TUKEY, $p < 0,05$) da atividade da Bomba de prótons para todos os tratamentos quando comparada com a atividade inicial, exceto no 7º ciclo fermentativo do T2. Esta queda esteve relacionada, provavelmente, à exposição da levedura ao alto grau do estresse fermentativo que danificou o metabolismo da célula e diminuiu o número de H^+ -ATPase como citado por VIEGAS *et al.* (1995) e CARMELO *et al.* (1997). Através da

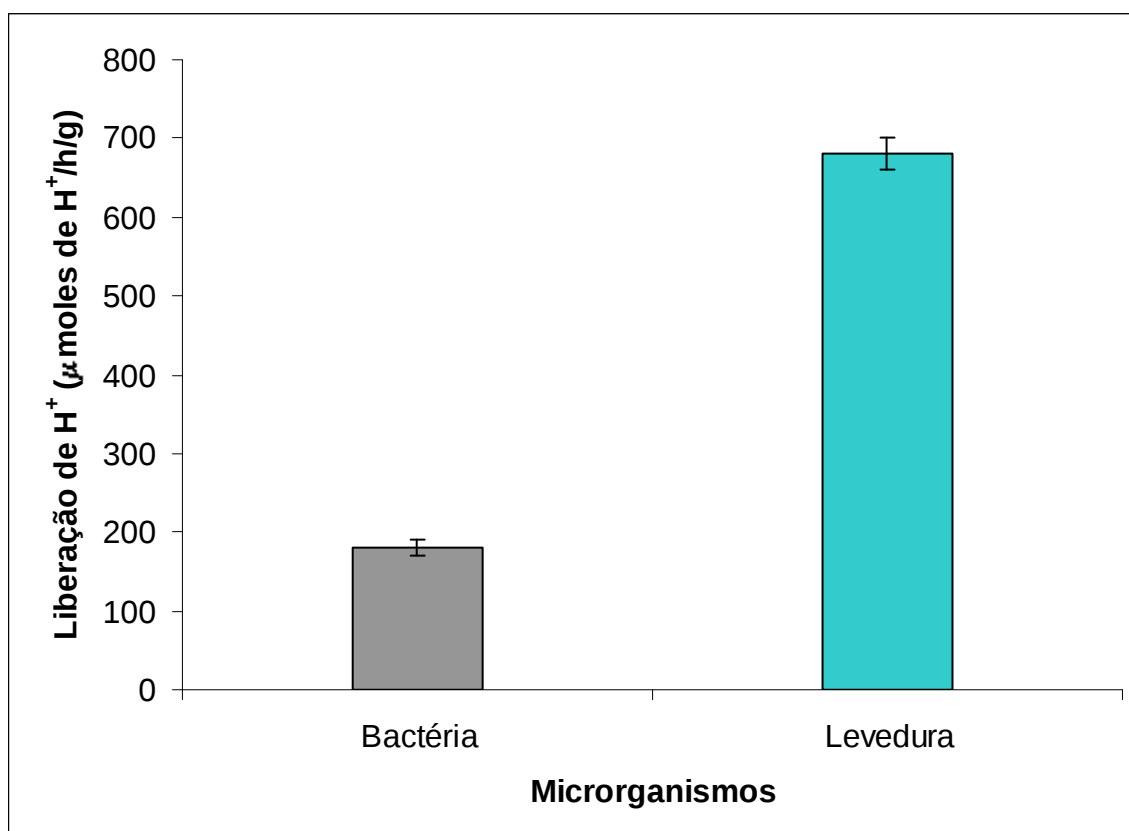


FIGURA 34: Atividade da Bomba de prótons das linhagens *S. cerevisiae* PE-2 e *L. Fermentum* CCT 1396 antes do início do processo fermentativo.

Bactéria: cultivada em pH 4,5.

Levedura: cultivada em pH 5,0.

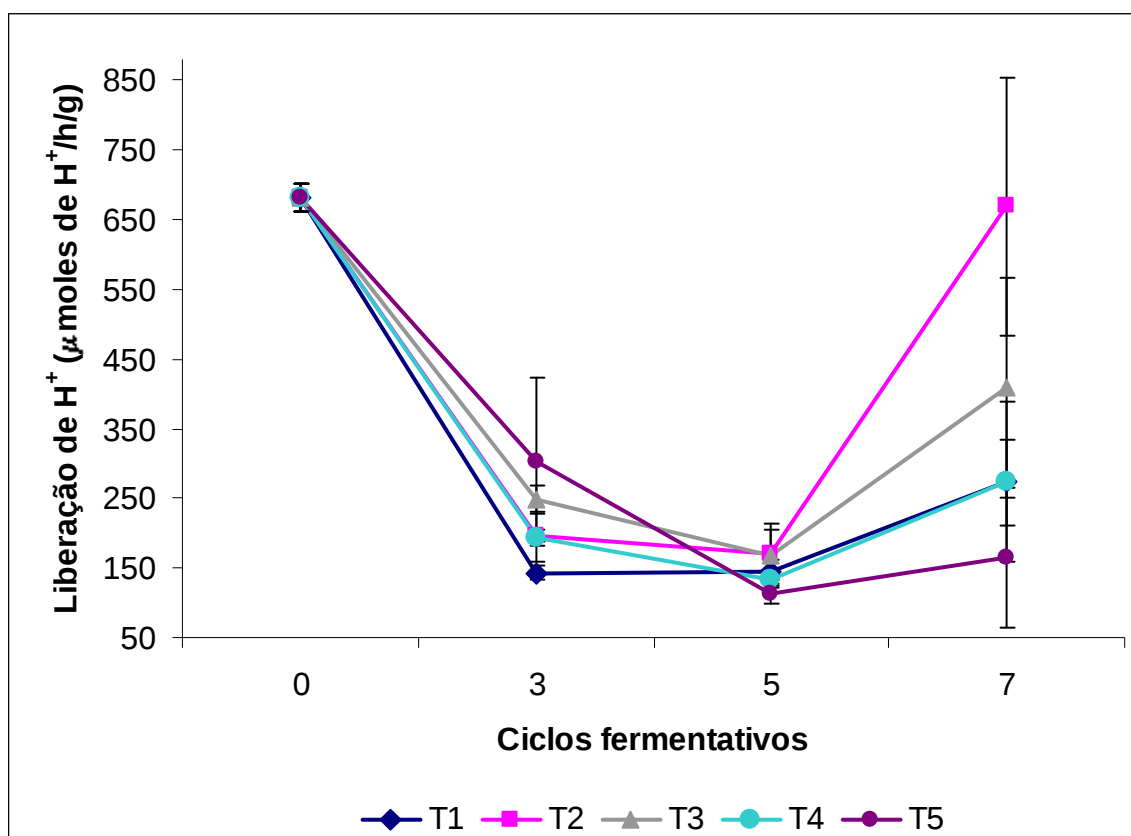


FIGURA 35: Atividade da Bomba de prótons da linhagem *S. cerevisiae* PE-2 durante a fermentação mista com *L. fermentum* CCT 1396, a 32° C, e tratamento ácido do fermento (pH 2,5).

T1 (controle) = tratamento ácido ausente e mosto com pH 3,8.

T2 = tratamento ácido por 2h e mosto com pH 4,8.

T3 = tratamento ácido por 1h e mosto com pH 4,8.

T4 = tratamento ácido por 2h e mosto com pH 3,8.

T5 = tratamento ácido por 1h e mosto com pH 3,8.

mesma FIGURA 35 é possível verificar que existiu uma tendência de aumento da atividade da Bomba de prótons dos diferentes tratamentos após o 5º ciclo fermentativo. Dessa maneira, provavelmente a levedura, sob grandes condições de estresse, dispôs de um tempo para se adaptar e aumentar a atividade da enzima H^+ -ATPase.

A maior ativação da Bomba de prótons foi observada no T2 (pH do mosto igual a 4,8 e tratamento ácido de 2h) após o 7º ciclo fermentativo, sendo esta significativa (TUKEY, $p < 0,05$) em relação aos demais tratamentos. Como no T2 foi encontrada a maior concentração de ácido láctico e o tratamento ácido feito 1h a mais que em T3, a atividade da Bomba de prótons sofreu maior estímulo por haver maior acidificação interna.

Comparando estes resultados com os das etapas anteriores desse trabalho, observou-se que existiu uma diferença no comportamento da atividade da Bomba de prótons na levedura. Isto é, nos mostos com estresses associados (sulfito alto, pH baixo, ácido láctico alto, sacarose alta e teor alcoólico mais elevado) e com baixa contaminação bacteriana (inferiores a 10^4 bactérias/ mL), o pH mais elevado do mosto fermentativo contribuiu para uma maior manutenção do potencial de membrana por *S. cerevisiae* PE-2 nos primeiros ciclos. Entretanto, a partir do 7º ciclo a atividade resultante do mosto de pH mais elevado tendeu a diminuir, e a do pH mais baixo subiu. Enquanto que nos mostos com alto grau de contaminação existiu a tendência de maior manutenção do potencial de membrana da linhagem PE-2 no T5 (pH 3,8 e tratamento ácido 1h) até o 3º ciclo fermentativo. O pH mais alto do mosto usado em T2 e T3 mostrou maior ativação de H^+ -ATPase após o 7º ciclo fermentativo. Isto pôde se explicar pelo maior estresse da linhagem PE-2 devido à elevada contaminação bacteriana e produção de ácido láctico em ambos tratamentos. É importante ressaltar que o trabalho exaustivo da referida enzima para manter o pH interno estável gera um grande gasto de ATP, podendo ser prejudicial para a fisiologia e metabolismo da célula da levedura em condições de fermentações estressantes, potencializando a porcentagem de células mortas como mostrado na TABELA 16.

5.4.5. Trealose

Existiu um aumento significativo (TUKEY, $p < 0,05$) da concentração de trealose pela levedura em todos os meios testados (FIGURA 36). A maior porcentagem deste carboidrato foi encontrada nas biomassas da levedura submetidas aos tratamentos T1, T4 e T5, nos quais existiu tendência de maior viabilidade celular. Este fato confirma, como nos itens anteriores, que a capacidade da levedura estocar trealose está relacionada a um melhor estado fisiológico em que esta se encontra, pois esta a protege contra os fatores de estresse do meio fermentativo.

Quanto a este parâmetro, mais uma vez, o tratamento ácido não teve significância estatística quando comparado ao processo fermentativo sem tratamento (T1). Assim, o pH do meio fermentativo igual a 3,8 proporcionou maiores estoques de trealose e tendência das maiores viabilidades e brotamentos celulares da levedura, em condições de alto nível de contaminação bacteriana, sem que houvesse necessidade do emprego de ácido sulfúrico.

5.4.6. Proteína residual

Após a análise estatística verificou-se que a concentração de proteína residual do vinho delevurado de *S. cerevisiae* PE-2 não sofreu influência dos diferentes tratamentos fermentativos (Anova, $p = 0,165$) (FIGURA 37).

Nos experimentos discutidos no item 5.2., nos quais foram realizados os tratamentos ácidos em leveduras submetidas a fermentações com diferentes estresses associados, mas com contaminação nula ou baixa, a concentração de proteína residual foi até 528% maior do que na fermentação com alto grau de contaminação. Isto pode indicar que a bactéria contaminante consumiu nitrogênio residual do meio, resultante de leveduras lisadas, e ou menor consumo de nitrogênio por este fungo. Segundo OLIVA-NETO e YOKOYA (1996), o cultivo puro de *L. fermentum* indicou aminoácidos como os principais nutrientes responsáveis pela estimulação do crescimen-

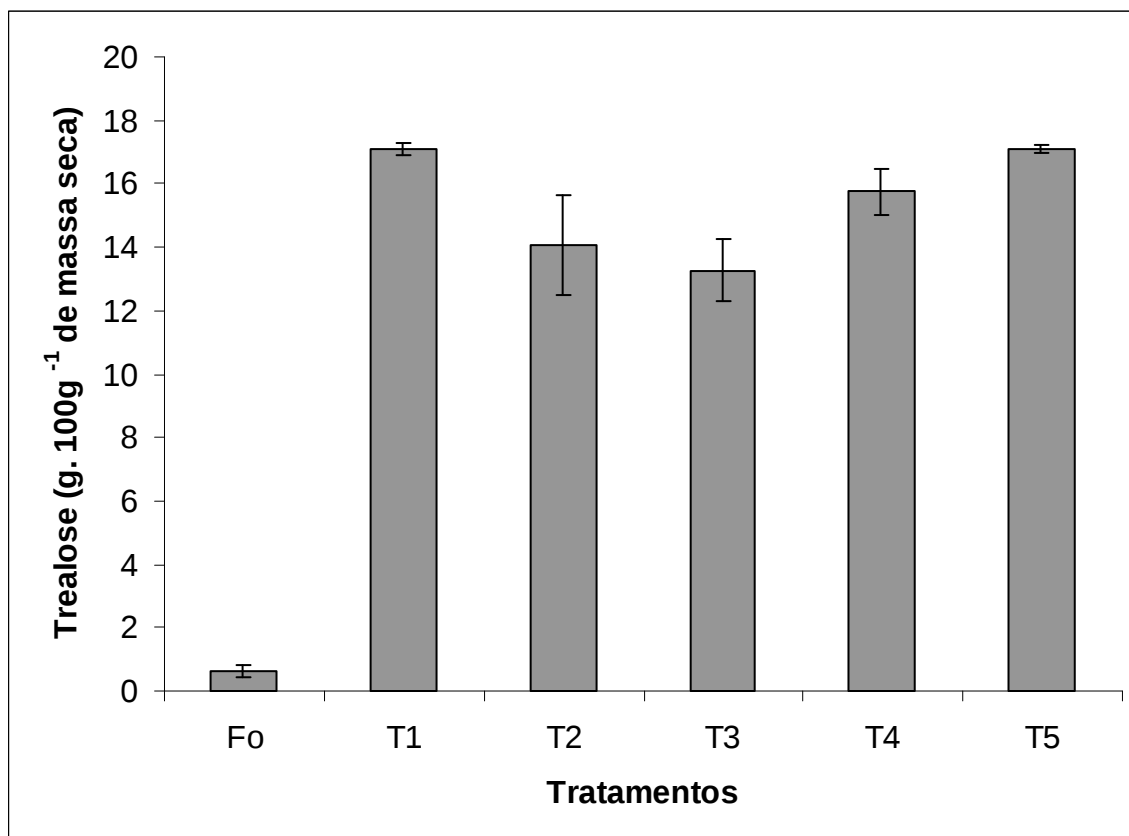


FIGURA 36: Formação de trealose pela linhagem *S. cerevisiae* PE-2 durante a fermentação mista com *L. fermentum* CCT 1396, a 32° C, e tratamento ácido do fermento (pH 2,5).

Médias obtidas do 7º ciclo fermentativo.

Fo = trealose antes do início da fermentação.

T1 (controle) = tratamento ácido ausente e mosto com pH 3,8.

T2 = tratamento ácido por 2h e mosto com pH 4,8.

T3 = tratamento ácido por 1h e mosto com pH 4,8.

T4 = tratamento ácido por 2h e mosto com pH 3,8.

T5 = tratamento ácido por 1h e mosto com pH 3,8.

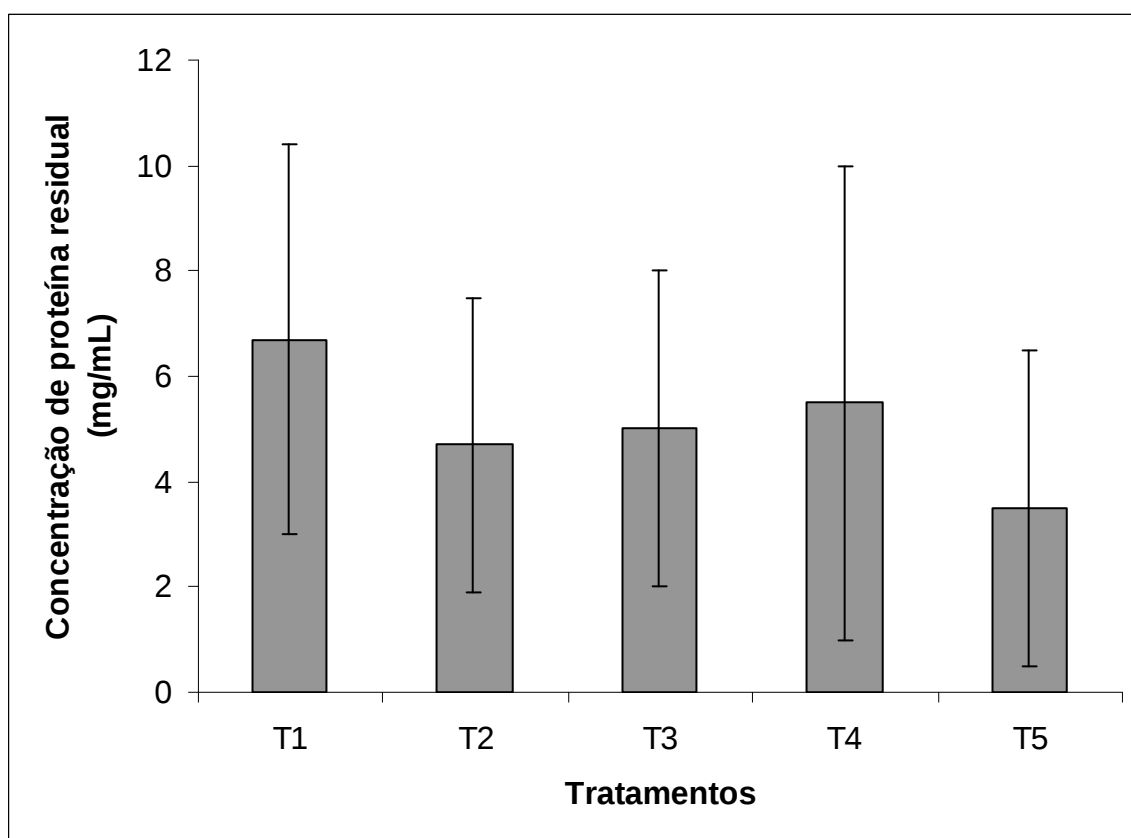


FIGURA 37: Proteína residual da fermentação de *S. cerevisiae* PE-2 e *L. fermentum* CCT 1396, a 32°C, com tratamento ácido do fermento (pH 2,5).

Médias obtidas do 3º ao 7º ciclo fermentativo.

T1 (controle) = tratamento ácido ausente e mosto com pH 3,8.

T2 = tratamento ácido por 2h e mosto com pH 4,8.

T3 = tratamento ácido por 1h e mosto com pH 4,8.

T4 = tratamento ácido por 2h e mosto com pH 3,8.

T5 = tratamento ácido por 1h e mosto com pH 3,8.

to bacteriano. O aumento da infecção bacteriana durante a fermentação alcoólica depende dos nutrientes liberados com a autólise das leveduras.

5.4.7. Determinação do açúcar residual, rendimento e produtividade etanólica

Após a análise estatística dos dados verificou-se que a maior quantidade de açúcar redutor residual total foi encontrada no T1, com diferença significativa (TUKEY, $p > 0,05$) para todos os demais tratamentos (FIGURA 38). Entre os T2, T3, T4 e T5 não existiu diferença estatística quanto a este parâmetro, mas houve uma nítida tendência do T5 apresentar a menor média de ARRT. Mesmo que em T1 tenha sido encontrado maior concentração de açúcar residual, as FIGURAS 40 e 41 mostram que este fator não interferiu na obtenção de rendimentos e produtividades etanólicos em relação aos de T4 e T5.

A FIGURA 39 mostra que existiu diferença estatística entre as médias dos rendimentos etanólicos pela linhagem PE-2 em função dos tratamentos fermentativos (Anova, $p = 0,001$). A maior média do rendimento etanólico foi obtida no T1, embora não tenha havido diferença estatística com os tratamentos T4 e T5. A menor média foi encontrada em T3 e em seguida em T2, mostrando que o pH do mosto fermentativo em condições de alta contaminação (acima de 10^8 células / mL) não deve estar em torno de 4,8, pois estimula ainda mais o crescimento bacteriano e aumenta a floculação. O pH 3,8 utilizado no meio fermentativo foi mais adequado para evitar a diminuição do rendimento etanólico que o tratamento ácido, já que no T1 (sem tratamento ácido), T4 (tratamento de 2h) e T5 (tratamento de 1h) não apresentaram diferença estatística quanto a este parâmetro. OTÊNIO (1998) mostrou que não existiu diferença significativa na obtenção de rendimento etanólico do fermento (da Usina de Bandeirantes / PR) tratado com ácido sulfúrico para o não tratado. Tal pesquisador trabalhou com pH do mosto igual ou menor que 4,0. CHERUBIN (2003) relatou que o tratamento ácido não foi eficiente no controle do crescimento bacteriano em fermentações mistas com *Lactobacillus fermentum* e *S. cerevisiae* PE-2 e M-26.

Segundo STUPIELLO E HORII (1981), o rendimento alcoólico em destilarias variam de 70 a 90%, dessa forma, o rendimento obtido neste trabalho foi

afetado pela alta contaminação bacteriana, chegando a uma diminuição de até 65% do desejado. AMORIM e OLIVEIRA (1982) constataram diminuição de 60% no rendimento de fermentações com valores de acidez entre 5 e 6 g/L. ALTERTHUM *et al.* (1984) verificaram quedas do rendimento etanólico variável de 14 a 90% do teórico quando a concentração bacteriana atingiu 10^8 e 10^9 células/ mL. OLIVA-NETO e YOKOYA (1994) mostraram uma redução do rendimento etanólico em cerca de 36% no decorrer dos 17 ciclos fermentativos com a contaminação bacteriana de $2,3 \times 10^9$ células/ mL.

Quando comparado os rendimentos das fermentações apresentadas nos itens anteriores a este, verifica-se que a contaminação bacteriana afetou mais a produção de etanol que os outros fatores de estresses testados. Este fato já era esperado pois as bactérias além de produzirem substâncias tóxicas para a levedura, diminuem o rendimento etanólico pois desviam parte da glicose para a produção de ácido lático e para sua biomassa, além de causarem a floculação.

Quanto ao parâmetro produtividade etanólica, a FIGURA 40 mostra que as maiores médias foram obtidas das fermentações com os tratamentos T1, T4 e T5, reafirmando que o tratamento ácido não foi tão importante para o processo fermentativo quanto o uso do pH 3,8 no mosto fermentativo.

Através dos parâmetros analisados neste item 5.4., foi possível verificar que o pH 3,8 mostrou uma maior proteção da levedura contra a contaminação bacteriana do que o tratamento com ácido sulfúrico nos seguintes parâmetros: viabilidade e brotamento da levedura, UFC de bactérias/ mL, relação número de bactérias/ levedura, trealose, rendimento e produtividade etanólicos. Em alguns parâmetros como a biomassa de levedura e da bactéria, proteína residual, açúcar residual e produção de ácido lático o T5 (pH 3,8 do mosto e tratamento ácido por 1 h) mostrou ser mais eficiente que o processo fermentativo em que não foi feito o tratamento ácido (T1). Ainda assim, analisando o custo e o benefício do tratamento ácido, este trabalho mostrou que o emprego de tal recurso de forma exacerbada nem sempre é a melhor opção. NUNES *et al.* (1991) afirmaram que o uso de ácido sulfúrico

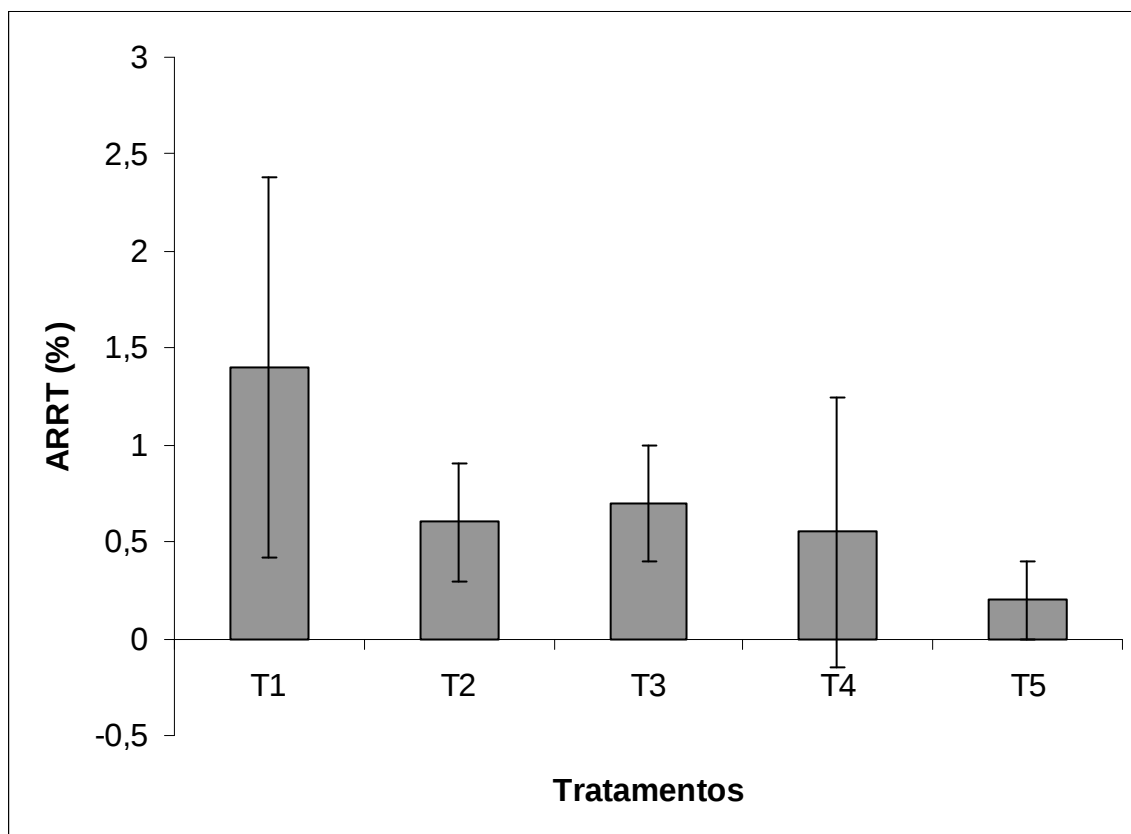


FIGURA 38: Açúcares redutores residuais totais após a fermentação mista com *S. cerevisiae* PE-2 e *L. fermentum* CCT 1396, a 32° C, e tratamento ácido do fermento (pH 2,5).

Médias obtidas do 3º ao 7º ciclo fermentativo.

T1 (controle) = tratamento ácido ausente e mosto com pH 3,8.

T2 = tratamento ácido por 2h e mosto com pH 4,8.

T3 = tratamento ácido por 1h e mosto com pH 4,8.

T4 = tratamento ácido por 2h e mosto com pH 3,8.

T5 = tratamento ácido por 1h e mosto com pH 3,8.

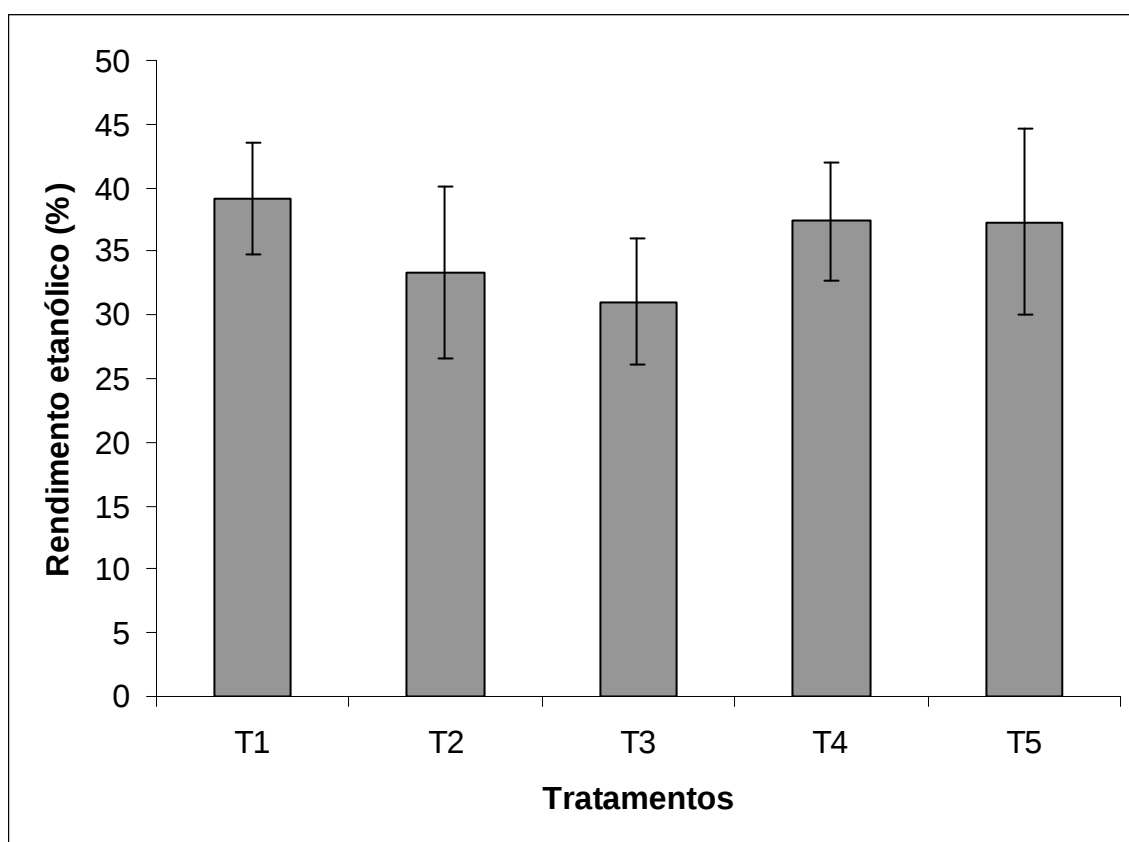


FIGURA 39: Rendimento etanólico após a fermentação mista de *S. cerevisiae* PE-2 e *L. fermentum* CCT 1396, a 32° C, e tratamento ácido do fermento (pH 2,5).

Médias obtidas do 3° ao 7° ciclo fermentativo.

T1 (controle) = tratamento ácido ausente e mosto com pH 3,8.

T2 = tratamento ácido por 2h e mosto com pH 4,8.

T3 = tratamento ácido por 1h e mosto com pH 4,8.

T4 = tratamento ácido por 2h e mosto com pH 3,8.

T5 = tratamento ácido por 1h e mosto com pH 3,8.

é inadequado porque não funciona como descontaminante, e muitas vezes o número de bactérias não justifica seu uso. Estes pesquisadores defendem que quando se otimiza os processos de controle da fermentação, a eliminação do tratamento ácido e de qualquer tratamento com bactericidas é viabilizada e o controle fica mais simples e direto. O ajuste do pH ideal do mosto de alimentação é determinado pela própria levedura.

Atualmente, as indústrias de etanol têm considerado aceitável uma população bacteriana no mosto cerca de 10^5 UFC/ mL, não sendo economicamente viável reduzir este nível (ALCADE *et al.*, 2003).

Segundo VICTOR (1996), tratamentos drásticos por ácido sulfúrico podem promover o rápido aumento da população de *D. bruxellensis* SIII' 234 (levedura contaminante) em fermentações industriais contínuas, especialmente as conduzidas por linhagens semelhantes a *S. uvarum* IZ1904.

OTÊNIO (1998) concluiu em sua pesquisa que não é necessário o uso sistemático de ácido sulfúrico no tratamento do fermento nas destilarias anexas.

É importante notar que, no atual trabalho, o pH 3,8 do mosto associado ao tratamento ácido apenas amenizou o problema da contaminação, exercendo um poder bacteriostático, entretanto, não eliminou a bactéria contaminante, causando ainda, consideráveis danos metabólicos à levedura. Dessa forma, é preciso haver um rigoroso controle nos processos fermentativos para que a contaminação bacteriana não atinja elevados níveis. NUNES *et al.* (1991) defendem a otimização do processo etanólico como um todo, na centrifugação, alimentação e multiplicação para evitar o tratamento ácido e até o uso de antibióticos.

A faixa de pH ótimo de *S. cerevisiae* PE-2 apresentada no item 5.3. deste trabalho, para a produtividade e rendimentos etanólicos, foi de 4,0 a 5,0 em mostos com fatores de estresse associados, mas com baixa ou até nula contaminação bacteriana. Como no atual item 5.4. foi verificado que o pH 4,8 (do mosto) estimulou de forma exacerbada o crescimento de *L. fermentum* CCT 1396, o pH 4,0 seria, provavelmente, mais apropriado para fermentações com diferentes fatores sinérgicos de estresse e com tendência de ter elevada contaminação bacteriana.

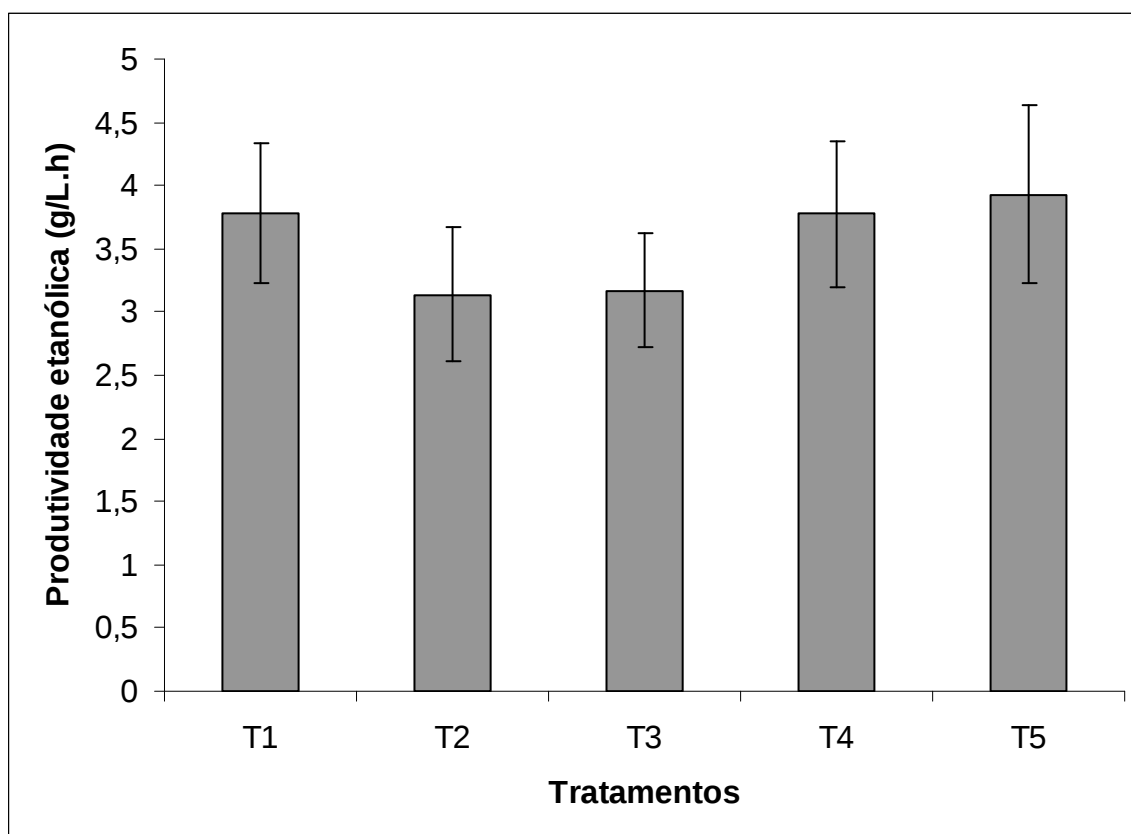


FIGURA 40: Produtividade etanólica após a fermentação mista de *S. cerevisiae* PE-2 e *L. fermentum* CCT 1396, a 32°C, e tratamento ácido do fermento (pH 2,5).

Médias obtidas do 3^o ao 7^o ciclo fermentativo.

T1 (controle) = tratamento ácido ausente e mosto com pH 3,8.

T2 = tratamento ácido por 2h e mosto com pH 4,8.

T3 = tratamento ácido por 1h e mosto com pH 4,8.

T4 = tratamento ácido por 2h e mosto com pH 3,8.

T5 = tratamento ácido por 1h e mosto com pH 3,8.

6- CONCLUSÕES

- 1- O estudo da fermentação alcoólica em processo de batelada alimentada (escala laboratorial) com *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e M-26 demonstrou que: dentre os fatores de estresse analisados (sulfito, pH, etanol e ácido lático), o pH 3,6 revelou ser o mais importante. O pH na faixa de 4,5 exerceu proteção do metabolismo da levedura com consequência positiva na viabilidade e brotamento celular, no rendimento e na produtividade etanólica.
- 2- O pH 4,5 foi eficiente ao amenizar o efeito tóxico do tratamento ácido (pH 2,0 por 45 min) ao metabolismo da linhagem de levedura PE-2, durante o processo fermentativo em mostos com fatores de estresse associados, mas sem contaminação significativa. Além disso, nestes experimentos, o pH muito baixo do tratamento com ácido sulfúrico diminuiu a viabilidade, brotamento celular, concentração de biomassa da levedura, rendimento e produtividade etanólicos; aumentou a proteína residual, açúcares residuais e a atividade de H^+ - ATPase.

- 3- A faixa de pH 4,0 a 5,0 do mosto fermentativo (com sulfito, ácido láctico e etanol) mostrou uma tendência para obtenção dos melhores rendimentos e produtividades etanólicos pela linhagem PE-2. Entretanto, o emprego do pH 4,5 e 5,0 possibilitou as melhores viabilidades, brotamentos celulares, estoque de trealose e melhor manutenção do potencial de membrana da levedura.
- 4- A presença de elevado índice de *Lactobacillus fermentum* CCT 1396 (10^8 cel./mL) na fermentação alcoólica é mais prejudicial ao rendimento e produtividade etanólicos, do que a associação de fatores de estresse no mosto fermentativo (sulfito, pH baixo, ácido láctico, concentração elevada de sacarose e etanol), pois a bactéria desvia glicose que seria convertida em etanol para a produção de metabólitos como o ácido láctico e para biomassa. Entretanto, em relação à viabilidade e brotamento, os fatores de estresse associados apresentaram-se quase tão prejudiciais quanto à presença do contaminante.
- 5- O emprego do pH 3,8 no mosto foi suficiente para exercer certa proteção no metabolismo da linhagem PE-2 da elevada contaminação bacteriana (acima de 10^8 cel./mL) nos seguintes parâmetros: viabilidade e brotamento celulares, UFC de bactérias/mL, relação numérica bactéria/levedura, estoque de trealose, rendimento e produtividade etanólicos. Nos parâmetros: biomassa de levedura e da bactéria, proteína residual, açúcar residual e acidez total (expressa em ácido láctico) o pH do mosto igual a 3,8, associado ao tratamento ácido (pH 2,5 por 1h), foi mais eficiente.
- 6- Foi possível inferir através desses resultados, que o pH ideal para fermentação alcoólica dependeu muito das condições do nível da contaminação bacteriana; quando baixa, o pH do mosto acima de 4,0 foi mais benéfico ao processo, do contrário, o pH 3,8 alternado com o tratamento ácido (pH 2,5 por 1 h) da suspensão de leveduras foi mais viável. Entretanto, é importante observar que o controle da elevada contaminação bacteriana (acima de 10^8 cel./mL) somente através do pH baixo não foi suficiente, pois este procedimento apenas exerceu um certo poder bacteriostático, não eliminando o contaminante do processo.

7-RESUMO

Neste trabalho duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e M-26 foram analisadas quanto à potencialidade de fermentação alcoólica sob condições de alto grau de estresse do mosto: 200 mg NaHSO₃/L, 6 g de ácido láctico /L, 9,5% (p:v) de etanol (conversão teórica) e pH 3,6. Foi verificado, ainda, o efeito do tratamento ácido (45min, pH 2,0) no metabolismo da linhagem PE-2 durante sua fermentação sob condições de alto grau de estresse. Desta forma, esta levedura foi submetida a valores de até 390 mg/L de metabissulfito de sódio, 6 g de ácido láctico /L, 9,5% (p:v) de etanol (conversão teórica) e pH 3,6 durante processos fermentativos. Investigou-se, também, o potencial de fermentação alcoólica desta levedura em um pool de pH (3,5; 4,0; 4,5 e 5,0) em mostos com: 200 mg/L de metabissulfito de sódio, 6 g de ácido láctico /L, 9,5% (p:v) de etanol (conversão teórica). Na última etapa deste trabalho foi estudado o efeito do contaminante *Lactobacillus fermentum* CCT 1396, do pH ácido no mosto e do tratamento ácido durante o processo fermentativo, no metabolismo de *S. cerevisiae* PE-2. Para tanto, esta levedura foi analisada quanto ao potencial de fermentação alcoólica em pHs 3,8 ou 4,8, e submetida ao tratamento com ácido sulfúrico até atingir pH 2,5 em tempos de 1 h ou 2h. O pH baixo (3,6) foi o fator de maior impacto para o aumento de estresse das duas linhagens de leveduras testadas durante os processos fermentativos. A

linhagem *S. cerevisiae* M-26 apresentou maior produção de ácidos orgânicos que a outra. As duas linhagens de levedura tiveram um desempenho semelhante durante os processos fermentativos, não tendo diferenças significativas quanto à viabilidade celular e rendimento etanólico. O pH 3,6 associado ao tratamento ácido (pH 2,0 por 45 min) foi o fator de maior impacto para o aumento de estresse metabólico da linhagem PE-2 durante os processos fermentativos. A faixa ótima de pH para a fermentação etanólica foi de 4,0 a 5,0, apresentando menor açúcares e proteína residuais e maiores rendimento e produtividade de etanol. Entretanto, o emprego do pH 5,0 resultou numa maior manutenção fisiológica da levedura, sendo responsável pela maior viabilidade celular, brotamento, concentração de trealose e manutenção do potencial de membrana. O pH 3,8 do mosto fermentativo foi mais eficiente que o pH 4,8 para o metabolismo da levedura em condições de alta contaminação bacteriana (acima de 10^8 cel./ mL), muitas vezes dispensando o emprego sistemático do tratamento ácido.

8-ABSTRACT

In this work two *Saccharomyces cerevisiae* strains, PE-2 and M-26, were analyzed for their alcoholic fermentation potential under must with high stress conditions: 200 mg NaHSO₃/L, 6g lactic acid/L, 9.5% (p/v) ethanol (theoretical conversion) and pH 3.6. The effect of the acid treatment (45min, pH 2.0) in the PE-2 strain metabolism was also verified during fermentation under high stress conditions. This yeast was submitted up to 390 mg/L sodium metabisulfite, 6g lactic acid/L, 9.5% (p/v) ethanol (theoretical conversion) and pH 3.6 during the fermentation processes. The alcoholic fermentation potential of this yeast was investigated in a pool of pHs (3.5; 4.0; 4.5 and 5.0) in sugar cane musts with 200 mg/L sodium metabisulfite, 6 g lactic acid /L and 9.5% (p/v) ethanol (theoretical conversion). In the last stage of this work the effect of the contaminant *Lactobacillus fermentum* CCT 1396, the acid pH in the must and the acid treatment during the fermentation process in the *S. cerevisiae* PE-2 metabolism were also studied. In these conditions, the yeast was analyzed for its alcoholic fermentation potential in pHs 3.8 or 4.8, and submitted to a sulphuric acid treatment in pH 2.5 for 1h or 2h. Low pH (3.6) was the major impact factor in the increase of stress in both yeast strains during the fermentation processes. *S. cerevisiae* M-26 strain

produced more organic acids than PE-2. Both yeast strains had similar performance during the fermentation processes. There were no significant differences on cellular viability and ethanol yield. The pH 3.6 associated with acid treatment (45 min, pH 2,0) was the major impact factor for the increase of metabolic stress in PE-2 strain during the fermentation processes. The optimum pH zone for ethanol fermentation ranged from 4.0 to 5.0, with less residual sugar, residual protein and more ethanol yield and productivity. However, the use of pH 5.0 resulted in a better physiologic maintenance of the yeast, which was responsible for the bigger cellular viability, budding, trehalose concentration and maintenance of membrane potential. In conditions of high bacterial contamination (above 10^8 cel./mL) fermentative must with pH 3.8 with sporadic acid treatment was more efficient than pH 4,8 for yeast metabolism.

9-LITERATURA CITADA

ABUD, C.L. Avaliação de uma população de células de *Saccharomyces cerevisiae* submetida a processos fermentativos em condições de temperaturas elevadas. Dissertação (Mestrado). I.Q. UNESP-Araraquara, 1997.

ALCARDE, A.R.; BASSO, L.C. Efeito da trealose na manutenção da viabilidade de células de leveduras desidratadas por liofilização. *Scien. Agríc.*, v.54, n.3, p. 189-194, 1997.

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

ALEXANDRE, H.; MATHIEU, B; CHARPENTIER, C. Alteration in membrane fluidity and lipid composition, and modulation of H⁺-ATPase activity in *Saccharomyces cerevisiae* caused by decanoic acid. *Microbiol.*, v. 142, p. 469-475, 1996.

ALEXANDRE, H.; ANSANAY-GALEOTE, V.; DEQUIN, S.; BLONDIN, B. (2001) *FEBS Lett.* 498, 98-103. In MARTINI, S.; RICCI, M.; BONECHI, C.; TRABALZINI, L. E; SANTUCCI, A.; ROSSI, C. In vivo C-CMR and modeling study of metabolic yield response to ethanol stress in a wild-type strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, v. 564, p.63-68, 2004.

ALMEIDA, J.R. Álcool e destilaria. Piracicaba, Nathanael dos Santos. Mineogr. v. 5, p. 55-85, 1940.

ALTERTHUM, F., CRUZ, M.R.M, VAIRO, M.L.R.e GAMBASSI, D.M. Efeitos de microorganismos contaminantes da fermentação alcoólica nas microdestilarias. *STAB*, v.3, n.1, p. 42-49,1984.

ALVES, D.M.G. Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica. Tese (Doutorado). ESALQ. Piracicaba, 1994, pgs.199.

ALVES da SILVA, E. F. Fermentação etanólica: influência do ácido sulfúrico sobre a viabilidade da levedura de processo e bactérias e leveduras contaminantes. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências, Unesp, Rio Claro, 1993, pgs. 134.

AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J. Infecção, problema sério na produção de álcool. *Anais do Segundo Congresso Nacional da Sociedade de Técnicos Açucareiros do Brasil*, v.4, p. 158-168, 1982.

ANACLETO, J.; van UDEN, N. Kinectics and activation energetics of death in *Saccharomyces cerevisiae* induced by sulphor dioxide. *Biotech. Bioeng.*, v.34, p. 2477-2486, 1982.

ANDREASON, A.A.; STIER, T.J.B. Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae* unsaturated fatty acid requirement for growth in defined medium. *J. Cell. Comp. Physiol.*, v.43, p. 271-281, 1954.

AOAC - *Official Methods of Analysis*. 12^o Ed. Washington, D.C., Association of Official Analytical Chemists, 1975.

BAFRNCOVÁ, P.; SMOGROVICOVÁ, D.; SLÁVIKOVÁ, I; PÁTKOVÁ, J; DÖMÉNY, Z. Improvement of very high gravity ethanol fermentation by media supplementation using *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.*, v. 21, p. 337-341, 1999.

BASSO, L.C. 1991. In: ALVES, D.M.G. Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica. Tese (Doutorado). ESALQ. Piracicaba, 1994, pgs.199.

BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G.; AMORIN, H. V. The antibacterial action of succinic acid produced by yeast during fermentation. *Rev. de Microbiol.*, v.28, sup.1, p.77-82, 1997.

BAYROCK, D.P.; INGLEDEW, W.M. Ethanol production in multistage continuous, single stage continuous, *Lactobacillus*-contaminated continuous, and batch fermentations. *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, v.21, p. 83-88, 2005.

BEAUVOIT, B.; RIGOLET, M.; RAFFARD, G.; CANIONI, P.; GUÉRIN, B. Differential sensitivity of the cellular compartments of *Saccharomyces cerevisiae* to protonophoric uncoupler under fermentative and respiratory energy supply. *Biochem.*, v.30, p. 11212-11220, 1991.

BEAVEN, M.J.; CHARPENTIER, C.; ROSE, A.H. Production and tolerance of ethanol in regulation to phospholipid fatty-acyl composition in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 451. *J. Gen. Microbiol.*, v.128, p.1447-1455, 1982.

BECHER DOS PASSOS, J.B.; VANHALEWYN, M.; BRANDÃO, R.L.; CASTRO, I.M.; NICOLI, J.R.; THEVELEIN, J. Glucose-induced activation of plasma membrane H^+ -ATPase in mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* affected in cAMP metabolism, cAMP-dependent protein phosphorylation and initiation of glycolysis. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1136, p.57-67.1992.

BENITO, B.; PORTILLO, F.; LAGUNAS, R. *In vivo* activation of the plasma membrane ATPase during nitrogen starvation. Identification of the regulatory domain that controls activation. *FEBS Lett.*, v.300, p. 271-274, 1992.

BISSON, L.; BUTZKE, C.E. Diagnosis and rectification of stuck and sluggish fermentation. *Am. J. Enol Vitic*, v.51, p.168-177, 2000.

BLANPAIN, J.P.; RONJAT, M.; SUPPLY, P.; DUFOUR, J.P.; GOFFEAU, A.; DUPONT, Y. The yeast plasma membrane H^+ -ATPase. *J. Biolog. Chem.*, v.267, n.6, p. 3735-3740, 1992.

BOVI, R.; MARQUES, M.O. O tratamento ácido na fermentação alcoólica. *Álc. e Açúc.*, v.3, n.9, p.10-13, 1982.

BRECHOT, P.; CROSON, M. ; MATSURA, S. Fermentation and respiration of yeasts in presence of sulphur dioxide. *Ant. van Leeuw.*, v.35, p. 21-22, 1969.

BROWN, A. Fermentation- a practical approach. In: Abud, C.L. Avaliação de uma população de células de *Saccharomyces cerevisiae* submetida a processos fermentativos em condições de temperaturas elevadas. Dissertação (Mestrado). I.Q. UNESP-Araraquara, 1997.

BRUL, S.; COOTE, P. Preservative agents in food: mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int. Food Microbiol.*, v.174, p.125-128, 1999.

BUTTKE, T.M.; PYLE, A.C. Effects on unsaturated fatty acid deprivation on neutral lipid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, v.152, p.747-756, 1982.

BUTTKE, T.M.; JONES, S.D.; BLOCH, K. Effect of sterol side chains on growth and membrane fatty acid composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, v.144, p. 124-130, 1980.

CARMELO, V.; SANTOS, H.; SÁ-CORREIA, I. Effect of extracellular acidification on the activity of plasma membrane ATPase and on the cytosolic and vacuolar pH of *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioch. Biophys. Acta*, v.1325, p. 63-70, 1997.

CARR, J.G.; PATRICIA, A.D.; SPARKS, A.H. The toxicity of sulphur dioxide towards certain lactic acid bacteria from fermented apple juice. *J. Appl. Bacteriol.*, v.40, n.2, p. 201-212, 1976.

CARTWRIGHT, C.P.; ROSE, A.H.; CALDERBANK, J.; KEENAN, M.H.J. (1989) Solute Transport. In: The Yeasts. Ed. ROSE, A.H., Academic Press, London, v.3, p. 5-56.

CARVALHO, R.S. Interações entre leveduras e bactérias durante a fermentação alcoólica. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. 2001, pgs. 74p.

CASEY, G.P.; INGLEDEW, W.M. Ethanol tolerance in yeasts. *CRC Crit. Rev. Microb.*, v.13, p. 219-281, 1976.

CASEY, G.P.; MAGNUS, C.A.; INGLEDEW, W.M. High-growth brewing: effect of nutrition on yeast composition, fermentation ability, and alcohol production. *Appl. Env. Microbiol.*, v.48, n.3, p. 639-646, 1984.

CASSIO, F; LEÃO, C.; van UDEN, N. Transport of lactate and other short-chain monocarboxylates in the yeast *Saccharomyces*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.53, n.3, p. 509-513, 1987.

CHAMBEL, A.; VIEGAS; C.A.; SÁ-CORREIA, I. Effect of cinnamic acid on the growth and on plasma membrane H^+ -ATPase activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Internat. J. Food Microb.*, v. 50, p. 173-179, 1999.

CHANG, A; SLAYMAN, C.W. Maturation of the yeast plasma membrane $[H^+]$ ATPase involves phosphorylation during intracellular transport. *J. Cell Biol.*, v.115, p.289-295, 1991.

CHAPMAN, C.; BARTLEY, W. The kinetics changes in yeast under conditions that cause the loss of mitochondria. *Bioch. J.*, v.107, p. 455-465, 1968.

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

CHIN, J.H.; GOLDSTEIN, D.B. Cholesterol blocks the disordering effects of ethanol in biomembranes. *Lip.*, v.19, p.929-935, 1984.

CONWAY, E.J.; BRADY, T.G. Biological production of acid and alkali, 1950. In: ALVES, D.M.G., 1994.

COOTE, N.; KIRSOP, B.H. Factors responsible for the decrease in pH during beer fermentations. *J. Inst. Brew.*, v.82, p.149-156, 1976.

CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; CHAPPMAN, D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms. The role of trehalose. *Scien.*, v. 233, 701-3, 1984.

CRUZ , M.R.L., VAIRO, M.L., GAMBASSI, D.M. Influência da pinicilina v-ácida no controle das infecções bacterianas na fermentação alcoólica. *Ver. Microb.*, v.16, p.138-142, 1985.

CYSEWSKI, G.R. e WILKIE, C.W. Process design and economic studies of fermentation methods for the production of ethanol. *Biotechnol. and Bioeng.* v. 20, p. 1421-1430, 1978.

DAESCHEL, M.A.; FLEMING, H.P.; MC FELTERS, R. F. Mixed culture fermentation of cucumber juice with *Lactobacillus plantarum* and yeasts. *J. Food Scien.*, v.53, n.3, p. 863-864, 1988.

D' AMORE, T.; CUMPLEN, R.; STEWART, G.G. The involvement of trehalose in yeast stress tolerance. *J. Ind. Microbiol.*, v.7, p. 191-196, 1991.

DOMBEK, K.M.; INGRAM, L.O. Magnesium limitation and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation. *Appl. Env. Microbiol.*, v. 52, p. 471-481, 1986.

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

ERASO, P; GANCEDO, C. Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. *FEBS Lett.*, v. 224, n.1, p.187-192, 1987.

FERNANDES, AR.; PEIXOTO, F.P; SÁ-CORREIA, I. Activation of H⁺-ATPase in the plasma membrane of cells of *Saccharomyces cerevisiae* grown under mild copper stress. *Arch. Microbiol.*, v.171, p.6-12, 1998.

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

GALLO, C.R; CANHOS, V.P. Efeito do tratamento ácido no fermento sobre a microbiota bacteriana contaminante da fermentação alcoólica. *Stab: Açúc. Álc. Subp.*, Piracicaba, v.9, n. 6, p. 35-37.1991.

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

GIBBONS, W.R; WESTBY, C.A. Effects of sodium meta bisulfite on diffusion fermentation of fodder beets fuel ethanol production. *Biotechn. and Bioeng.*, v.30, p. 906-916, 1987.

GHOOSE, T.K.; TYAGI, R.D. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate: batch versus continuous systems. *Biotech. Bioeng.*, v.21, p. 1387-1400, 1979.

GOMES, E. Efeito do tratamento ácido da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação alcoólica. (Dissertação-Mestrado- Escola Superior de Agricultura “ Luiz de Queiroz” USP). Piracicaba, 1988, pgs.206.

GUERRA, E.J.; ANGELIS, D.F. Flocculação da levedura induzida por bactérias na fermentação etanólica: I. método de detecção preventiva e estudos para o controle. *Stab: Açúc. Álc. Subp.*, Piracicaba, v. 16, n.6, p.25-27. 1998.

GUIJARRO, G.; LAGUNAS, R. *J. Bacteriol.* In: CARTWRIGHT, C.P.; ROSE, A.H.; CALDERBANK, J.; KEENAN, M.H.J. (1989) Solute Transport. In: The Yeasts. Ed. ROSE, A.H., Academic Press, London, v.3, p. 5-56.

GUTIERREZ, L.E. Efeito da adição de sulfito sobre a produção de álcoois superiores durante a fermentação alcoólica. *Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"*, Piracicaba, v.45, n.2, p. 359-368, 1988.

HALLSWORTH, J.E. Ethanol-induced water stress in Yeast. *J. Ferm. Bioeng.* v. 85, n.2, p. 125-137, 1998.

HALM, M.; LILLIE, A.; SORENSEN, A. K.; JAKOBSEN, M. Microbiological and aromatic characteristics of fermented maize dough for 'Kenkey' production in Ghana. *Int. J. Food Microbiol.*, v.19, p.135-143, 1993.

HALM, M.; HORNBAEK, T.; ARNEBORG, N.; SEFA-DEDEH, S.; JESPERSEN, L. Lactic acid tolerance determined by measurement of intracellular pH of single cells of *Candida krusei* and *Saccharomyces cerevisiae* isolated from fermented maize dough. *Int. J. Food Microbiol.*, v.94, n.1, p.97-103, 2004.

HARADA, K.; HIGUCHI, R.; UTSUMI, I. Studies on sorbic acid, part 4. Inhibition of the respiration in yeast, 1968. In WARTH, A. D. Resistance of yeast species to benzoic and sobic acids and to sulfur dioxide. *J. Food Protect.*, v. 48, n. 7, p. 564-569, 1985.

HARRIS, S.L.; NA, S.; ZHU, X.; SETO-YOUNG, D.; PERLIN, D.S.; TEEM, J.H.; HARBER, J.E. Dominant lethal mutations in the plasma membrane H⁺-ATPase gene of *S. cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Scien. USA.*, v.91, p.10531-10535.1994.

HOLYOAK, C.D.; STRAFORD, M; McMULLIN, Z; COLE, M.B.; CRIMMINS, K.; BROEN, A.J.P.; COOTE, P. Activity of the plasma membrane H⁺- ATPase and optimal glycolytic flux are required for rapid adaptation and growth in the presence of the weak acid preservative sorbic acid. *App. Environ. Microbiol.*, v. 62, p. 3158-3164, 1996.

HOTTINGER, T.; SCHUTZ, P.;WIEMKEN, A. Heat-induced accumulation and futile cycling of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol.*, v.169, n.12, p.5518-5522, 1987.

HYNES, S.H.; KJARSGAARD, D.M.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. Use of virginiamycin to control the growth of lactic acid bacteria during alcohol fermentation. *J. Ind. Microbiol. Biotech.*, v. 18, p. 284-291, 1997.

INGLEDEW, W.M. Continuous fermentation in the fuel alcohol industry: how does the technology affect yeast. 2003. In: BAYROCK, D.P. E INGLEDEW, W.M. Ethanol production in multistage continuous, single stage continuous, *Lactobacillus*-contaminated continuous, and batch fermentations. *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, v.21, p. 83-88, 2005.

INGRAM, L.O. Adaptation of membrane lipids to alcohols. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v. 35B, p. 235-238, 1985.

JONES, R.P.; PAMMENT, N.; GREENFIELD, P.F. Alcohol fermentation by yeasts: The effect of environmental and other variables. *Proc. Biochemist.*, v. 16, p.42-49, 1981.

KANDLER, O.; WEISS, N. Regular nonsporing Gram positive Rods. In: SNEATH et al. *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore. Williams e Wilkens, v.2, p. 1208-1234, 1986.

LALUCE, C.; PALMIERI, M.C.; CRUZ, C.L. Growth and fermentation characteristics of new selected strains of *Saccharomyces* at high temperatures and high cell densities. *Biotechnol. Bioeng.*, v.37, p. 528-536, 1990.

LAFON-LAFOURCADE, S.; GENEIX, C.; RIBEREAU-GAYON, P. Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeasts and their elimination by yeasts ghosts. *Appl. Env. Microbiol.* v. 47, n.6, p. 1246-1249, 1984.

LEÃO, C.; van UDEN, N. Effects of ethanol and other alkanols on the glucose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 24, p. 2601-2604, 1982.

LEILOR, L.F.; CABID, E. *J. Am. Chem. Soc.* In: PANEK, A.D. Storage carbohydrates. The Yeasts, Ed. ROSE, A.H. e HARRISON, J.S. Academic Press, v.4., p.655-678, 1991.

LEITÃO, M.F.F.; HAGLER, L. C. S. M; HAGLER, A. N.; MENEZES, T.,J.,B. Tratado de Microbiologia. Editores: ROITMAN, I., TRAVASSOS, L.R, AZEVEDO, J.L.São Paulo:Manole. v.1, 1988, pgs133.

LILLIE S.H.; PRINGLE, J.R. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* responses to nutrient limitation. *J. Bacteriol.*, v.143, p. 1384-1394, 1980.

LOUREIRO-DIAS, M.C.; PEINADO, J.M. Effect of ethanol na other alkanols on the maltose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech. Lett.*, v.4, p.721-724, 1982.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, A. L. E; FARR, A.N.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biolog. Chem.*, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUDWIG, K.M. Produção de carboidratase fúngica visando a desfloculação de células de *Saccharomyces cerevisiae* floculadas por *Lactobacillus fermentum*. Tese (Doutorado) apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, campus de Rio Claro, 2005, pgs.138.

LUDWIG, K.M.; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS, D.F. Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* Campinas, v.21, n.1, p.63-68. 2001.

MACKENZIE, K.F.; SINGH, K.K.; BROWN, A.D. Water stress plating hypersensitivity of yeasts: protective role of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, v. 134, n. 6, p. 1661-1666, 1988.

MAIER, K.; HINZE, H.; LEUSCHEL, L. Mechanism of sulfite action on the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioch. Bioph. Acta*, v. 848, p. 120-130, 1986.

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

MALACRINÒ, P.; TOSI, E.; GARAMIA, G.; PRISCO, R.; ZAPPAROLI, G. The vinification of partially dried grapes: a comparative fermentation study of *Saccharomyces cerevisiae* strains under high stress. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 40, p. 466-472, 2005.

MARTINI, S.; RICCI, M.; BONECHI, C.; TRABALZINI, L.; SANTUCCI, A. E; ROSSI, C. In vivo C-CMR and modeling study of metabolic yield response to ethanol stress in a wild-type strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* v. 564, p. 63-68. 2004.

MILLAR, D.; GRAFFITHS-SMITH, U.; ALGAR, E.; SCOPES, R. Activity and stability of glycolytic enzymes in the presence of ethanol. *Biotechnol. Lett.*, v.4, p. 601-605, 1982.

NARENDRANATH, N.V.; THOMAS, K.C; INGLEDEW, W.M. Effects of acetic acid and lactic acid on growth of *Saccharomyces cerevisiae* in minimal medium. *J. Ind. Microbiol. Biotech.*, v.26, p.171-177, 2001.

NELSON, N.A. Photometric Adaptation of the Somogyi Method for the Determination of Glucose. *J. Biolog. Chem.*, v. 153, p. 375-380, 1944.

NEVES, L.B. Tecnologia da fabricação do álcool. *Ver. Bras. Química*, v:3, p. 89-134, 1938.

NGANG, J.J.E.; LETOURNEAU, F.; VILLA, P. Alcoholic fermentation of beet molasses: effects of lactic acid on yeast fermentation parameters. *Appl. Microb. Biotechnol.*, v.31, p. 125-128, 1989.

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

NUNES, M.A.; SOUTO, A; ALVES DINIS, N.C.; QUEIROZ, R.M. de; VIEIRA DE MEDEIROS, L.N.. BRITO DE OLIVEIRA, J.P. Processo de eliminação do ácido sulfúrico e outros bactericidas do sistema de fermentação alcoólica Melle-Boinot. Álcool não corrosivo. *Álc. Açúc.*, São Paulo, v.4, n.22, p39-50, 1991.

OLIVA-NETO, P. Influência da contaminação por bactérias lácticas na fermentação alcoólica pelo processo de batelada alimentada. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Engenharia de Alimentos- Unicamp- Campinas, 1990, pgs.190.

OLIVA-NETO, P. Estudo de diferentes fatores que influenciam o crescimento da população bacteriana contaminante da fermentação alcoólica por leveduras. Tese (Doutorado)-Faculdade de Engenharia de Alimentos- Unicamp- Campinas, 1995, pgs.112.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Evaluation of bacterial contamination in fed-batch alcoholic fermentation process. *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, v.10, p.697-699, 1994.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Influência do extrato de levedura na estabilidade da fermentação alcoólica contaminada por *Lactobacillus fermentum*. *Cienc.Tecnol.Aliment.*, v.16, n. 2, p.170-174. 1996.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Effects of nutritional factors on growth of *Lactobacillus fermentum* mixed with *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation. *Ver. Microbiol*, v.28, p.25-31, 1997.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Effect of 3,4,4'-trichlorocarbanilide on growth of lactic acid bacteria contaminants in alcoholic fermentation. *Biores. Technol.*, v.63, p.17-21, 1998.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria from the alcohol industry to several antimicrobial compounds. *Braz. J. Microbiol.*, v.32, p. 10-14, 2001.

OLIVA-NETO, P.; FERREIRA M. A.; YOKOYA, F. Screening for yeast with antibacterial properties from an ethanol distillery. *Bioresc. Technol.* v. 92, p. 1-6. 2004.

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. *Álc. Açúc*, v.15, n.80, p.32-35,1995.

OLIVEIRA-FREGUGLIA, R.M. e HORII, J. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* em cultura mista com *Lactobacillus fermentum*. *Scien. Agric.* v. 55, n.3, Piracicaba. 1998.

OTÊNIO, M.H. Avaliação comparativa do efeito da retirada do tratamento ácido com ácido sulfúrico no fermento durante os reciclos, na Usina Bandeirantes, PR, na rotina industrial da Destilaria Anexa. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista. 1998, pgs. 69.

PANEK, A.D. Trehalose synthesis during starvation of baker's yeast. *Eur. J. App. Microb.*, v.2, p. 39-46, 1975a.

PANEK, A.D. Storage carbohydrates. The Yeasts, Ed. ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. Academic Press, v.4., p.655-678, 1991.

PANEK, A.C.; MANSURE, J.J.A.; PASCHOALIN, M.F.; PANEK, A.D. Regulation of trehalose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* mutants during temperatures shifts. *Bioch.*, 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. *Braz. J. Microbiol.*, v.33, p.202-208, 2002.

PATERSON, M.; BORBA, J.M.M.; MELO, F.A.D.; MORAES, J.I. Avaliação do desempenho da fermentação etanólica em diferentes situações do processo industrial. *Brás. Açuc.*, v.106, n.516, p.27-32, 1988.

PRIEST, F.G. Contamination, 1981. In: ALVES, D.M.G. Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica. Tese (Doutorado). ESALQ. Piracicaba, 1994, pgs.199.

RIBEIRO, M.J.S. Estudo do metabolismo de trealose durante o choque térmico a 36° C em *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 1993, pgs.87.

RODINE, M. A. T. 1985. Isolamento, caracterização e identificação de bactérias contaminantes de dornas de fermentação nas destilarias de etanol. Dissertação de Mestrado, ESALQ-USP, Piracicaba, SP, pgs. 92.

ROSA, M.F.; SÁ-CORREIA, I. *In vivo* activation by ethanol of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.57, p. 830-835, 1991.

ROSE, A.H. Industrial importance the *Saccharomyces cerevisiae*. In: SKINNER, F.A. et al. Biology and Activies of Yeast, Ed. Academic Press., 1980.

SAMSOM, F.E.; KATZ, A.M.; HARRIS, D.L. Effects of acetate and short-chain fatty acids on metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.54, 406, 1955.

SERRA, G.E.; CEREDA, M.P.; FERES, R.J.F.; BERTOZO, M.T.; VINCENTE, A.L. Contaminação da fermentação alcoólica "floculação do fermento". Brasil açucareiro, XCIII, n.6, p. 336-341, 1979.

SERRANO, R. Effect of ATPase inhibitors on the proton pump of respiratory-deficient yeast. *Eur. J. Biochem.*, v.105, p. 419-424, 1980.

SERRANO, R. In vivo activation of the yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Lett.*, v. 156, p.11-14,1983.

SHARMA, S.C. A possible role of trehalose in osmotolerance and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.152, p.11-15, 1997.

SHARMA, S.; TAURO, P. Enzyme behavior during ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *W. J. Microb. Biothechnol.*, v.2, p. 112-115, 1987.

SLAVIK, J.; KOTYK, A. Intracellular pH distribution and transmembrane pH profile of yeast cells. *Bioch. Bioph. Acta*, v. 766, p. 679-684, 1984.

SOUZA, M.A.A.; TRÓPIA, M.J.; BRANDÃO, R.L. New aspects of glucose activation of the H⁺ ATPase un the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.*, v.147, p. 2849-2855, 2001.

SOUZA, M.A de C.; MUTTON, M.J.R. Flocculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum* em processos industriais de fermentação alcoólica avaliada por técnica fotométrica. *Ciênc. Agrotec.*, Lavras, v.28, n.4, p.893-898. 2004.

SPECK, M.L. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Am. Public Health. Assoc. Washington-DC. 1978.

STUPIELLO, J.P.; HORI, J. Condução da fermentação alcoólica. *Saccharum*, n.17, p. 43-46, 1981.

THEVELEIN, J.M. Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiol. Reviews*, v.48, p.42-59, 1984.

THOMAS, D.S.; KOSSAK, J.A.; ROSE, A.H. Plasma membrane composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microb.*, v.117, p. 239-245, 1978.

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. *J. App. Microbiol.* v.90, p.819-828, 2001.

TILBURY, R.G. Occurrence and effects of acid bacteria in the sugar industry, 1975. In: ALVES, D.M.G., 1994; pgs.199.

VALLE, E.; BERGILLOS; L.RAMOS, S. External K⁺ effects the internal acidification caused by the addiction of glucose to yeast cells. *J. General Microbiol.*, v.133, n.3, p.535-538. 1987.

VICTOR, S.R. Tolerância Térmica, Etanólica e a tratamentos por ácido láctico e Sulfúrico em *S. uvarum* IZ 1904, *S. cerevisiae* IZ 888 e leveduras contaminantes da Fermentação Etanólica. Dissertação (Mestrado) Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista. 1996, pgs. 190.

VIEGAS, A. C.; SÁ-CORREIA, I. Activation of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* by octanoic acid. *J.Gen. Microbiol.*, v.137, p.645-651. 1991.

VIEGAS, A.C.; SÁ-CORREIA, I. Effects of low temperatures (9-33°C) and pH (3,3-5,7) in the loss of *Saccharomyces cerevisiae* viability by combining lethal concentrations of ethanol with octanoic and decanoic acids. *Food Microbiol.*,v.34, p.267-277, 1997.

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. *Appl. Environ. Microb.*, v.55, n.1, p.21-28, 1989.

VIEGAS, C.A; SEBASTIÃO, P.; NUNES, A.G.; SÁ-CORREIA, I. Activation of plasma membrane H⁺-ATPase and expression of PMA1 and PMA2 genes in *Saccharomyces cerevisiae* cells grown at supraoptimal temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.61, n.5, p.1904-1909, 1995.

VIEGAS, C.A; ALMEIDA, P.F.; CAVACO, M.; SÁ-CORREIA, I. The H⁺-ATPase in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae* is activated growth latency in octanoic acid supplemented médium accompanying the decrease in intracellular pH and viability. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 64, p. 779-783, 1998.

WALKER-CAPRIOGLIO, H.; RODRIGUEZ, R.J.; E PARKS, L.W. Recovery of *Saccharomyces cerevisiae* from ethanol-induced growth inhibition. *Appl.Environ. Microbiol.Oregon*, v.50, n.3, p. 685-689, 1985.

WALKSMAN, S.A. Microbial antagonism and antibiotic substance,1945. In: ALVES, D.M.G., 1994, pgs.199.

WARTH, A. D. Resistance of yeast species to benzoic and sorbic acids and to sulfur dioxide. *J. Food Protect.* v. 48, n. 7, p. 564-569, 1985.

WEUSTHUIS, R. A.; VISSER, W.; PRONK, J.T.; SCHEFFERS, W. A.; van DIJKEN, J. Effects of oxygen limitation on sugar metabolism in yeasts: a continuous-culture study of the Kluver effect. *Microbiol.*, v. 140, p. 703-715, 1994.

WIEMKEN, A. Trehalose in yeast, stress protection rather than reserve carbohydrate. *Ant. van Leeuw.*, Amsterdam, v.58, p.209-217, 1990.

WINKLER, M.A. (1991): in *Genetically-Engineered Proteins and Enzymes from Yeast: Production Control*. Ed. Wiseman, A., Ellis Horwood, pp. 96-146.

WINKLER, M.A. (1995): in *HandBook of Enzyme Biotechnology*. Ed. Wiseman, A. Ellis Horwood, p. 9-30.

YOKOYA, F. Microbiologia do processo de fermentação. In : EGUSHI, S.Y. *et al.* Pontos críticos e microbiológicos em uma usina de açúcar e álcool. Campinas, Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “ André Tosello”, p.1-22, 1989.

YOKOYA, F. Problemas com contaminantes na fermentação alcoólica. *STAB. Aç. Alc. Subp.* v.9, n.6, p.38-39, 1991.

YOKOYA, F. & OLIVA-NETO, P. Characteristics of yeast flocculation by *Lactobacillus fermentum*. *Ver. Microbiol.* São Paulo. v. 22, p. 21-27, 1991.

ZECH, M.; GÖRISCH, H. Invertase from *Saccharomyces cerevisiae*: reversible activation by components of industrial molasses media. *Enz. Microb. Technol.*, v.17, p. 41-46, 1995.

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

TESE DE DOUTORADO defendida em 29.09.2006:

**Sinergismo entre sulfito, ácido láctico, pH e etanol na fermentação alcoólica
de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e M-26**

CLAUDIA DORTA

Comissão Examinadora:



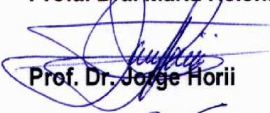
Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto



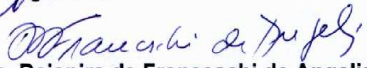
Prof. Dr. Fumio Yokoya



Profa. Dra. Maria Helena Miguez da Rocha Leão



Prof. Dr. Jorge Hórii



Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis