



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS**

**Influência das interações entre leveduras e bactérias
contaminantes no rendimento da fermentação etanólica**

LARISSA FERREIRA PAPIN

**Araras
2024**

Ferreira Papin, Larissa

Influência das interações entre leveduras e bactérias contaminantes no rendimento da fermentação etanólica / Larissa Ferreira Papin -- 2024.
71f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras

Orientador (a): Reinaldo Gaspar Bastos

Banca Examinadora: Jorge José Corrêa Lopes, Vanessa de Oliveira Arnoldi Pellegrini

Bibliografia

1. Fermentação. 2. Leveduras. 3. Bactérias. I. Ferreira Papin, Larissa. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Helena Sachi do Amaral - CRB/8
7083



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Larissa Ferreira Papin, realizada em 24/06/2024.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos (UFSCar)

Prof. Dr. Jorge José Corrêa Lopes (UFSCar)

Profa. Dra. Vanessa de Oliveira Arnoldi Pellegrini (Raízen)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS**

**Influência das interações entre leveduras e bactérias
contaminantes no rendimento da fermentação etanólica**

LARISSA FERREIRA PAPIN

ORIENTADOR: PROF. DR. REINALDO GASPAR BASTOS

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. SILVIO ROBERTO ANDRIETTA

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Produção
Vegetal e Bioprocessos Associados
como requisito parcial à obtenção do
título de MESTRE EM PRODUÇÃO
VEGETAL E BIOPROCESSOS
ASSOCIADOS

ARARAS

2024

AGRADECIMENTOS

À minha família, que sempre esteve ao meu lado, oferecendo encorajamento e apoio incondicional. As constantes palavras de incentivo foram a luz que guiou meus passos durante os momentos mais desafiadores. Agradeço por acreditarem em mim e por serem minha fonte de força.

Agradeço ao meu marido Carlos, por estar ao meu lado quando a dúvida se instalou em mim e por ter paciência enquanto eu buscava entender qual caminho deveria seguir na minha vida e na minha carreira. Sua confiança e apoio foram essenciais para que eu encontrasse meu caminho e me dedicasse a esta conquista.

Obrigada aos meus queridos amigos Jorge Lopes, Tina e Vico, que tanto me encorajaram e incentivaram a buscar mais essa qualificação, a cada ano que passava desde a minha graduação me encaminhavam as inscrições do programa e me acompanharam tanto na minha carreira profissional como na minha vida pessoal.

Também importante agradecer a toda equipe do Labmac e estagiários, em especial a Cláudia, que me acompanha desde a graduação com sua risada marcante e que também me apoiou nos experimentos e preparos. A Raízen, por me permitir usar o Laboratório para finalizar meus experimentos, em especial a supervisora Flávia por ceder as instalações e a analista Fernanda que com tanto zelo e técnica se dedicou a me ajudar com as análises.

E expresso minha gratidão a todos meus amigos que de alguma forma contribuíram para o sucesso desta dissertação. Seja através de conselhos, estímulo ou simplesmente estando presente, cada um de vocês desempenhou um papel fundamental nesta conquista, que estiveram ao meu lado em cada etapa desta jornada, oferecendo apoio emocional, palavras de encorajamento e momentos de descontração. E por fim, aos meus orientadores. Reinaldo, pelo apoio constante e pelos ensinamentos, pela paciência com meus prazos, entendendo minhas responsabilidades no trabalho, e pela liberdade que me deu para escolher uma área de estudo dentro da fermentação etanólica. E ao Sílvio, por ter sugerido esse tema para minha dissertação e, acima de tudo, por ter sido um grande apoio, um mentor inspirador, com contribuições valiosas na minha vida acadêmica e profissional e um amigo nos últimos anos.

SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVOS	03
3 REVISÃO DA LITERATURA	04
3.1 VIA METABÓLICA DE OBTENÇÃO DE ETANOL POR LEVEDURA.....	04
3.2 RENDIMENTO DE AÇÚCARES EM ETANOL.....	05
3.3 MICRORGANISMOS.....	07
3.3.1 LEVEDURAS.....	07
3.3.2 BACTÉRIAS.....	10
3.3.3 INTERAÇÕES MICROBIANAS.....	11
4 MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1 INÓCULOS.....	15
4.2 PREPARO DE CULTURAS PURAS.....	15
4.3 MEIO DE FERMENTAÇÃO SEMISSINTÉTICO.....	16
4.4 CURVA PADRÃO DE CONCENTRAÇÃO CELULAR.....	16
4.5 ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO MISTA.....	17
4.6 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS.....	20
4.6.1 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS, GLICEROL E ETANOL.....	20
4.6.2 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES.....	20
4.7 EFICIÊNCIA DE FERMENTAÇÃO GLOBAL.....	20
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1 CURVA PADRÃO DE CÉLULAS.....	22
5.2 EFICIÊNCIA DE FERMENTAÇÃO GLOBAL.....	24
5.3 MONITORAMENTO DE METABÓLITOS.....	26
5.4 MONITORAMENTO DO CRESCIMENTO CELULAR.....	37
6 CONCLUSÕES	43
7 LITERATURA CITADA	44
APÊNDICE	54

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Delineamento experimental em triplicata.....	18
Tabela A1. Resultados obtidos para ácidos orgânicos, glicerol e etanol por HPLC, para todos os experimentos e controle.....	49
Tabela A2. Resultados obtidos para carboidratos por cromatografia IC, para todos os experimentos e controle.....	51
Tabela A3. Resultados obtidos para as eficiências de fermentação de todos os experimentos e controle.....	53

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema dos ensaios e diluições para construção da curva padrão dos microrganismos.....	17
Figura 2. Curva Padrão para <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	21
Figura 3. Curva Padrão para <i>Limosilactobacillus fermentum</i>	22
Figura 4. Curva Padrão para <i>Lactobacillus amylovorus</i>	22
Figura 5. Curva Padrão para <i>Lactobacillus helveticus</i>	22
Figura 6. Eficiência Fermentativa Global.....	24
Figura 7. Proposta de efeito do acetaldeído produzido por <i>L. amylovorus</i> na fisiologia das leveduras (Adaptado de Lino <i>et al.</i> , 2021)	25
Figura 8. Concentração final de ácido acético produzido durante os ensaios de fermentação etanólica com <i>L. helveticus</i>	28
Figura 9. Concentração final de ácido acético produzido durante os ensaios de fermentação etanólica com <i>L. fermentum</i>	28
Figura 10. Concentração final de ácido acético produzido durante os ensaios de fermentação etanólica com <i>L. plantarum</i>	29
Figura 11. Concentração final de ácido acético produzido durante os ensaios de fermentação etanólica com <i>L. amylovorus</i>	29
Figura 12. Concentração final de ácido acético produzido durante os ensaios de fermentação etanólica com cultura mista.....	30

Figura 13. Concentração final de ácido láctico produzido durante os ensaios de fermentação etanólica com <i>L. helveticus</i>	32
Figura 14. Concentração final de ácido láctico produzido durante os ensaios de fermentação etanólica com <i>L. fermentum</i>	32
Figura 15. Concentração final de ácido láctico produzido durante os ensaios de fermentação etanólica com <i>L. plantarum</i>	33
Figura 16. Concentração final de ácido láctico produzido durante os ensaios de fermentação etanólica com <i>L. amylovorus</i>	33
Figura 17. Concentração final de ácido láctico produzido durante os ensaios de fermentação etanólica em cultura mista.....	34
Figura 18. Concentração final de glicerol produzido durante os ensaios de fermentação etanólica com <i>L. helveticus</i>	35
Figura 19. Concentração final de glicerol produzido durante os ensaios de fermentação etanólica com <i>L. fermentum</i>	35
Figura 20. Concentração final de glicerol produzido durante os ensaios de fermentação etanólica com <i>L. plantarum</i>	36
Figura 21. Concentração final de glicerol produzido durante os ensaios de fermentação etanólica com <i>L. amylovorus</i>	36
Figura 22. Concentração final de glicerol produzido durante os ensaios de fermentação etanólica em cultura mista.....	37
Figura 23. Contagem inicial e final de <i>Limosilactobacillus fermentum</i> nas diferentes concentrações celulares estudadas de fermentação mista.....	40
Figura 24. Contagem inicial e final de <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> nas diferentes concentrações celulares estudadas de fermentação mista.....	41
Figura 25. Contagem inicial e final de <i>Lactobacillus helveticus</i> nas diferentes concentrações celulares estudadas de fermentação mista.....	41
Figura 26. Contagem inicial e final de <i>Lactobacillus amylovorus</i> nas diferentes concentrações celulares estudadas de fermentação mista.....	42

Figura 27. velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{\text{máx}}$) nas diferentes concentrações celulares estudadas de fermentação mista.....	42
--	----

INFLUÊNCIA DAS INTERAÇÕES ENTRE LEVEDURAS E BACTÉRIAS CONTAMINANTES NO RENDIMENTO DA FERMENTAÇÃO ETANÓLICA

Autor: LARISSA FERREIRA PAPIN

Orientador: Prof. Dr. REINALDO GASPAR BASTOS

Co-orientador: Prof. Dr. SÍLVIO ROBERTO ANDRIETTA

RESUMO

O Brasil é reconhecido mundialmente pelo pioneirismo na introdução do etanol em sua matriz energética, com produção via fermentativa, empregando linhagens de levedura, em especial *Saccharomyces cerevisiae*, e caldo ou melaço de cana-de-açúcar. A produção industrial de etanol no Brasil tem como característica não ser um processo asséptico, onde o mosto (mistura de caldo, mel e água) não sofre qualquer tipo de tratamento visando a eliminação dos microrganismos contaminantes. Devido a essas características do processo de fermentação no Brasil, um dos fatores que pode influenciar no rendimento da fermentação é a contaminação bacteriana, a qual tende a efeitos prejudiciais ao processo devido a competição por nutrientes. No entanto, interação entre as leveduras e as bactérias contaminantes encontradas no processo não está completamente esclarecida e pode não ser inteiramente prejudicial, havendo uma sinergia complexa e dinâmica relacionada com os metabólitos formados. Assim, o presente trabalho propõe avaliar o impacto das interações entre leveduras e bactérias no rendimento fermentativo, crescimento celular, produção de etanol e subprodutos. Para isso, foi proposta a realização de fermentações mistas em meio semi-sintético entre a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e quatro diferentes contaminantes presentes em abundância na indústria sucroenergética. *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactiplantibacillus plantarum* e *Lactobacillus amylovorus* foram estudadas em quatro concentrações celulares (10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 células por mL) em consórcio com a levedura. Etanol, açúcares, ácido acético, ácido lático e glicerol foram quantificados, além da biomassa formada. A pesquisa mostrou que o *Limosilactobacillus fermentum* afetou negativamente o crescimento celular da levedura e a eficiência da fermentação, enquanto que o *Lactobacillus helveticus*, mesmo não permanecendo até o final da fermentação, ocasionou redução na eficiência, com elevados teores de ácido lático, superiores aos ensaios com *L. fermentum*. O *L. plantarum* não comprovou as sinergias positivas reportadas pela literatura, enquanto o *Lactobacillus amylovorus* contribuiu para o aumento da eficiência da fermentação e crescimento celular. Os resultados enfatizam a importância de entender as interações microbianas para otimizar a produção de etanol e comprovam que existem diferentes formas de sinergia entre os microrganismos, influenciadas pelo meio e pela concentração celular.

Palavras-chave: fermentação, contaminação bacteriana, rendimento, levedura.

INFLUENCE OF INTERACTIONS BETWEEN YEASTS AND CONTAMINATING BACTERIA ON ETHANOL FERMENTATION YIELD

Author: LARISSA FERREIRA PAPIN

Adviser: Prof. Dr. REINALDO GASPAR BASTOS

Co-adviser: Prof. Dr. SÍLVIO ROBERTO ANDRIETTA

ABSTRACT

Brazil is recognized worldwide for its pioneering role in integrating ethanol into its energy matrix, produced via fermentation using yeast strains, particularly *Saccharomyces cerevisiae*, and sugarcane juice or molasses. The industrial production of ethanol in Brazil is characterized by a non-aseptic process, where the must (a mixture of juice, molasses, and water) doesn't pass through any type of treatment that aimed to eliminate microbial contamination. Due to these characteristics of the fermentation process in Brazil, one of the factors that can influence fermentation yield is bacterial contamination, which tends to have detrimental effects on the process due to competition for nutrients. However, the interaction between yeasts and contaminating bacteria found in the process is not fully elucidated and may not be entirely harmful, with a complex and dynamic synergy related to the metabolites formed.

In this context, the present study proposes to evaluate the impact of interactions between yeasts and bacteria on fermentation yield, cell growth, ethanol production, and by-products. For this purpose, mixed fermentations were conducted in semi-synthetic medium between the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and four different contaminants commonly found in the sugarcane industry. *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, and *Lactobacillus amylovorus* were studied at four cell concentrations (10^5 , 10^6 , 10^7 , and 10^8 cells per mL) in consortium with the yeast. Ethanol, sugars, acetic acid, lactic acid, and glycerol were quantified, in addition to the biomass formed. The research showed that *Limosilactobacillus fermentum* negatively affected yeast cell growth and fermentation efficiency, while *Lactobacillus helveticus*, even though not remaining until the end of fermentation, caused a reduction in efficiency, with high levels of lactic acid, exceeding those in the *L. fermentum* trials. *L. plantarum* did not demonstrate the positive synergies reported in the literature, while *Lactobacillus amylovorus* contributed to increased fermentation efficiency and cell growth. The results emphasize the importance of understanding microbial interactions to optimize ethanol production and demonstrate that there are different forms of synergy among microorganisms, influenced by the medium and cell concentration.

Keywords: fermentation, bacterial contamination, yield, interaction

1 INTRODUÇÃO

A produção do etanol no mundo tem como principais matérias-primas a cana-de-açúcar e o milho. De acordo com o Renewable Fuels Association (2024), na safra de 2023, os Estados Unidos lideraram a produção mundial com 53%, enquanto o Brasil ficou em segundo com 28% da produção mundial de etanol. O Brasil é reconhecido mundialmente pelo pioneirismo na introdução do etanol em sua matriz energética. A safra de etanol no Brasil em 2023, contabilizando a produção por cana-de-açúcar e milho, chegou a totalizar 31,3 bilhões de litros (UDOP, 2023; RENEWABLE FUELS ASSOCIATION, 2024).

O etanol tem ganhado destaque diante de muitos motivos, sendo eles a elevação no preço do petróleo no mundo, as perspectivas do esgotamento das reservas de combustível fóssil, assim como os riscos geopolíticos oriundos da concentração da oferta de petróleo em países politicamente instáveis e principalmente as preocupações ambientais e a constante busca em se utilizar fontes de energia limpa (MUTHAIYAN *et al.*, 2011). No Brasil, o interesse pela utilização de álcool etílico como fonte de energia renovável teve início no ano 1923, em que foi criada a primeira Estação Experimental de Combustível, a qual desenvolveu estudos visando à adaptação de motores de combustão interna para consumo de álcool (CASALI, 1978). Em 1973 começou a crise do petróleo e iniciou-se uma nova etapa de estudos visando a expansão da utilização do álcool. O Brasil, tradicional produtor de cana-de-açúcar, instituiu em 1975 o Programa Nacional do Álcool (PROÁLCOOL), com o objetivo de amenizar os problemas resultantes dessa crise. Antes do PROÁLCOOL, a produção brasileira de etanol representava apenas uma parcela não muito significativa na industrialização da cana-de-açúcar, com 600 milhões de litros por safra obtidos por processos fermentativos. Com o advento do PROÁLCOOL, o Brasil tornou-se o primeiro país a possuir um programa de combustível, em larga escala, em substituição à gasolina (DATAGRO, 1999). Atualmente o Brasil conta com o programa RENOVABIO, onde a lei nº 13.576/2017 estabeleceu uma política com o objetivo principal de implementar metas nacionais anuais de descarbonização para o setor de combustíveis, por meio de um mercado de crédito de descarbonização. Essa medida visa incentivar a produção e a utilização de biocombustíveis na matriz energética de transportes do país (ANP, 2024).

Convencionalmente, a produção de etanol é feita por via fermentativa, empregando linhagens de levedura que apresentem grande habilidade de transformar os açúcares do meio de cultivo, tradicionalmente caldo de cana-de-açúcar ou melaço, em etanol, CO₂ e outros subprodutos. A levedura mais utilizada nas fermentações etanólicas é a *Saccharomyces cerevisiae*, selecionadas de acordo com características de interesse industrial e alto rendimento (LOPES, *et al.*, 2016)

A produção industrial de etanol por caldo de cana-de-açúcar no Brasil é conhecida como sendo de primeira geração (E1G), onde é demandada uma extração eficiente do caldo de cana e submetido a um tratamento físico-químico para a clarificação do caldo (MORAES *et al.*, 2015) e tem como uma das principais características não ser um processo asséptico, onde não se mantém um processo estéril após o tratamento térmico.

O processo mais utilizado é do tipo batelada alimentada com reciclo de leveduras, mantendo elevada a concentração celular nos biorreatores, onde a concentração de leveduras deve acompanhar o volume de mosto a ser fermentado. (ANDRIETTA *et al.*, 2007; MARSIT; DEQUIN, 2015). As condições as quais as leveduras são expostas dentro desses biorreatores podem ocasionar mudanças no seu metabolismo. (FAVARO, *et al.*, 2019). Devido a essas características do processo fermentativo no Brasil, os diversos fatores que podem influenciar no rendimento fermentativo tais como temperatura, pH, altas concentrações de açúcar e etanol são objeto de estudos. (DE SOUZA *et al.*, 2018). Nesse sentido, a contaminação bacteriana é considerada uma das principais fontes das perdas no processo através do desvio do fluxo de carbono dos açúcares para outros metabólitos, uma vez que consomem açúcares e nutrientes para seu desenvolvimento, levando até mesmo a inibição das leveduras de interesse. Além disso, o controle dos contaminantes pode representar um alto custo no orçamento anual, e a ineficiência desse tratamento é frequentemente apontada como uma causa de prejuízos no rendimento (MUTHAIYAN *et al.*, 2011).

Por outro lado, recentemente alguns trabalhos mostram que a interação entre as leveduras utilizadas normalmente nas destilarias e as bactérias contaminantes encontradas no processo pode não ser totalmente maléfica ao processo, havendo uma sinergia complexa e dinâmica relacionada aos metabólitos formados, podendo levar a uma maior tolerância ao etanol (HE *et al.*, 2021; LINO *et al.*, 2021).

O entendimento das reações envolvidas no metabolismo das células de levedura para a obtenção de etanol é fundamental para que seja estabelecida uma relação entre redução do rendimento e formações dos principais subprodutos. A depender do nível de contaminação, a presença de bactérias parece favorecer o balanço das coenzimas no sentido de acetaldeído à etanol. Neste sentido, um estudo quantitativo se faz necessário para relacionar os níveis de contaminação com a presença de determinados metabólitos, correlacionando-os com o rendimento em condições mais próximas possíveis da fermentação etanólica em escala industrial conduzida no Brasil.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto das interações entre leveduras e bactérias no rendimento fermentativo, crescimento celular, produção de etanol e subprodutos, a partir dos seguintes objetivos específicos:

- Conduzir ensaios de fermentação etanólica em frascos com diferentes proporções entre as populações de leveduras e bactérias;
- Determinar os metabólitos formados (glicerol, ácido acético, ácido láctico e etanol) na fermentação etanólica nos diferentes níveis de contaminação bacteriana;
- Avaliar o consumo dos açúcares;
- Estimar o rendimento fermentativo a partir do balanço de massa nas diferentes condições;
- Verificar a existência de uma sinergia entre esses microrganismos nas diferentes condições experimentais através da quantificação de parâmetros cinéticos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 VIA METABÓLICA DE OBTENÇÃO DE ETANOL POR LEVEDURAS

O processo de fermentação pode ser definido como todos os processos em que um microrganismo faz a conversão de uma dada substância em um determinado produto em meios naturais ou sintéticos, ou seja, é todo processo metabólico ocorrido em anaerobiose, onde se tem como produto uma molécula de NAD e um derivado de piruvato (ALVES, 2000).

As reações que os microrganismos fermentadores realizam são catalisadas enzimaticamente, tornando a velocidade delas compatíveis com as exigências metabólicas. As leveduras produzem invertases que irão catalisar a hidrólise da sacarose até glicose e frutose, resultando em uma mistura destes açúcares que são absorvidos pelas células (ASSÊNCIO, 2002).

As leveduras podem ser classificadas fisiologicamente pela forma como elas obtêm energia em seus metabolismos, sendo elas não fermentadoras, fermentadoras facultativas e obrigatórias. No caso da *Saccharomyces cerevisiae*, trata-se de uma levedura fermentativa facultativa, pois em diferentes condições de oxigênio ou açúcares pode fermentar ou realizar a respiração (VAN DJIKEN; SCHEFFERS, 1986; STUPIELO; HORII, 1981).

A transformação do açúcar pelas leveduras até a produção do etanol e gás carbônico envolve 12 reações em sequência, onde cada reação é catalisada por uma enzima específica e essas enzimas sofrem a ação de diversos fatores que podem afetar assim o desempenho do processo (AMORIM; BASSO; ALVES, 1996).

Durante o crescimento das leveduras, as suas células utilizam os substratos para suprir duas necessidades principais: acumular energia e intermediários metabólicos para formar novas células. As leveduras podem obter energia através das vias respiratória e fermentativa, sendo o etanol, CO₂ e o glicerol os principais produtos gerados da fermentação de glicose e galactose (LAGUNAS, 1976).

O metabolismo de carbono nas leveduras *Saccharomyces* se inicia com o seu transporte para dentro da célula e os compostos metabolizados pelas leveduras são na sua grande maioria hidrofílicos e impermeáveis a membrana citoplasmática e necessitam de transportadores específicos para isso (KRUCKEBERG; DICKINSON, 2004).

Na sua grande maioria, a fonte de carbono para leveduras são açúcares. O início da rota metabólica que ocorre na fermentação etanólica com leveduras é a chamada glicólise, onde uma molécula de glicose é oxidada e duas moléculas de piruvato são produzidas (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2000). Este piruvato formado, portanto, poderá assumir duas rotas, sendo a primeira a fermentação e produção de etanol ou a respiração (VAN DJIKEN; SCHEFFERS, 1986; CHRZANOWSKI, 2020). Ambos os processos de catabolismo

e anabolismo utilizam de cofatores como o NAD e NADP. Para ter um equilíbrio em suas reações anaeróbias, as leveduras também fazem com que a absorção da glicose leve à produção de glicerol, o qual é produzido pela redução da dihidroxiacetona fosfato em glicerol 3-fosfato, seguido da desfosforilação do mesmo em glicerol (RODRIGUES; LUDOVICO; LEÃO, 2005; CHRZANOWSKI, 2020).

A formação de glicerol, bem como o crescimento celular, inevitavelmente direciona alguns intermediários glicolíticos para as suas correspondentes rotas metabólicas, diminuindo o rendimento de produção do etanol (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008).

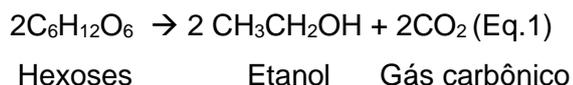
Os metabólitos secundários são aqueles que estão direta ou indiretamente relacionados à adaptação ou sobrevivência, ou ainda por serem necessários para formação de materiais relacionados à produção de biomassa, como polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos. O glicerol e o ácido succínico são quantitativamente os principais subprodutos metabolicamente relacionados ao potencial redox em anaerobiose. O glicerol pode ser produzido em reações de balanceamento, ou como um soluto compatível em resposta ao estresse osmótico (BOULTON; QUAIN, 2001).

A fermentação alcoólica é um processo de oxidação incompleta, sem a participação do oxigênio molecular e, portanto, para se manter o equilíbrio redox celular, todo o NADH formado (em reações de oxidação) deve ser consumido (em reações de redução) acopladas à produção de etanol e glicerol (TILLOY *et al.*, 2015). Muitas leveduras, incluindo a *S. cerevisiae*, apresentam também capacidade de produzir ácido acético, tanto em condições anaeróbias quanto aeróbias (RODRIGUES; LUDOVICO; LEÃO, 2005).

Atualmente, há um interesse crescente em aprimorar o metabolismo das leveduras para melhorar a produção de etanol, e muitos estudos estão sendo realizados nessa área. Nesse contexto, o artigo de Van Rossum, *et al.* (2021) aborda a utilização de modificações genéticas para otimizar a produção de etanol e aumentar a tolerância ao etanol em *S. cerevisiae*. Por meio de uma triagem em larga escala de uma biblioteca de mutantes de levedura, os pesquisadores identificaram cepas de leveduras com desempenho aprimorado na produção de etanol e maior tolerância ao estresse do etanol. O estudo fornece discussões interessantes sobre as vias metabólicas envolvidas e destaca o potencial dessas abordagens para melhorar a eficiência e a viabilidade da produção de bioetanol.

3.2 RENDIMENTO DE AÇÚCARES EM ETANOL

Para o cálculo do rendimento fermentativo é preciso considerar que a hidrólise da sacarose, fornecida no meio de cultivo das fermentações etanólicas no Brasil, resulta em duas hexoses (glicose e frutose), as quais são potencialmente convertidas em duas moléculas de etanol e de gás carbônico cada, de acordo com a equação estequiométrica a seguir:



Considerando a equação anterior e a densidade do etanol de 789,23 kg m⁻³, temos para cada quilograma de sacarose, 0,682115 L de etanol. Ou também podemos dizer que cada quilograma de ART (açúcares redutores totais) corresponde a 0,511429 kg de etanol ou 0,648010 L de etanol, considerando eficiência máxima de 100% de conversão (FERNANDES, 2011). A eficiência máxima de 100% não pode ser alcançada, pois se considera o desvio de açúcares para obtenção de subprodutos como ácido succínico, glicerol e biomassa, sendo a máxima eficiência obtida na prática fica em torno de 92% (BIOCONTAL, 2021c; DELLA BIANCA, 2013).

Existem atualmente duas formas mais usuais de calcular o rendimento fermentativo nas unidades produtoras de etanol no Brasil: por balanço de massa dorna a dorna e por subprodutos. O cálculo do balanço de massa necessita de inúmeras informações do processo e laboratório, envolvendo equipamentos de medição de volume e etanol em processo para tal, o que pode levar a erros nesse cálculo pela grande oscilação que ocorre no processo que não opera de forma estacionária (ANDRIETTA *et al.*, 2012). Os mesmos autores citam que o rendimento por subprodutos foi concebido em função da dificuldade, naquela época, de se determinar nos processos contínuos os volumes de: mosto, fermento tratado e vinho. Apresenta menor oscilação, porém também apresenta suas limitações.

Biocontal (2021b) reporta que o cálculo do rendimento por subprodutos leva em consideração apenas a perda de carbono pela produção de CO₂, glicerol, massa celular e ácidos orgânicos. Apesar de serem consideradas as principais perdas dentro do processo, não leva em consideração, por exemplo, as perdas provenientes da produção de acetaldeído.

De acordo com Biocontal (2021a), os fatores que podem favorecer a oscilação por balanço de massa são: erro na determinação e amostragem dos volumes de mosto, vinho e levedo, erros nas análises de concentração de ART e de etanol. (ANDRIETTA *et al.*, 2012).

Biocontal (2021b) cita que o cálculo de rendimento por balanço de massa global pode ser usado para ambos os tipos de fermentação, seja batelada ou contínua e leva em consideração o etanol produzido medido na produção e a eficiência de destilação para determinar o etanol produzido na fermentação, sem utilizar assim o grau alcoólico do vinho.

3.3 MICRORGANISMOS

3.3.1 LEVEDURAS

As leveduras e principalmente a *Saccharomyces cerevisiae*, é o principal microrganismo responsáveis pela fermentação alcoólica. São fungos unicelulares, apresentam células que podem ser esféricas, ovais ou elípticas podendo ainda apresentar-se bastante alargadas e as suas dimensões podem variar consideravelmente em função da espécie, nutrição e idade entre outros fatores. Elas se caracterizam por terem uma forma de reprodução vegetativa conhecida como brotamento ou gemulação, onde o núcleo se divide por constrição e uma porção dele entra no broto juntamente com outras organelas. A conexão citoplasmática é fechada pela síntese de novo material de parede celular. As células de *S. cerevisiae* são elípticas, medindo cerca de 6 a 8 μm de comprimento, podendo existir os estágios fermentativos haplóides como diplóides (TORTORA; FUNKE; CASE, 2002; PELCSAR Jr. *et al.*, 1996).

Como microrganismos heterotróficos, possuem processos de anabolismo juntamente com de catabolismo. E dentro desses processos metabólicos, as leveduras podem gerar metabólitos de interesse econômico, como o etanol. As leveduras utilizam inúmeras fontes de carbono, sendo as mais comuns as hexoses como a glicose, frutose, galactose ou até algumas pentoses como a xilose (FARIA-OLIVEIRA, *et al.*, 2015).

As linhagens de leveduras vêm sendo selecionadas por causa do progresso da tecnologia de produção de álcool, buscando-se características desejáveis ao processo e ao produto. Características como produtividade, eficiência da fermentação, a tolerância ao etanol e temperatura e a resistência às altas concentrações de açúcares são uns dos principais fatores que levam a escolha de uma levedura (GUTIERREZ; ANNICCHINO; LUCATTI, 1990).

De acordo com Nya e Etukudo (2023), a *S. cerevisiae*, tem uma distribuição natural diversa, podendo ser isolada do solo, da água, ar, plantas, frutas e sucos vegetais o que faz dela um recurso valioso para a indústria, onde já vem sendo amplamente utilizada na produção de diversos produtos, como etanol, iogurte, queijo, pão, vinho e outras bebidas alcoólicas, assim como nutrição animal e humana.

Seus atributos, como a capacidade de fermentação, são essenciais para a produção industrial de alimentos e bebidas. Além disso, as leveduras são importantes para melhorar a qualidade, sabor, textura e valor nutricional de alimentos processados em todo o mundo (PRETORIUS; TOIT; RENSBURG, 2003).

Ferrari *et al.* (1980) ressaltam a importância de que o microrganismo que irá ser usado na fermentação deve ter as suas características bastante definidas, sendo elas, a capacidade de fermentar com alto desempenho, ter uma alta velocidade de fermentação, ter

osmotolerância, tolerância ao etanol, capacidade de produzir altas quantidade de etanol, ser tolerante a meios ácidos, alta viabilidade celular para ciclos repetitivos, resistência a altas temperaturas e estabilidade genética para todas as características citadas acima.

De acordo com a sua importância econômica, a *S. cerevisiae* pode ser considerada o eucarioto mais estudado e cujo metabolismo é o mais conhecido (AQUARONE; LIMA; BORZANI, 2001). Além da sua importância e robustez para a produção de etanol de cana-de-açúcar, a *S. cerevisiae* vem sendo usada como uma ferramenta fundamental na biotecnologia. Elas vêm sendo amplamente estudadas na biotecnologia industrial, principalmente nos campos genético, metabólico e fisiológico. Fato que se concretizou pela sua capacidade de servir como uma caixa de ferramentas genética para a engenharia metabólica (Cao *et al.*, 2020).

Segundo Basso (2008) o estudo das características fermentativas das linhagens nativas isoladas de processos industriais permite a seleção de cepas apropriadas à fermentação com reciclo, como conduzida no país.

Algumas linhagens já foram selecionadas por essas características e são amplamente utilizadas na indústria sucroenergética, como a BG-1, CAT-1, PE-2 e SA-1, que foram isoladas e selecionadas em unidades industriais sucroenergéticas após permanência e desempenho fermentativos satisfatórios. E essas leveduras vêm sendo empregadas na maioria das indústrias sucroalcooleiras e correspondem a parte significativa do etanol produzido no país, porém mesmo elas apresentando grande capacidade de permanecerem no processo, estas cepas são substituídas por linhagens contaminantes, que na maioria das vezes não são eficientes (com formação de espuma, floculação e incapacidade de metabolizar todo açúcar do mosto) ou muitas vezes são mais eficientes em alguns parâmetros como a produção de etanol ou determinadas tolerâncias.

Em um trabalho realizado por Viana *et al.* (2020), através de sequenciamento genético foram avaliadas as linhagens de leveduras em uma unidade industrial sucroenergética por uma safra, mostrando que o fermento comercial PE-02 o qual foi iniciada a safra, não prevaleceu até o final, sendo o processo dominado por leveduras nativas as quais não trouxeram prejuízos ao processo.

No trabalho de Cabanãs *et al.* (2019), foram testadas 8 cepas de leveduras, identificadas como *S. cerevisiae*. O autor avaliou a tolerância dessas cepas em relação a inibidores como ácidos orgânicos e sulfúrico e verificou que uma dessas cepas apresentou um bom rendimento em etanol e tolerância a esses inibidores, ressaltando a importância de estudar cepas nativas já adaptadas as condições de processo.

Muller *et al.* (2020), ao testarem leveduras comerciais denominadas PE-02 e FT-858 juntamente com a levedura de panificação comercialmente chamada de "*Fleischmann*", verificaram que as cepas comerciais mostraram maior tolerância a temperatura e etanol.

No entanto, ainda existem desafios significativos a serem superados no que diz respeito a encontrarmos as melhores cepas de levedura para os processos industriais, como a utilização incompleta dos substratos, baixa tolerância, tolerância ao etanol, presença de inibidores e subprodutos tóxicos. É necessário um esforço colaborativo para aprimorar as cepas industriais existentes e explorar a vasta biodiversidade disponível, visando desenvolver novos fenótipos promissores. A ciência desempenha um papel fundamental nesse processo, utilizando abordagens como a genômica funcional para direcionar mudanças metabólicas e aumentar a eficiência da produção de etanol.

A compreensão desses desafios e o desenvolvimento de soluções inovadoras são essenciais para impulsionar a indústria do etanol e avançar em direção a um futuro mais sustentável (FERNANDES, *et al.* 2022).

3.3.2 BACTÉRIAS

As bactérias lácticas constituem um grupo heterogêneo, onde são capazes de fermentar carboidratos tendo como principal produto dessa fermentação o ácido láctico, podendo esta ser encontrada nos mais diversos ambientes abundantes de nutrientes vegetais, animais e até no interior do corpo humano. São organismos normalmente não patogênicos e por sua grande adaptabilidade são muito usados na área industrial, podendo ser divididos em homofermentativas e heterofermentativas, onde a primeira tem como principal produto final gerado o ácido láctico e as heterofermentativas apresentam como produto final o ácido láctico podendo também produzir etanol, acetato e CO₂ (FARIA-OLIVEIRA, 2015).

Bactérias lácticas são muito abundantes nos processos de fermentação etanólica, principalmente pela falta de assepsia característica do processo e pela afinidade com o ambiente propiciado: altas temperaturas e tolerância ao etanol (ANDRIETTA *et al.*, 2007).

Raposo *et al.* (2018) dizem que cada planta de etanol tem a sua própria composição microbiana, que podem variar por vários fatores bióticos e abióticos, sendo eles, tipo de solo, clima e temperatura, variedade de cana, período de colheita e o mix de produção de etanol e açúcar.

Segundo Lucena *et al.* (2010), que avaliou a abundância da microbiota de quatro unidades industriais sucroenergéticas, a maioria das bactérias encontradas são do gênero *Lactobacillus*. Ela cita a predominância de *Limosilactobacillus fermentum* e *Lactobacillus vini*. Citando a tendência na redução da variedade de espécies do gênero *Lactobacillus* com o passar dos ciclos ou bateladas, sendo esta uma possível seleção e resistência a antimicrobianos, além de tolerância ao etanol.

Beckner (2011) cita que o processo de fermentação foi projetado para ocorrer na presença de microrganismos contaminantes, sejam elas bacterianas ou por leveduras e não importa o tipo de precaução tomado, essas contaminações irão ocorrer naturalmente e podem levar a uma queda de produção de 2 a 22% e também foi citado por Góes-Favoni *et al.* (2018) que contaminações bacterianas acima de 10^5 já são prejudiciais ao processo fermentativo pela formação de ácidos orgânicos e consumo de açúcares.

Freitas e Romano (2013) já trazem a visão de que apenas contaminações bacterianas acima de 10^7 UFC/mL são prejudiciais ao processo fermentativo, ocasionando perdas significativas. E que as bactérias de maior predominância são as gram positivas, o que já havia sido citado por Gallo (1989), também ressaltando serem em sua maioria bastonetes e não esporuladas, sendo o predominante o gênero *Lactobacillus*. Dentre os *Lactobacillus* identificados, predomina *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, seguido de 13 outras linhagens do mesmo gênero.

Skinner (2004) também mostra que 44 a 60% das bactérias contaminantes são *Lactobacillus* na fermentação por milho. Oliva-Neto (1990) também ressalta que os *Lactobacillus* são as bactérias predominantes, com evidência ao *L. fermentum* que é resistente a até 10% de etanol, além da sua capacidade de flocular as leveduras.

Ao avaliar os trabalhos citados, é possível verificar que o gênero *Lactobacillus* predomina dentro da produção de etanol como contaminante e assim como as leveduras, as bactérias também sofrem influência das condições de processo, selecionando as mais resistentes e adaptadas ou aquelas que interagem melhor com a diversidade dos microrganismos presentes.

3.3.3 INTERAÇÕES MICROBIANAS

A busca pelo entendimento da interação entre bactérias contaminantes e as *Saccharomyces* em condições industriais de fermentação etanólica vem sendo objeto de pesquisas. Já foi evidenciado que o ácido acético, ácido láctico e a competição por nutrientes são as principais causas malélicas dessa interação, causando perdas na produção de etanol de 2 a 22%, uma vez que esses ácidos orgânicos podem entrar na membrana celular das leveduras, se dissociarem e acidificar o citoplasma, mas que não explicam totalmente essa queda e que podem existir outros metabólitos gerados pelos *Lactobacillus* que podem influenciar nessa interação, tanto positiva quanto negativamente (BECKNER, 2011; GOMES, 2009; OLIVA-NETO, 1990; WONGSURAKUL *et al.*, 2022).

A proporção entre as populações de leveduras/bactérias traz diferentes resultados em relação à produtividade, crescimento das leveduras e velocidade de biotransformação. A bactéria *L. fermentum* pode, além de causar floculação das leveduras durante a fermentação,

diminuir a viabilidade das leveduras *S. cerevisiae* para valores próximos à zero em um período curto de 12 horas após o término da fermentação (OLIVA-NETO, 1990).

Muitos metabólitos dessa bactéria também causam prejuízos à fermentação mesmo após serem atenuados com tratamentos térmicos e antimicrobianos. Por outro lado, foi verificado que a interação entre *L. plantarum* e *S. cerevisiae* pode ser positiva, proporcionando a levedura uma maior tolerância ao etanol que se dá devido a uma produção facilitada de glicerol, que irá promover um aspecto de proteção às células (DONG; LIN; LI, 2015).

A interação benéfica entre as bactérias e leveduras do processo fermentativo é apresentado por Xu *et al.* (2021), onde a floculação causada pelo *L. vini* às *Saccharomyces* criam uma barreira física à toxicidade do etanol por diminuírem a superfície de contato. A interação entre *L. fermentum* e *S. cerevisiae*, no qual foi estudado em específico a levedura comercial PE-02, mostrou-se negativa, pois foram obtidos resultados de produtividade em etanol e quantidade de açúcares residuais inferiores nessa interação do que com a levedura comercial PE-02 isoladamente (REIS *et al.*, 2018). A interação entre *L. fermentum* e diferentes linhagens comerciais de leveduras (PE-02, BG-1, CAT-1, IZ-1904 e levedura de panificação) em relação à atividade de invertase, mostrou que não houve diferença significativa na atividade de invertase de cada linhagem de levedura estudada e a contaminação bacteriana (CARVALHO, *et al.*, 2015). Gomes (2009) mostrou que a produção de ácido acético e láctico contribuem para a redução na eficiência fermentativa e cita que nos ensaios das leveduras com bactérias homofermentativas, os valores para glicerol foram menores, o que pode ser concluído como uma menor produção pelas leveduras ou até o consumo pelas bactérias. O provável consumo do glicerol por bactérias homofermentativas também foi verificado no trabalho de Basso *et al.* (2014).

A presença de ácidos orgânicos pode ser um interferente na velocidade de biotransformação das leveduras, sendo que essa conversão fica inibida acima de 6g/L de ácido (Acidez Sulfúrica). (OLIVA-NETO, 1990). Wongsurakul, *et al.*, (2022) cita o aumento de metabólitos como ácido láctico e ácido acético e esses metabólitos não dissociados atravessam a membrana celular das células de levedura, liberando íons de hidrogênio e inibindo a produção de etanol. Esse processo leva à redução do pH e à diminuição da produção de etanol.

Nobre; Horii; Alcarde (2007) demonstraram que somente a interação com *L. fermentum* em testes onde acidificação do meio foi realmente intensa é que causou queda na viabilidade celular da *S. cerevisiae*, sendo que o *L. plantarum* e *Bacillus subtilis* não causaram danos a viabilidade das leveduras. Basso *et al.* (2014) testou a interação de bactérias homo e heterofermentativas (*Lactiplantibacillus plantarum* e *Limosilactobacillus fermentum* respectivamente) juntamente com a levedura comercial CAT-01. Os autores relatam que nos testes isolados com as bactérias homofermentativas existe uma preferência pela glicose

enquanto as heterofermentativas tem preferência pela frutose, sendo que as heterofermentativas consumiram toda a frutose do meio, produzindo em mesma quantidade o manitol. O ácido láctico, como esperado, foi o único metabólito produzido pelas homofermentativas, enquanto as heterofermentativas produziram em sua maioria manitol, seguido por ácido láctico e acético, sendo este um fato importante ao se considerar a análise de manitol como parâmetro de contaminação, uma vez que só foi detectado por bactérias heterofermentativas. Nos testes realizados com a presença da levedura, concluiu-se que a presença de bactérias heterofermentativas se mostraram mais prejudiciais em relação à produção de etanol e viabilidade de células de leveduras, sugerindo antimicrobianos específicos a essas cepas para controle dessas populações. Em contrapartida, apesar da interação entre *Lactiplantibacillus plantarum* e *S. cerevisiae* causar aglomeração de células por floculação e reduzir o crescimento das leveduras, este mesmo efeito faz com que a levedura tenha uma maior tolerância ao etanol (DING *et al.*, 2021). Em contradição a esse argumento, o trabalho de Makanjuola; Tymon; Springham (1992) supõe que o *L. plantarum* causa floculação às leveduras e que essa floculação foi o fator para inibição da produção de etanol.

Lino *et al.* (2021) conduziram diversos ensaios fermentativos avaliando os consórcios microbianos de *L. amylovorus*, *Limosilactobacillus fermentum*, *L. helveticus*, *Pediococcus claussenii*, e *Zymomonas mobilis* com a levedura *S. cerevisiae*. Dentre os resultados obtidos está a interação positiva em todos os consórcios microbianos que continham o *L. amylovorus*, que obteve maiores índices de produção de etanol e crescimento das células de levedura. Ao verificar essa interação positiva, o autor desenvolveu outros testes com esses mesmos microrganismos e concluiu que as leveduras assimilavam o acetaldeído, produzido pelo *L. amylovorus*, levando assim a um aumento na produção de etanol, ultrapassando até a produção máxima possível com os açúcares disponíveis. Também apresentando menor produção de glicerol. Os benefícios da sinergia do *L. amylovorus* na fermentação também são comprovados no trabalho de Rich *et al.* (2018), juntamente com o *L. plantarum*, *L. casei* e *L. pontis*, sendo estes considerados microrganismos benéficos por mostrarem que uma fermentação conduzida com os mesmos, juntamente com *L. fermentum*, que comprovadamente causa prejuízos a fermentação (REIS *et al.*, 2018; OLIVA-NETO, 1990), produziu teores de etanol equivalentes a uma fermentação somente com leveduras e ausência de bactérias, enquanto que uma fermentação conduzida somente com o *L. fermentum* e *S. cerevisiae* apresentou decréscimo na produção de etanol. Dessa forma, manter ou estimular via inoculação uma fermentação na presença desses microrganismos benéficos poderia reduzir o consumo de antimicrobianos, uma vez que sua presença reduz os efeitos negativos de outros microrganismos que gerariam perdas ao processo (RICH *et al.*, 2018).

O trabalho de Chin; Ingledew (1994) nos traz novamente uma controvérsia em relação a essas interações microbianas e ao *L. fermentum*, anteriormente citado como um microrganismo maléfico a fermentação etanólica. Neste trabalho, mesmo em concentrações de $1,5 \times 10^8$ células por mL, o *L. fermentum* não causou redução na produção de etanol em fermentação de trigo, somente um decréscimo no crescimento celular da levedura.

As interações entre organismos podem existir de inúmeras formas, sendo essas positivas, negativas e até neutras. Um microrganismo pode induzir uma mudança no meio que de alguma forma induz o crescimento de outro, tornando-se uma interação positiva. Ele também pode produzir substância que inibe o crescimento, que seja tóxica ou simplesmente pela competição de alimento e nutrientes. Quando ela é neutra, a coexistência dos microrganismos não afeta em nada o outro, sequer pela concorrência pela mesma fonte de carbono. E essas interações podem não envolver apenas dois organismos, mas uma comunidade inteira. As interações podem chegar a nível de linhagens, já que elas podem mudar entre negativas, positivas ou neutras dentro da mesma espécie (TORRES-GUARDADO *et al*, 2021).

Cada um desses organismos contribui de uma forma específica dentro da comunidade. E essas comunidades que são formadas podem ser muito sensíveis à adição de novos organismos, assim como, a retirada dos mesmos (BAIREY *et al.*, 2016).

As interações microbianas citadas por Ponomarova, *et al.* (2017), mostram que a levedura *S. cerevisiae* secreta metabólitos, incluindo aminoácidos e vitaminas, em ambientes ricos em nitrogênio, que não só permitem a sobrevivência de *L. plantarum* e *Lactococcus lactis*, como facilitam seu crescimento. A quantidade de nitrogênio e o estado das vias de repressão catabólica do nitrogênio na levedura é que modulam essa interação. O excesso de nitrogênio beneficia o *L. plantarum* em meio de suco de uva e promove o mutualismo com o *L. lactis* em meio com lactose. Os resultados deste estudo, destacam a importância das diferenciações metabólicas individuais de cada espécie na dinâmica das comunidades microbianas.

O trabalho de LIU *et al.* (2015) debate sobre a dificuldade em se estudar as interações microbianas na fermentação alcoólica do vinho, citando a produção de metabólitos estar ligada a presença/ausência de determinados microrganismos, das interações entre levedura x levedura (com a introdução de leveduras naturais), bactérias x bactérias, bactérias x leveduras e até com fungos que possam estar presentes no meio. Também discute sobre a presença de sinais extracelulares chamados de “quorum sensing”, que são capazes de transmitir informações relacionadas a densidade celular e condições ambientais.

O estudo das interações microbianas industriais é de suma importância a fim de se entender a relação entre estas comunidades para se obter produtos de interesse ou que seja atingido um equilíbrio operacional adequado, permitindo a obtenção de elevados rendimentos.

Além disso, pouco se sabe sobre as rotas regulatórias que levam um microrganismo a secretar metabólitos valiosos que podem formar uma base de troca de metabólitos entre espécies e toda a controvérsia encontrada dentre os trabalhos estudados nos leva a questionar o quão complexa são essas interações, podendo estas estar ligadas aos diferentes tipos de linhagem de cada microrganismo, peculiaridades da nutrição e composição de cada meio e excreção dos metabólitos.

O entendimento da interação entre microrganismos durante o processo de fermentação nas indústrias de alimentos, por exemplo, leva a melhorias na quantidade de nutrientes disponíveis nos produtos, com metabólitos que fazem bem a saúde humana. Além disso, isso aprimoram o sabor, aroma e textura dos alimentos e até pode aumentar o tempo de conservação, além de facilitar a digestão.

Dentro da indústria sucroenergética, o entendimento da influência deste consórcio microbiano nos parâmetros cinéticos de processo poderá indicar o quanto poderá ser vantajoso financeiramente manter um nível de contaminantes considerando os custos operacionais envolvidos com o seu controle.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 INÓCULOS

Os microrganismos escolhidos para os testes fermentativos de culturas mistas foram a levedura comercial PE-02, obtida através da coleção de culturas do LABMAC (Laboratório de Microbiologia e Controle) da UFSCar e algumas das bactérias citadas na literatura, tais como o *Lactiplantibacillus plantarum* CCT5852 (ATCC19255) e *Limosilactobacillus fermentum* CCT5852 (ATCC19255), obtidos através da coleção de culturas do LAMAM (Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular) da UFSCar, cedidos pela Prof. Dra. Sandra Ceccato-Antonini.

O *Lactobacillus amylovorus* (ATCC 33620) e *Lactobacillus helveticus* (IFO 150191) foram adquiridos da coleção de culturas do instituto Paulo Tosello.

Todos os microrganismos foram escolhidos de acordo com literaturas de possíveis interações positivas e disponibilidade comercial da cepa (LINO, *et al.*, 2021; DONG, *et al.*, 2015; BASSO, *et al.*, 2014; RICH *et al.*, 2018).

4.2 PREPARO DAS CULTURAS PURAS

Os inóculos foram ativados e propagados em meio YPD (extrato de levedura 10 g/L, glicose 20 g/L, peptona 20 g/L, ágar 20g/L) para as leveduras e MRS (peptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, citrato de amônio 2 g/L, glicose 20 g/L, fosfato de dipotássio 2 g/L, sulfato de magnésio 0,58 g/L, sulfato de manganês 0,28 g/L, extrato de carne bovina 10 g/L, tween-80 1 mL) para as bactérias, como proposto por Ceccato-Antonini (2021) e mantidos em tubos *slant*, sob refrigeração. Os tubos contendo as culturas puras eram repicados quinzenalmente em placas de Petri, visando mantê-los viáveis durante todo o teste.

As placas contendo o meio YPD, usadas para repicagem das culturas puras das leveduras foram preparadas em fluxo laminar. As placas de levedura PE-02, foram incubadas a 30°C ± 2°C por 72h.

As placas contendo o meio MRS, usadas para repicagem das culturas puras das bactérias foram preparadas em fluxo laminar. As placas foram incubadas a 35°C ± 2°C por 48h.

Os tubos *slant* foram preparados a partir das placas de cultura pura, com os meios de cultura específicos para cada microrganismo, os quais eram repicados em fluxo laminar.

As culturas eram preparadas para início dos testes sempre seguindo o tempo necessário de crescimento, visando sempre manter uma cultura mais “fresca” possível,

principalmente para as bactérias, para que a morte celular não influenciasse na leitura da absorbância das células.

4.3 MEIO DE FERMENTAÇÃO SEMISSINTÉTICO

O meio semissintético de cultivo utilizado nos ensaios fermentativos é composto por 200 g L⁻¹ de sacarose, 10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 5 g L⁻¹ de KH₂PO₄ e 2 g L⁻¹ de NH₄Cl (VIEGAS, 2003). O meio foi esterilizado em autoclave à 120°C por 15 minutos.

4.4 CURVA PADRÃO DE CONCENTRAÇÃO CELULAR

A concentração celular dos microrganismos foi determinada por absorbância após construção prévia de uma curva padrão de UFC/mL x Absorbância.

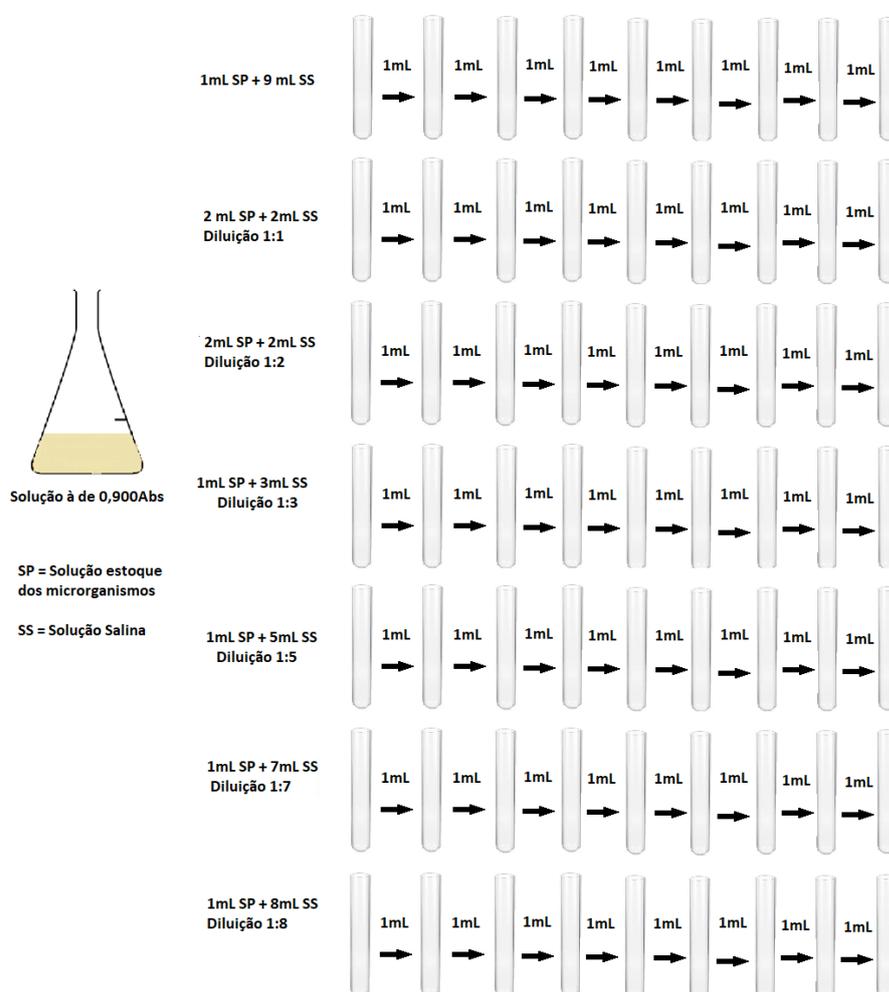
As concentrações celulares foram encontradas a partir de uma suspensão, resultante da inoculação das culturas puras dos microrganismos em solução salina 0,85% estéril, a qual era submetida a leitura em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 540nm, até adquirir um resultado em torno de 0,900 de absorbância.

Desta solução inicial foram realizadas diluições seriadas em triplicata e realizadas as leituras em absorbância, seguindo as diluições de 1:1, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7, 1:8 e 1:9. Para cada faixa de absorbância dentro de cada diluição obtida foram realizadas novas diluições seriadas para cada repetição (Figura 1) e faixa de leitura, a fim de que posteriormente pudessem ser inoculadas em placa de Petri em triplicata e as colônias atingissem 30-300 UFC/mL por placa e assim pudesse ser feita a correlação com as absorbâncias encontradas.

Para o plaqueamento final, para as leveduras, foi utilizada a técnica de plaqueamento por superfície em meio YPD. Para as bactérias, foi usada a técnica de plaqueamento por profundidade (ou *pour plate*) em meio MRS. As leveduras foram incubadas à 30°C por 4-5 dias e as bactérias à 35°C por 48h (CECCATO-ANTONINI, 2021).

As curvas foram refeitas até que fosse encontrado um coeficiente de determinação (R²) acima de 0,95.

Figura 1 - Esquema dos ensaios e diluições necessárias para construção da curva padrão dos microrganismos



4.5 ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO MISTA

Após a determinação da concentração celular de cada microrganismos por absorbância foi possível iniciar as fermentações mistas. A partir de dois *slant* de cultura pura, foi feita uma suspensão de células com solução salina 0,85% estéril e medida a absorbância em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540nm.

Ajustes eram realizados em relação a diluição dessa suspensão de células para atingir assim a concentração desejada para iniciar o experimento, no qual seriam testadas as concentrações de 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 UFC/mL para as bactérias.

Os experimentos foram realizados todos em triplicada, em frascos Erlenmeyers de 250 mL previamente pesados e esterilizados.

Foi acrescentado 90 mL do meio sintético de sacarose esterilizado, o qual também foi pesado e posteriormente inoculado com 10 mL da suspensão de células mistas na concentração celular desejada (5,0mL de leveduras e 5,0mL da bactéria específica de cada experimento).

As concentrações celulares e delineamento experimental estão na Tabela 1, sendo que foram usadas quatro bactérias lácticas, em quatro concentrações diferentes e um experimento contendo a cultura mista das 4 bactérias utilizadas individualmente. A cada rodada era realizado um experimento controle somente com a levedura PE-02. A concentração de leveduras foi sempre mantida em aproximadamente 10^8 UFC/mL.

Os Erlenmeyers foram mantidos em temperatura de 34°C, por 24 horas, sob agitação de 130 rpm, distribuídos em ordem randômica dentro da incubadora, visando manter heterogeneidade no posicionamento, por exemplo, pela entrada de ar e a disposição dos frascos.

Após 24 horas de fermentação o conteúdo dos Erlenmeyers foi pesado e centrifugado por 10 minutos à 3300rpm. No sobrenadante foram conduzidas as determinações analíticas.

Ao final dos testes, antes da centrifugação, também foi realizado plaqueamento em triplicata para checagem das populações de microrganismos após a fermentação. Por se tratar de culturas mistas, aos meios de cultura específicos (YPD para as leveduras e MRS para as bactérias) foram incorporados os antibióticos Ampicilina 500mg e Tetraciclina 500mg, para inibição do crescimento de bactérias e Actidione para inibição do crescimento de leveduras, de acordo com metodologia adaptada proposta por Ceccato-Antonini (2021).

Foram realizadas quatro pesagens em balança analítica para determinação do balanço de massa da fermentação, sendo estas, dos frascos vazios, dos frascos com meio de cultura, dos frascos com meio e microrganismos e ao final da fermentação.

Tabela 1- Delineamento experimental em triplicata.

Experimento	Concentração (UFC/mL)	Bactérias	Concentração (UFC/mL)
1	A concentração de leveduras desejada foi sempre de 1×10^8 para todos os experimentos	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	1×10^5
2			1×10^6
3			1×10^7
4			1×10^8
5		<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	1×10^5
6			1×10^6
7			1×10^7
8			1×10^8
9		<i>Lactobacillus helveticus</i>	1×10^5
10			1×10^6
11			1×10^7
12			1×10^8
13		<i>Lactobacillus amylovorus</i>	1×10^5
14			1×10^6
15			1×10^7
16			1×10^8
17		<i>Cultura Mista: Lactobacillus amylovorus, Lactobacillus helveticus, Lactiplantibacillus plantarum e Limosilactobacillus fermentum</i>	1×10^5
18			1×10^6
19			1×10^7
20			1×10^8
21			CONTROLE

4.6 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

4.6.1. DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS, GLICEROL E ETANOL

Para determinação de ácidos orgânicos (ácido láctico e ácido acético), glicerol e etanol no sobrenadante ao final da fermentação e no caldo sintético foi usado o cromatógrafo da marca Shimadzu equipado com a coluna Rezex™ ROA-Organic Acids H+ (8%), LC Column 150 x 7.8 mm, Ea. Com software de integração Lab-solutions, Chromeleon 7. A fase móvel 0,005N H₂SO₄ com fluxo de 1,0 mL/min. Temperatura de trabalho no compartimento do amostrador de 15°C, temperatura do compartimento do detector 35°C e da coluna 80°C.

O equipamento utilizado é de propriedade da empresa Raízen, localizado no Laboratório do E2G (Etanol de Segunda Geração) na cidade de Piracicaba/SP, o qual foi gentilmente cedido para análise das amostras. Todas as amostras foram filtradas em microtubo de 1,5 mL utilizando seringa não estéril e filtro de 0,25 µm.

4.6.2 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES

Para determinação de açúcares (sacarose, glicose e frutose) no sobrenadante e no meio semissintético foi utilizado o cromatógrafo da marca Thermo Fisher, com detector amperométrico e coluna CarboPac SA10 de 4 µm com fase móvel de KOH 1,5 mM e fluxo de 1,8mL/min. A temperatura de trabalho do compartimento do amostrador é de 15°C, do compartimento do detector de 20°C e da coluna de 45°C com corrida de aproximadamente 10-12 minutos.

O equipamento utilizado é de propriedade da empresa Raízen, localizado no Laboratório do E2G (Etanol de Segunda Geração) na cidade de Piracicaba/SP, o qual foi gentilmente cedido para análise das amostras. Todas as amostras foram filtradas em microtubos de 1,5 mL utilizando seringa não estéril e filtro de 0,25 µm.

4.7 EFICIÊNCIA FERMENTATIVA GLOBAL

A eficiência fermentativa foi calculada se baseando na equação estequiométrica de obtenção do etanol a partir da sacarose, citada por Fernandes (2011), na qual cada molécula de sacarose na presença de água gera quatro moléculas de etanol e quatro moléculas de CO₂.

Para calcular a eficiência fermentativa foram usados os resultados das análises de etanol e ART (açúcares redutores totais) do vinho e do meio semissintético. As massas foram determinadas via pesagem dos frascos no início e final da fermentação, descontando o peso

dos frascos (tara) e a massa de microrganismos. O cálculo foi realizado de acordo com a equação abaixo:

$$Eficiência Fermentação = \frac{Massa Etanol (g)}{(Massa ART (g) * 0,511)} \times 100 \quad (Eq. 2)$$

$$Massa etanol (g) = Massa Final Vinho (g) * Etanol (g/L) \quad (Eq. 3)$$

$$Massa ART (g) = Massa de Meio de Cultura (g) * ART (g/L) \quad (Eq. 4)$$

A partir dos números gerados calculamos eficiência da fermentação e dessa forma foi possível comparar as eficiências entre os diferentes tratamentos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CURVA PADRÃO DE CÉLULAS

A construção das curvas padrão (UFC/mL vs. Absorbância) foi essencial para garantir a precisão no monitoramento das concentrações de cada microrganismo envolvido nas fermentações mistas. Como o experimento envolveu a interação de duas espécies microbianas, era crucial determinar com exatidão a concentração inicial de cada uma antes da inoculação. Sendo assim, a partir da medida da absorbância da suspensão celular em solução salina a 0,85% foi possível correlacionar essa medida com a concentração celular determinada por plaqueamento (UFC/mL). Esse procedimento permitiu não apenas a padronização e a reprodutibilidade dos experimentos, mas também assegurou que as condições de inoculação fossem controladas e precisas, fator indispensável para a interpretação dos resultados das fermentações mistas.

Após algumas tentativas de obtenção das curvas padrão para as bactérias, com valores de absorbâncias a 0,5 e 540 nm para de $2,0 \times 10^9$ UFC/mL, inferiores aos relatados na literatura (NETO, 2019), partiu-se para a utilização de culturas recém repicadas. Assim, com um intervalo mínimo de espera, as correlações foram diferentes porque a absorbância da suspensão era predominantemente devido à presença de células viáveis. Após essa adaptação, foram encontrados resultados satisfatórios para que fosse dada continuidade aos experimentos. Assim, as figuras 2, 3, 4 e 5 apresentam as curvas-padrão para *Lactiplantibacillus plantarum*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactobacillus amylovorus* e *Lactobacillus helveticus*, respectivamente, em todos os casos com R^2 superior a 0,95 em todos os casos.

Figura 2 – Curva Padrão para *Lactiplantibacillus plantarum*.

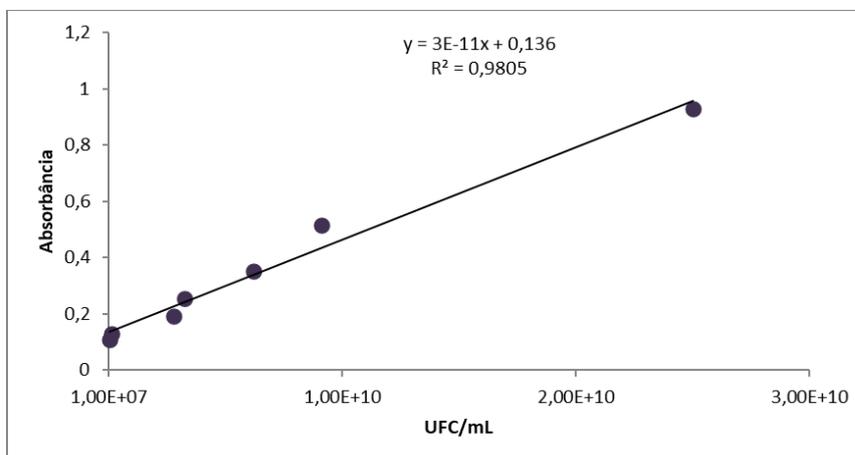
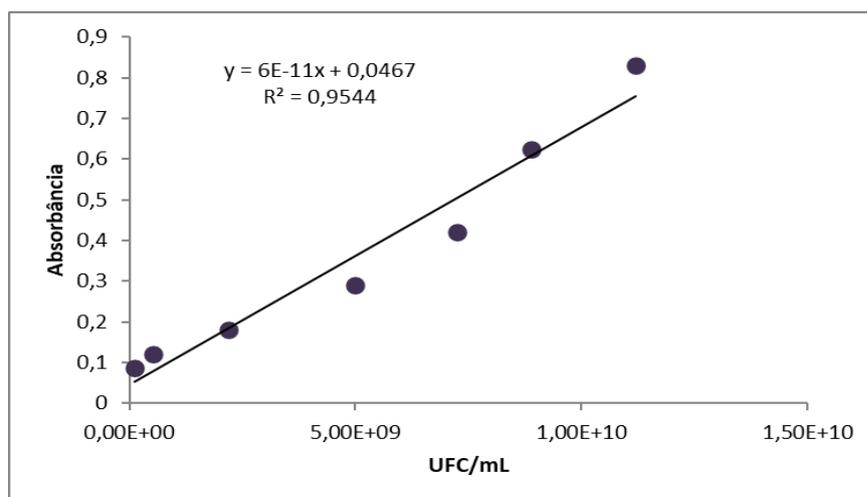
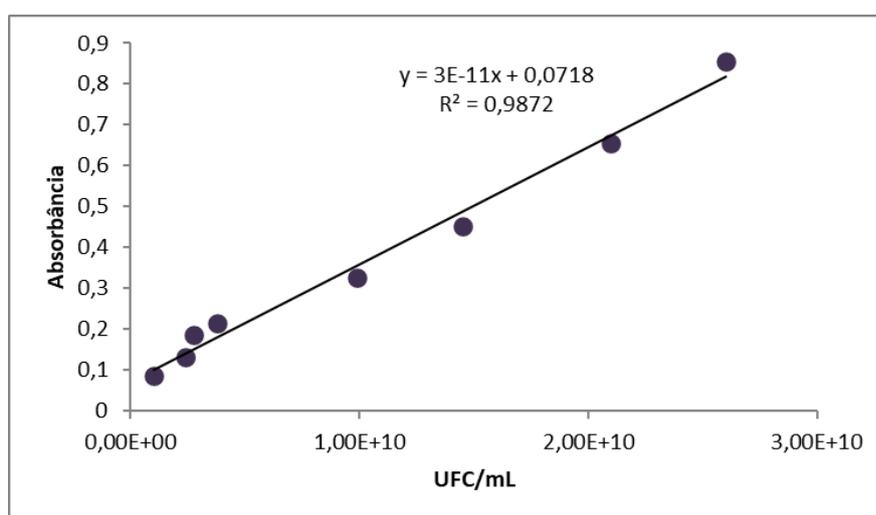
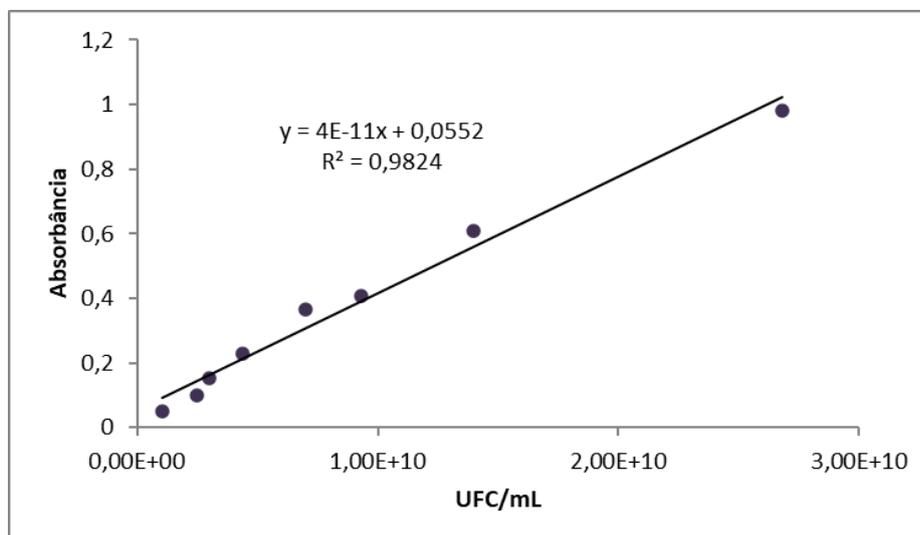


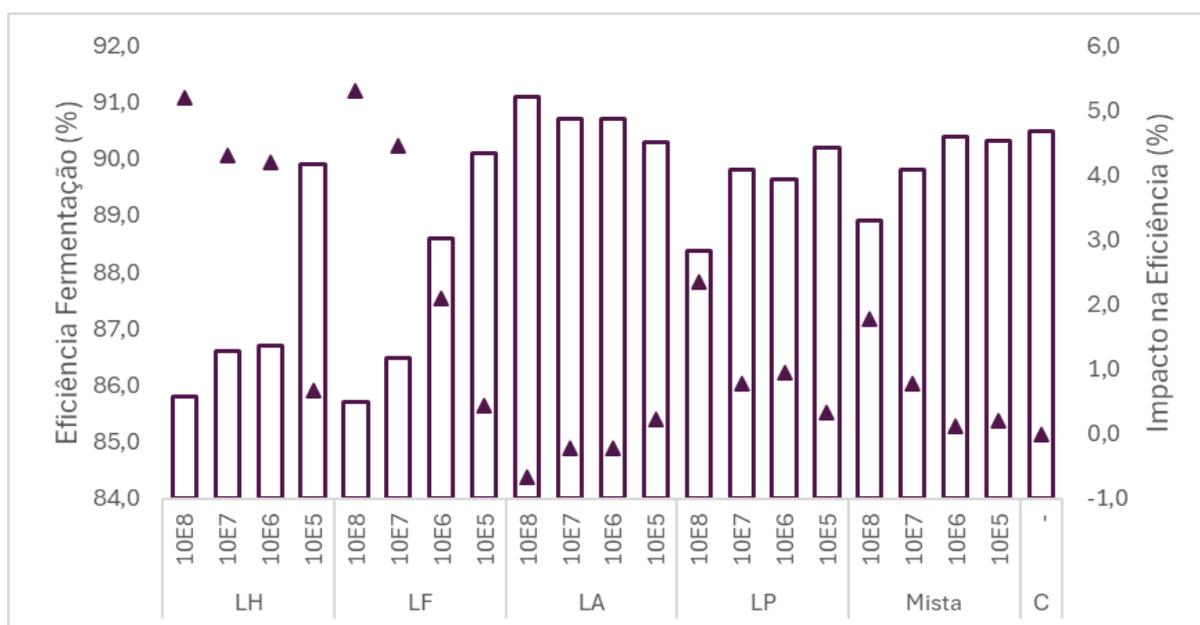
Figura 3 – Curva Padrão para *Limosilactobacillus fermentum*.Figura 4 – Curva Padrão para *Lactobacillus amylovorus*.Figura 5 – Curva Padrão para *Lactobacillus helveticus*.

5.2 EFICIÊNCIA FERMENTATIVA GLOBAL

Após determinação analítica das amostras e balanço de massa das fermentações, foram avaliadas as relações entre as diferentes combinações de tipos de *Lactobacillus* estudados e as devidas concentrações celulares em relação à eficiência de fermentação. Os resultados foram comparados com o experimento controle apenas com leveduras (Figura 6).

Observa-se que todos os *Lactobacillus*, quando em concentrações de 10^5 UFC/mL, não exerceram impacto na eficiência de fermentação (Figura 6), demonstrando que se a contaminação não ultrapassasse estes níveis nos biorreatores nessa concentração, não seria necessário ainda o controle microbiológico nas indústrias sucroenergéticas. É importante ressaltar que essa influência se torna mais significativa à medida que a concentração celular de alguns desses microrganismos aumenta. Destaca-se a notável influência negativa do *L. helveticus* sobre a fermentação, assim como o impacto do *L. fermentum*, um microrganismo amplamente presente em processos fermentativos no Brasil, conforme apontam os estudos de Oliveira-Freguglia e Horii (1991). Reis *et al.* (2018) destacaram que o *L. fermentum* reduz a produção de etanol, diminuindo a eficiência de fermentação, com sobras de ART no vinho. Os resultados mostraram um impacto negativo na eficiência de fermentação, chegando a uma redução de 5,7% na eficiência em relação a fermentação controle, quando o *L. fermentum* atingiu uma população de 10^8 UFC/mL, caindo para 4,8% na concentração de 10^7 UFC/mL, resultado um pouco diferente do que foi encontrado por Thomas *et al.* (2001) que obteve 12% de queda na eficiência com a presença do mesmo contaminante, na mesma concentração.

Figura 6 - Eficiência Fermentativa Global

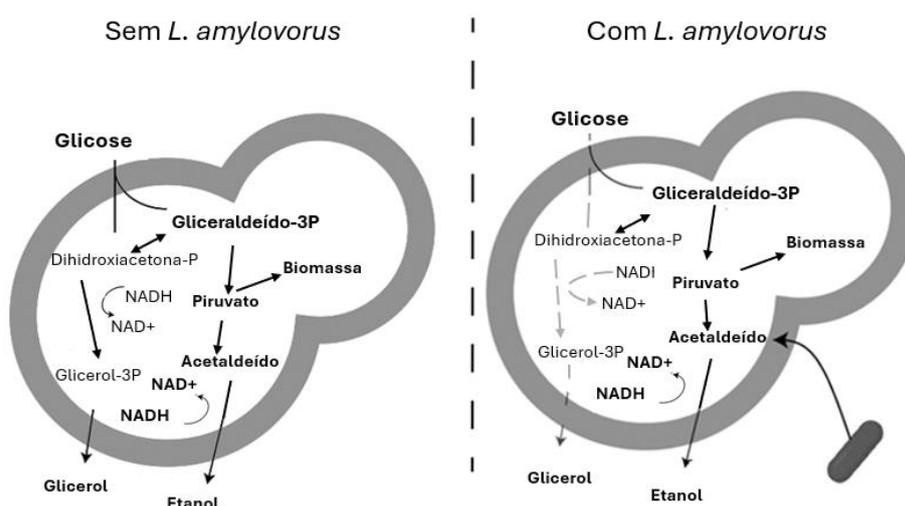


*Considerar para LA = *Lactobacillus amylovorus*, LF = *Limosilactobacillus fermentum*, LH = *Lactobacillus helveticus*, LP = *Lactiplantibacillus plantarum*, Cultura mista = todas as bactérias testadas, Controle = somente *S.cerevisiae*.

De acordo com os resultados obtidos, o *L. plantarum* demonstrou ter um efeito prejudicial em altas concentrações, ocasionando uma queda na eficiência de 2,1%, que se manteve tanto nas populações de 10^8 quanto 10^7 UFC/mL e um impacto desprezível nas menores concentrações testadas. Resultados distintos foram obtidos por Ding *et al.*, (2021), os quais concluíram que *L. plantarum* teria um efeito benéfico em sua interação. Mesmo sem permanecer ao longo do processo, o *L. helveticus* pode ser considerado o contaminante de maior impacto na fermentação, pois seu efeito negativo foi notado mesmo em concentrações de 10^6 UFC/mL. O impacto na eficiência obtida pela fermentação mista com o *L. helveticus* foi de 4,7% quando o mesmo estava presente em altas concentrações, em comparação com a fermentação controle.

Os ensaios indicaram que o *L. amylovorus* traz um impacto positivo detectável no rendimento da fermentação. Isso implica que, quanto maior a população deste microrganismo durante o processo fermentativo, maior é a eficiência obtida, conforme pode ser observado na Figura 6. Estes resultados estão de acordo com o reportado por Lino *et al.* (2021). Uma das hipóteses mais aceita é que o *L. amylovorus* beneficia as leveduras e, por consequência, eleva o rendimento da fermentação etanólica a partir da maior produção de acetaldeído. A ideia é que as leveduras utilizam o acetaldeído produzido pelas bactérias, minimizando as necessidades de obtenção de subprodutos como o glicerol para equilíbrio das formas oxidadas e reduzidas das coenzimas, resultando em um maior rendimento em etanol (Figura 7).

Figura 7 - Proposta de efeito do acetaldeído produzido por *L. amylovorus* na fisiologia das leveduras (Adaptado de Lino *et al.*, 2021)



Os efeitos estimulantes do acetaldeído são dependentes da concentração, uma vez que este pode tornar-se inibitório. O potencial redox das células de levedura é equilibrado por duas reações principais durante a anaerobiose: redução de diidroxiacetona fosfato em glicerol-3-fosfato ou pela redução do acetaldeído em etanol via álcool desidrogenase. Como a maior parte do fluxo de acetaldeído é direcionado à etanol, um fornecimento mais elevado de acetaldeído como acceptor de elétrons alternativo permitiria que as células reequilibrassem seus NADH/NAD⁺ quase que exclusivamente por esta via. Este redirecionamento do fluxo de carbono resultaria em maiores quantidades de etanol e células, minimizando as necessidades de produção de glicerol. Apesar destas hipóteses, a contribuição positiva do *L. amylovorus* para a eficiência da fermentação etanólica ainda é pouco explorada e bastante desconhecida.

Essas descobertas ressaltam a complexidade das interações de leveduras e bactérias na busca pela melhoria do desempenho das fermentações a partir de cana-de-açúcar no Brasil. Além disso, é fundamental entendermos a importância de cada microrganismo presente na microbiota destes processos. Neste sentido, podemos verificar na Figura 7 que nos ensaios com culturas mistas o impacto é menor do que isoladamente em culturas como *L. fermentum* e *L. helveticus*, porém os benefícios ainda desconhecidos do *L. amylovorus* não foram suficientes para manter um bom desempenho de fermentação em concentrações mais altas de bactérias, mas ainda superando os resultados dessas culturas isoladamente.

5.3. MONITORAMENTO DE METABÓLITOS

Durante o processo de fermentação, a levedura desempenha um papel vital na conversão de açúcares em etanol, no entanto, sob determinadas condições, a levedura desvia parte de seu metabolismo para a produção de ácido acético, em detrimento da produção de etanol e isso reduz a eficiência da produção de etanol (FERNANDES, *et al.*, 2022)

Nos resultados obtidos, encontramos valores médios de ácido acético de 0,85 g/L. No trabalho de Vidal *et al.* (2015), os autores citam teores máximos de 0,5 g/L para ácido acético em fermentações de culturas puras de leveduras, também evidenciado por Reis, *et al.*, (2018), onde produção de ácido acético foi de 0,34–0,49 g/L, variando de acordo com a cepa de levedura utilizada, o meio de cultivo e até na presença de coculturas de leveduras e bactérias ou leveduras nativas. Já o trabalho de Thomas *et al.* (2001) traz valores de até 0,69g/L de ácido acético em culturas puras de leveduras.

Os dados obtidos indicam perfis diferentes de produção de ácido acético para as bactérias avaliadas. Assim, a constituição do meio, composto não somente pelos componentes do meio de cultura, mas também dos metabólitos secretados pelos microrganismos, é que parece exercer a maior influência na produção de ácido acético. Conforme reportado por Paraggio, *et al.* (2004) em estudos relacionados a fermentação para obtenção de vinho de uva, a

produção de ácido acético em culturas puras com diversas cepas diferentes de *S. cerevisiae* e diversas variedades de uva apresentaram resultados entre 0,12 a 0,98 g/L de ácido acético. Estes autores concluíram que não era possível definir que uma cepa é uma alta ou baixa produtora do ácido e que esse comportamento randômico estava muito mais ligado a composição do meio. De fato, as variações de pH, temperatura, concentração de nitrogênio e de açúcares são os principais fatores que influenciam nos diferentes valores de ácido acético encontrados (SHIMAZU; WATANABE, 1981; ROMANO, 1990; PARAGGIO, *et al.* 2004).

Para o experimento com *L. helveticus* na concentração celular inicial de 10^5 UFC/mL, não houve influência na produção do ácido, já que o valor se manteve perto do controle, mas assim que essa concentração inicial aumentou, os valores de ácido acético produzidos foram menores que do controle, ficando acima apenas no experimento com a concentração inicial de 10^8 UFC/mL. A presença do *L. helveticus* só influenciou a levedura a produzir mais ácido acético na concentração de 10^8 UFC/mL (Figura 8).

O experimento com *L. fermentum* também obteve uma produção alta de ácido acético apenas com a concentração inicial de 10^8 UFC/mL do contaminante, mantendo todas as demais concentrações próximas do obtido para o controle (Figura 9). A produção de ácido acético não foi alterada para as culturas mistas com o *L. plantarum*, independente da concentração inicial (Figura 10), em quaisquer concentrações, o resultado foi o mesmo. Já o *L. amylovorus* (Figura 11), nos traz resultados diferentes de todos os outros, onde quanto maior a sua concentração inicial, menor a produção do ácido. Na concentração de 10^5 UFC/mL chegou a 0,75 g/L, o que não é nada superior a resultados de ácido acético já encontrados em culturas puras de leveduras, mas demonstra mais uma vez que a composição do meio, incluindo as substâncias secretadas pela interação entre as bactérias e as leveduras influenciam também na produção de outros subprodutos, como o ácido acético.

Figura 8 – Concentração final de ácido acético produzido durante os ensaios de fermentação etanólica com *L. helveticus*

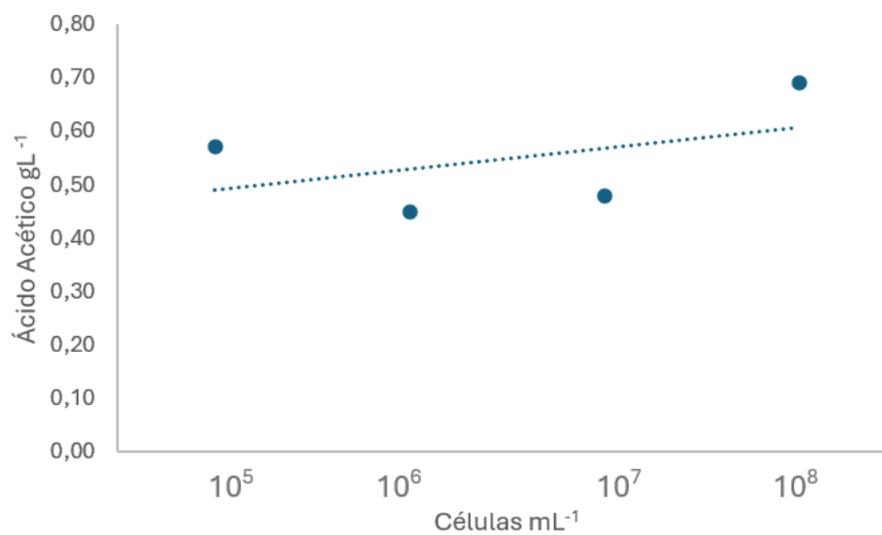


Figura 9 - Concentração final de ácido acético produzido durante os ensaios de fermentação etanólica com *L. fermentum*

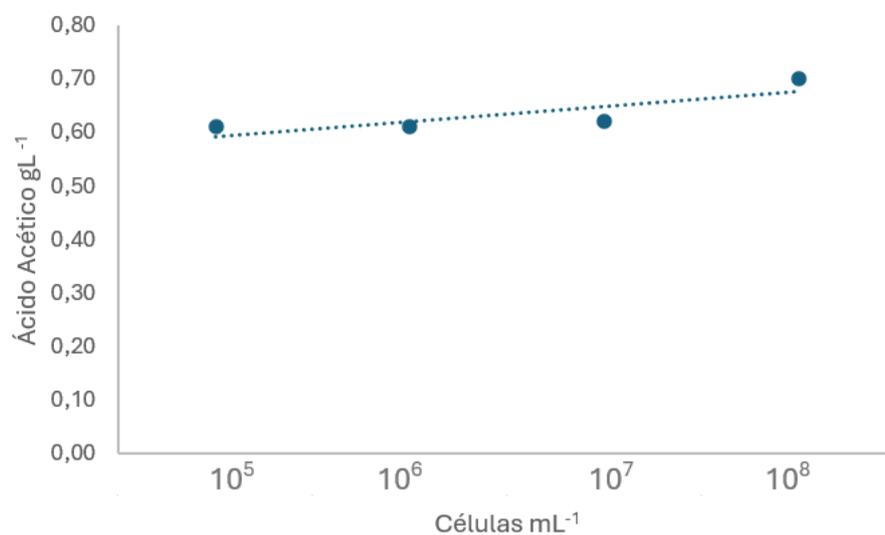


Figura 10 - Concentração final de ácido acético produzido durante os ensaios de fermentação etanólica com *L. plantarum*

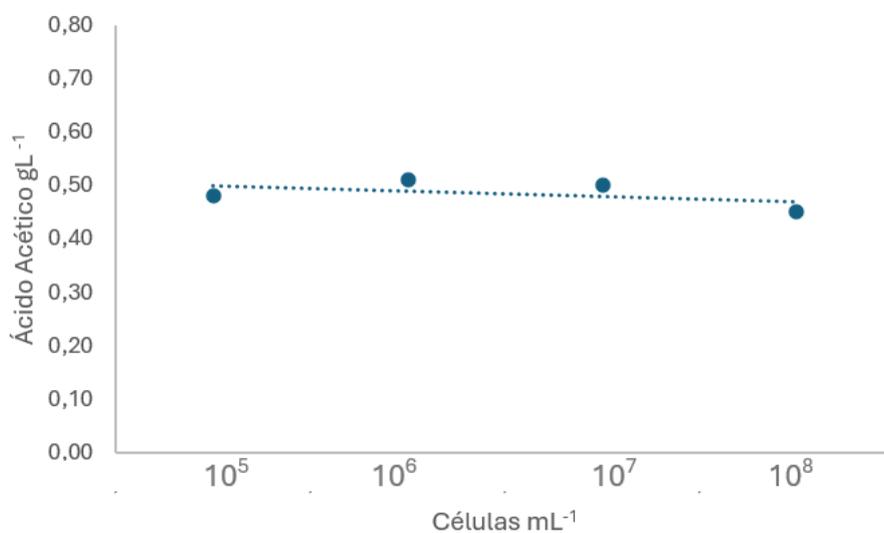


Figura 11 - Concentração final de ácido acético produzido durante os ensaios de fermentação etanólica com *L. amylovorus*

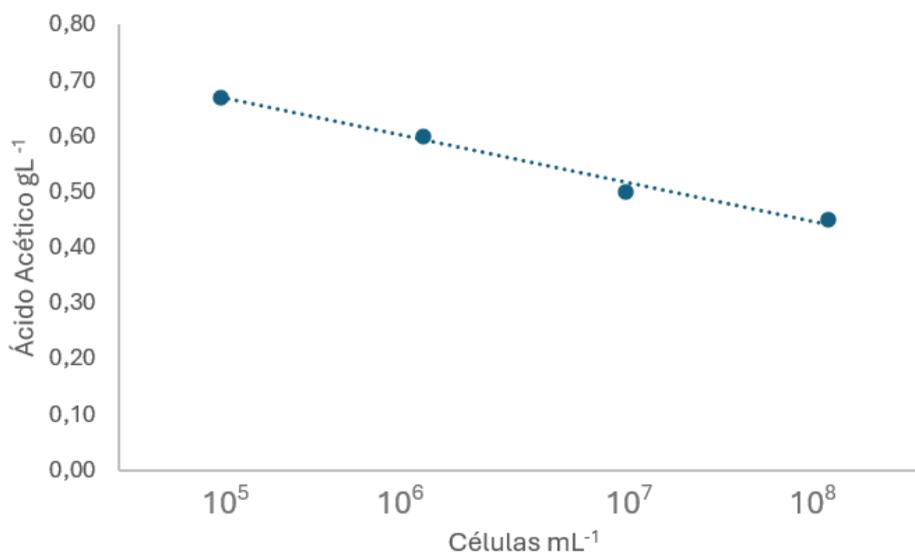
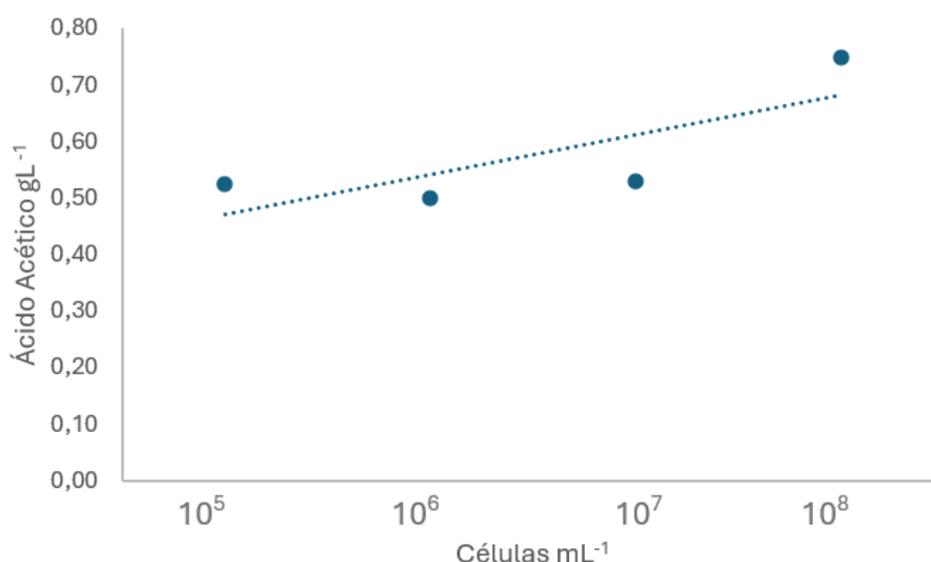


Figura 12 - Monitoramento de ácido acético produzido durante os ensaios de fermentação etanólica com cultura mista.



Os resultados obtidos nos experimentos para ácido láctico mostraram que cada linhagem de bactéria testada obteve uma produção diferente do ácido. Além disso, uma discreta produção de ácido láctico foi detectada no controle, onde havia presença apenas das leveduras. Isto já havia sido evidenciado por Pronk *et al.* (1996) e Thomas *et al.* (2001), os quais destacaram que se observa uma produção mínima de D-lactato em culturas de *S. cerevisiae* e *Candida utilis*. Sugerindo uma possível participação da via do metilglicoxal, embora em taxas bastante reduzidas, como observado no experimento.

O *L. helveticus* foi o único microrganismo testado que apresentou produção de ácido láctico em todas as concentrações celulares iniciais testadas. O que corrobora com o trabalho de Ai *et al.* (2015) que após testar 27 cepas, evidenciou que o *L. helveticus* foi a que obteve maior produção do ácido láctico. Mas também evidencia que a composição do substrato tem fator determinante nessa produção. O fato de esta bactéria ter uma produção elevada de ácido láctico faz com que seja muito usada em indústrias lácteas, onde Denis *et al.* (1986) também demonstraram que *L. helveticus* foi a cepa mais eficaz na fermentação de soro de leite devido à alta produção de ácido láctico quando comparada com outras bactérias lácticas.

Sua importância, no entanto, não pode ser descartada em relação ao impacto dentro da fermentação etanólica, já que mesmo não permanecendo durante todo o processo de fermentação provavelmente por se tratar de um microrganismo nutricionalmente exigente, sendo ele auxotrófico para vários aminoácidos, como Arg, Glu, His, (CHRISTIANSEN *et al.*, 2008; KIDO *et al.*, 2021) foi capaz de produzir uma quantidade de ácido láctico de 1,2g/L quando sua concentração inicial foi de 10⁸ UFC/mL e impactar negativamente na eficiência da fermentação (Figura 13).

Os experimentos em que foram testados os contaminantes *L. fermentum* e *L. plantarum*, apresentaram similaridade na produção de ácido na concentração celular inicial de 10^8 UFC/mL, apresentando também resultados de 1,2 g/L. Nas demais concentrações iniciais celulares ambos apresentaram novamente bastante similaridade nos resultados obtidos, inclusive nas concentrações iniciais de 10^5 e 10^6 UFC/mL, onde não foi detectada produção do ácido (Figuras 14 e 15).

Já o *L. amylovorus* foi a bactéria que menos produziu ácido nas diferentes concentrações, com valores em torno de 1,0 g/L para 10^8 UFC/mL (Figura 16). Uma observação importante é que nas concentrações de 10^6 e 10^5 UFC/mL não foram evidenciadas produção de ácido láctico para todos os microrganismos, com exceção do *L. helveticus*.

Os resultados obtidos para o ensaio com cultura mista, na qual foram inoculados de maneira equalitária todos os microrganismos, sugerem que a presença do *L. helveticus* teve maior influência na produção de ácido láctico em todas as concentrações, comparando com os resultados individuais (Figura 17). O experimento foi realizado em apenas uma batelada e talvez com testes em maior número de bateladas, essa população do *L. helveticus* iria ser reduzida, pois nitidamente ele não permaneceu durante a fermentação, e essas concentrações de ácido láctico poderiam demonstrar resultados diferentes.

Diante das implicações observadas com os diferentes contaminantes testados em relação à eficiência da fermentação e à produção de ácido láctico, surge uma ponderação relevante: a abordagem atualmente utilizada nas indústrias de produção de etanol, que se baseia na quantificação do ácido láctico como indicativo de contaminação, pode não ser uma métrica confiável para todos os tipos de *Lactobacillus* e que isso pode variar muito principalmente considerando que as populações de microrganismos variam muito de unidade industrial para unidade industrial.

No entanto, conforme destacado por Lucena *et al.* (2010), o *L. fermentum* prevalece nos processos industriais de produção de etanol no Brasil e apesar de medirmos os efeitos isolados deste microrganismo neste experimento, a sua interação com as demais bactérias e leveduras presentes no meio, ainda são pouco conhecidas, já que mesmo o experimento contendo cultura mista pode ter tido uma influência maior do *L. helveticus* do que realmente poderia ocorrer nas unidades industriais. Dessa forma outros testes poderiam ser realizados com outros microrganismos em cultura mista, mas muitos estudos ainda seriam necessários para entender melhor essas interações.

Figura 13 – Concentração final de ácido láctico produzido durante os ensaios de fermentação etanólica com *L. helveticus*

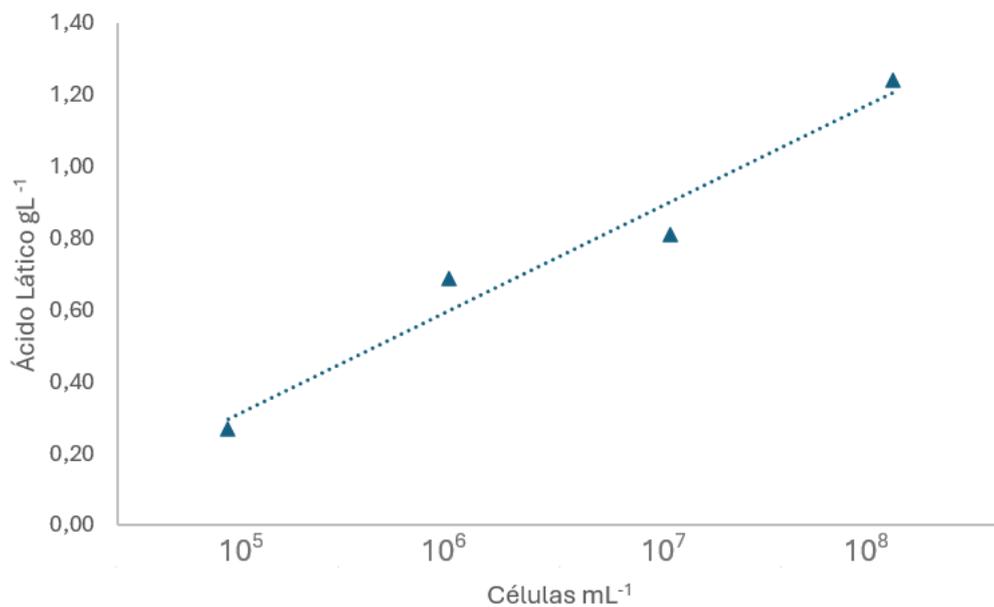


Figura 14 - Concentração final de ácido láctico produzido durante os ensaios de fermentação etanólica com *L. fermentum*

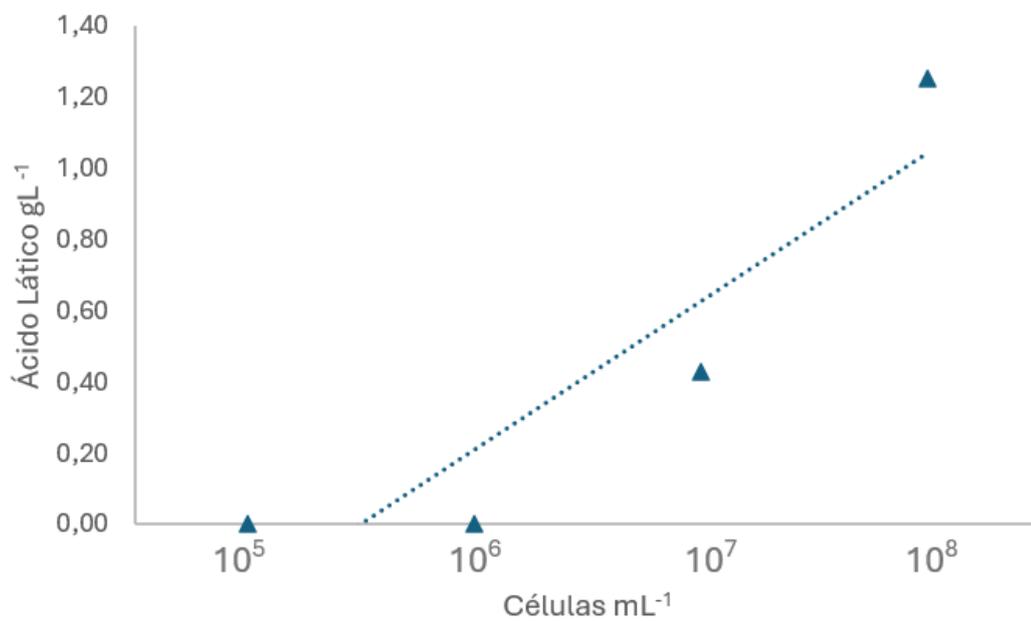


Figura 15 - Concentração final de ácido láctico produzido durante os ensaios de fermentação etanólica com *L. plantarum*

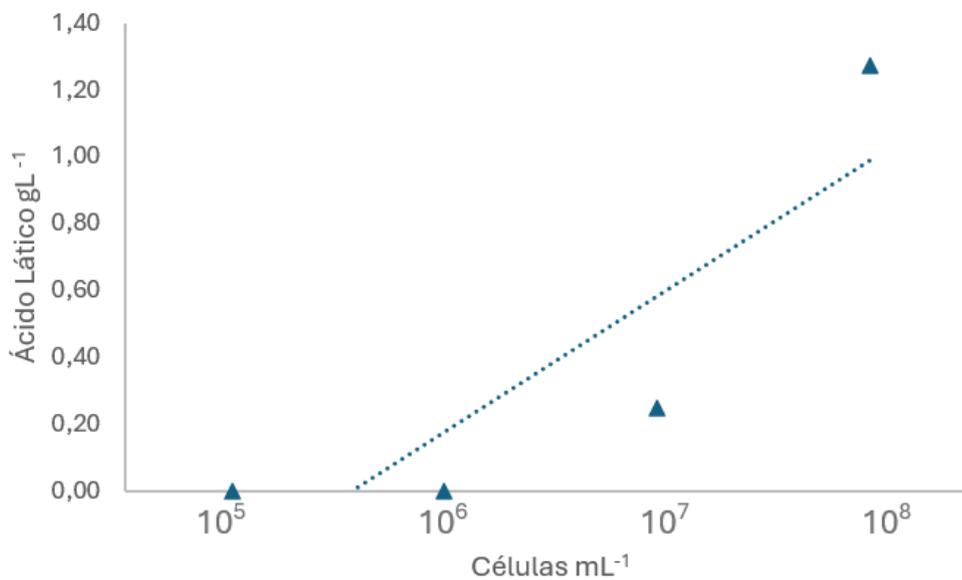


Figura 16 - Concentração final de ácido láctico produzido durante os ensaios de fermentação etanólica com *L. amylovorus*

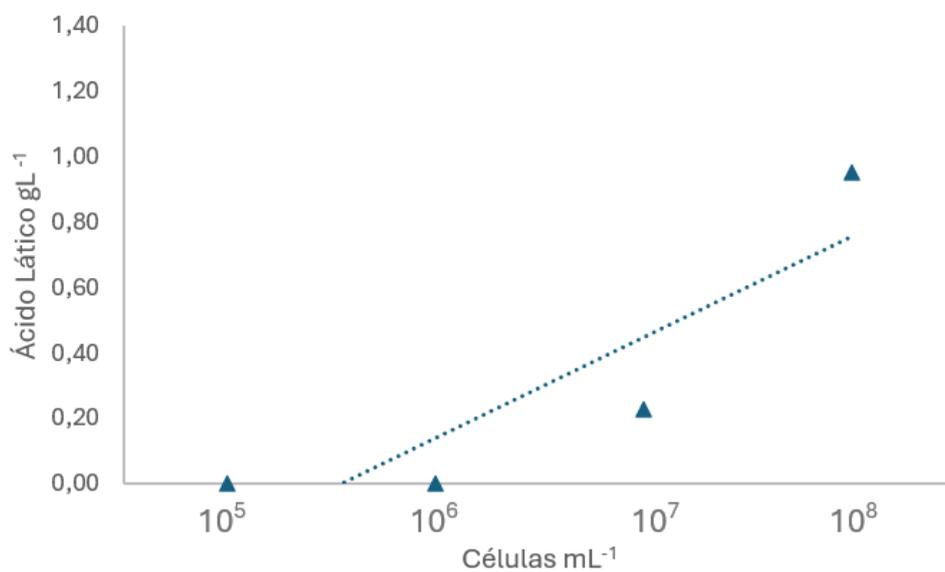
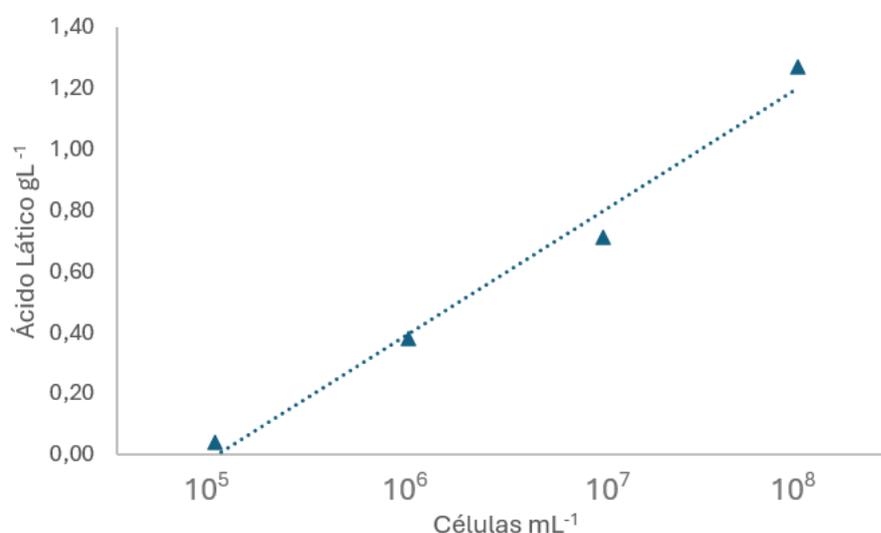


Figura 17 - Concentração final de ácido lático produzido durante os ensaios de fermentação etanólica em cultura mista



Em relação ao glicerol, foi possível observar que na interação com o *L. fermentum*, a levedura em estudo produziu uma quantidade superior do metabólito, porém apenas quando a concentração celular foi de 10⁸ UFC/mL, indicando um estresse maior na interação com essa bactéria em específico (Figura 19). Mais uma vez, trata-se do *Lactobacillus* em maior abundância em nosso processo fermentativo brasileiro.

Quando observamos o experimento com a cultura mista (Figura 22), vemos a mesma tendência, de termos uma concentração superior do metabólito na maior concentração de bactérias. Mais um fator que demonstra que apenas em concentrações superiores de bactérias é que o desequilíbrio populacional entre as espécies demonstra prejuízos.

Os demais experimentos se mantiveram muito próximos ao experimento controle, inclusive no experimento com o *L. amylovorus* (Figura 21), onde esperava-se teores inferiores de glicerol, o que comprovaria a teoria de que as leveduras poderiam se beneficiar do acetaldeído produzido pelo contaminante, permitindo a reciclagem do NADH a partir deste metabólito secretado pela bactéria, reduzindo assim a produção de glicerol (LINO, *et al.*, 2021).

A produção de glicerol é comum na produção de etanol e na fermentação. A sua formação permite a reciclagem do NADH produzido durante a conversão de açúcar. Em ambientes aeróbicos, o NADH pode ser facilmente reoxidado pela respiração. No entanto, em condições de baixo oxigênio ou anaerobiose, o processo torna-se inviável, e a produção de glicerol atua como um importante mecanismo de regulação redox (WEUSTHUIS, *et al.* 1994).

Figura 18 – Concentração final de glicerol produzido durante os ensaios de fermentação etanólica com *L. helveticus*

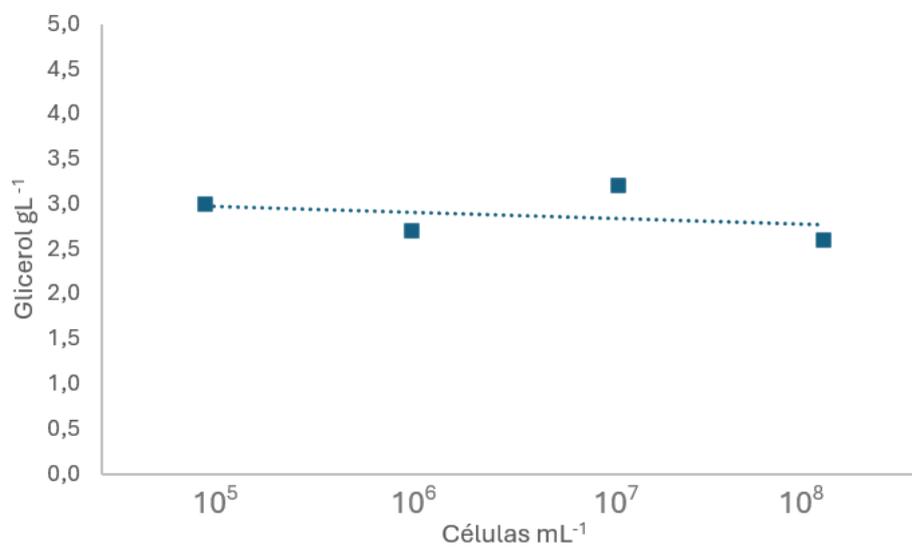


Figura 19 - Concentração final de glicerol produzido durante os ensaios de fermentação etanólica com *L. fermentum*

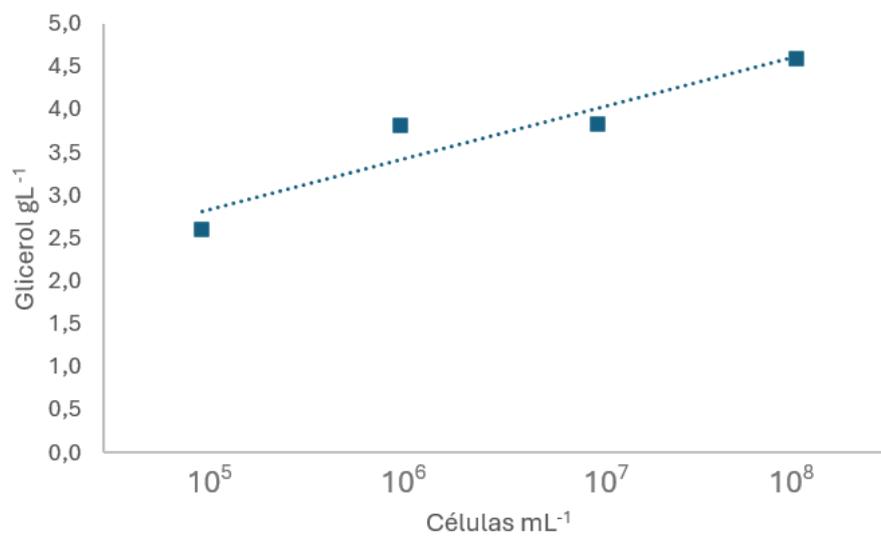


Figura 20 - Concentração final de glicerol produzido durante os ensaios de fermentação etanólica com *L. plantarum*

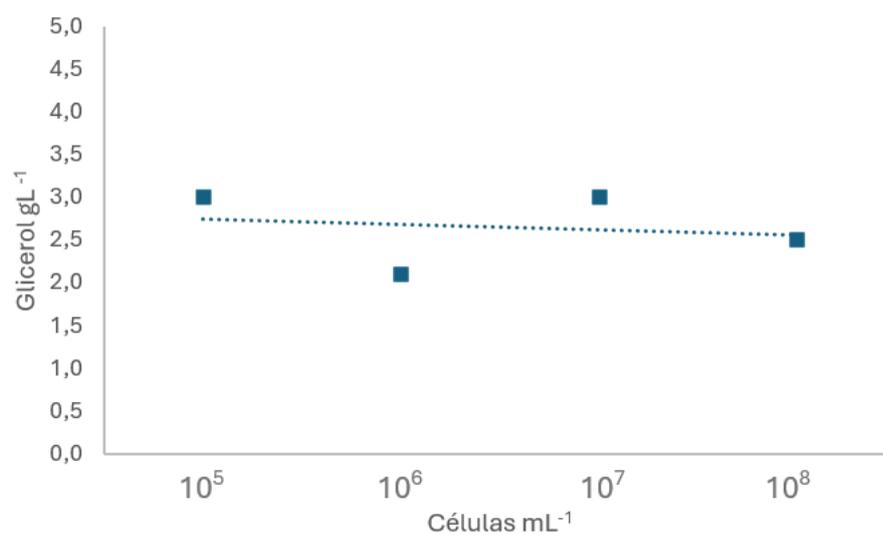


Figura 21 - Concentração final de glicerol produzido durante os ensaios de fermentação etanólica com *L. amylovorus*

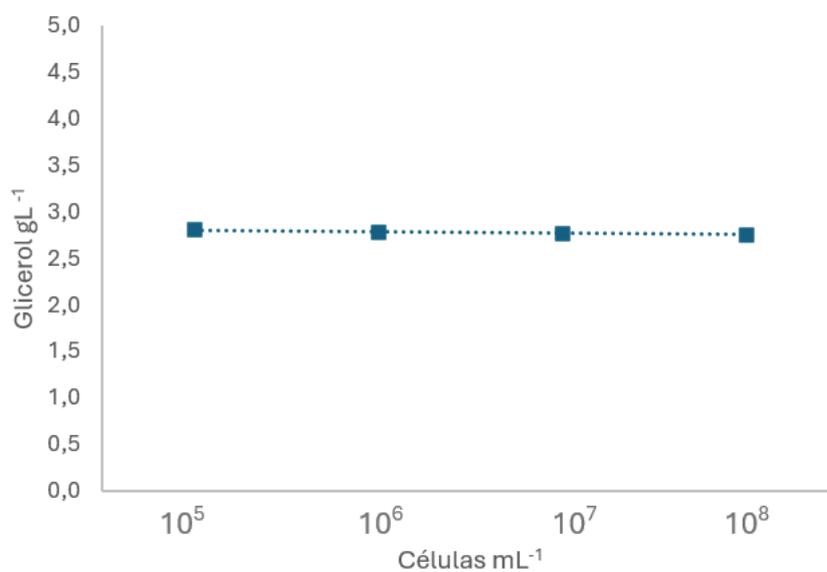
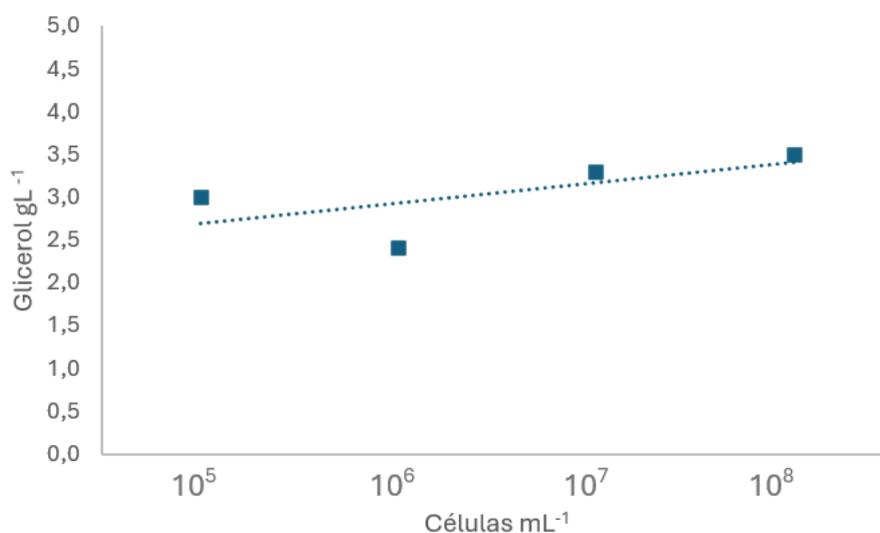


Figura 22 - Concentração final de glicerol produzido durante os ensaios de fermentação etanólica em cultura mista



5.4 MONITORAMENTO DO CRESCIMENTO CELULAR

As concentrações iniciais em UFC/mL foram determinadas de acordo com a absorbância inicial da suspensão de células correlacionadas com a curva padrão celular de cada bactéria. Já as leveduras, tiveram suas concentrações iniciais determinadas por plaqueamento.

Ao observar os resultados obtidos para a bactéria *L. fermentum* em relação ao crescimento celular no início e final da fermentação é possível observar que em todas as concentrações, com exceção de 10⁸ UFC/mL, a concentração celular da bactéria caiu cerca de 2 escalas logarítmicas. Conseguindo apenas manter a sua população (com leve queda) apenas quando sua concentração celular se igualou a da levedura (10⁸ UFC/mL), como é possível visualizar na Figura 23.

O mesmo não ocorreu com o *L. plantarum*, no qual cresceu e aumentou a sua população inicial em quase todos os experimentos, onde apenas quando a sua população tinha grande desvantagem populacional (10⁵ UFC/mL) é que houve decréscimo de sua população. (Figura 24).

O desempenho do *L. helveticus* foi o que apresentou menor competitividade nas fermentações mistas, não apresentando resistência às condições da fermentação e chegando a zerar a sua população nas concentrações de 10⁵, 10⁶ e 10⁷ UFC/mL. Somente com concentração inicial de 10⁸ UFC/mL é que apresentou uma população residual na fermentação, como pode ser observado na Figura 25.

O experimento com essa bactéria foi repetido mais 3 vezes, com diluições menores para checagem e o mesmo resultado se manteve. A literatura mostra que se trata de um

microrganismo com grande demanda nutricional, muito mais restrita até do que os demais, também chamado de auxotrófico. E é por isso que é muito usado na indústria láctea, pois o leite é um meio que contém todos os nutrientes essenciais a sua sobrevivência. (HEBERT *et al.*, 2002; CHRISTIANSEN *et al.*, 2008; KIDO *et al.*, 2021).

O uso de um meio semissintético para padronizar os experimentos pode ter afetado as demandas nutricionais do microrganismo, levando em consideração sua auxotrofia, resultando em sua falta de viabilidade até o término da fermentação. Houve grande dificuldade em mantê-lo também em meios sólidos, necessitando de um número maior de repicagens a fim de manter a cultura ativa. Mesmo não tendo sobrevivido até o final, a secreção dos seus metabólitos foi suficiente para causar interferências na fermentação. Agora entendendo um pouco mais da importância das interações microbianas, em diferentes condições ambientais, nos faz questionar se essa interação teria obtido os mesmos resultados se cultivado em um meio que lhe fornecesse todos os aminoácidos essenciais ao seu crescimento e se o fato de presenciar esgotamento ou falta dos mesmos, fez com que ele secretasse metabólitos prejudiciais a *S. cerevisiae*.

O *L. amylovorus* teve um desempenho semelhante ao *L. fermentum*, porém apresentando leve queda na sua população ao final de cada fermentação e assim como as demais bactérias apresentou melhor competitividade (menor redução na sua população) na concentração de 10^8 UFC/mL (Figura 26).

Observa-se com esses resultados que a população de bactérias individualmente consegue apresentar vantagem competitiva apenas quando se igualam a concentração celular das leveduras. O fato de cada bactéria apresentar um desempenho diferente, demonstra que cada microrganismo de forma isolada tem necessidades nutricionais diferentes ou são afetadas de forma diferente pelos metabólitos excretados pelas leveduras.

Ao que se refere ao crescimento celular das leveduras, em nenhum dos experimentos houve declínio da população inicial de leveduras. Para compararmos o crescimento entre os experimentos, foi calculada a taxa de crescimento de cada um. Sabendo que a variação da concentração celular no tempo é dada pela Eq. 5, esta pode ser integrada em função de X e t na fase exponencial, permitindo o cálculo da velocidade específica de crescimento máxima (μ) conforme Eq 6:

$$\mu = \frac{1}{X} \left(\frac{dX}{dt} \right) \text{ (Eq.5)}$$

$$\mu = \frac{\ln \left(\frac{X}{X_0} \right)}{t} \text{ (Eq.6)}$$

- X é o número de células ao final da fase log
- X_0 é o número de células no início da fase log.

- μ é a taxa de crescimento específica máxima (h^{-1}).
- t é o intervalo de tempo da fase log (horas).

Foi obtida uma taxa de crescimento de $0,11 h^{-1}$ e uma população final de $2,45 \times 10^9$ UFC/mL (Figura 27) no experimento controle de cultura pura de leveduras, valor dentro do esperado para o crescimento de leveduras. No trabalho de Thomas *et al.* (2001) foi obtido um valor de $0,14 h^{-1}$ para cultura pura de leveduras. A partir deste valor do controle é que foi possível realizar as comparações entre os demais experimentos.

Cada bactéria estudada causou uma reação diferente no crescimento da levedura testada. O *L. fermentum* limitou o crescimento da levedura a uma taxa de $0,08 h^{-1}$ nas concentrações de 10^6 , 10^7 , 10^8 UFC/mL mas na concentração de 10^5 UFC/mL o crescimento da levedura quase igualou ao controle. No trabalho de Thomas *et al.* (2001) houve uma queda de $0,02 h^{-1}$ em relação ao controle, porém em condições em que a levedura e o contaminante estavam em igual carga microbiana. O declínio na população de leveduras também foi evidenciado por Oliveira-Freguglia e Horii (1991), onde mesmo que em proporções diferentes, houve decréscimo na população de leveduras na presença do *L. fermentum* em relação ao controle.

Comportamento semelhante foi observado com o *L. helveticus*, onde nas concentrações de 10^7 e 10^8 UFC/mL houve um impacto significativo no crescimento celular da levedura, levado a taxas de crescimento de apenas $0,06 h^{-1}$. Porém, em concentrações menores do contaminante, houve um impacto menor no crescimento.

Com o *L. plantarum*, os resultados corroboram com o trabalho de Thomas *et al.* (2001), onde não houve impacto significativo no crescimento da levedura em comparação com o controle.

Por outro lado, os ensaios com *L. amylovorus* indicam resultados diferenciados, onde o aumento de sua concentração celular é proporcional ao aumento do crescimento celular da levedura. Com taxas de crescimento iguais ao controle de $0,11 h^{-1}$ e na concentração de 10^8 UFC/mL do *L. amylovorus*, a levedura atingiu uma concentração celular de $2,75 \times 10^9$ UFC/mL, acima até do controle, demonstrando que a presença desta bactéria proporciona condições favoráveis a um maior crescimento das leveduras.

Nos experimentos onde foram feitos ensaios de cultura mista de bactérias, observa-se que o impacto no crescimento celular da levedura é inversamente proporcional a concentração de bactérias presente no meio. Apesar de termos individualmente resultados onde algumas bactérias possuem impacto positivo e outras negativos no crescimento celular, podemos verificar que de maneira geral, apenas concentrações acima de 10^7 UFC/mL é que houve detrimento no crescimento.

Um próximo passo seria testar esses comportamentos em bateladas, já que Thomas *et al.* (2001) demonstraram que em uma batelada simples havia sim uma redução no crescimento das leveduras em contato com bactérias lácticas, porém após 7 ciclos a população de levedura se estabilizou em 10^8 UFC/mL e a população de bactérias que chegou a atingir níveis de 10^9 UFC/mL caiu para 10^4 UFC/mL com o decorrer das bateladas. Isso demonstraria que as populações mistas de microrganismos chegam a um nível de controle, após as interações se estabilizarem e que muitas vezes não é possível evidenciar essas interações em uma batelada simples. O comportamento do *L amylovorus* em bateladas também não foi estudado e poderia trazer resultados interessantes dessas interações.

Figura 23 – Contagem inicial e final de *Limosilactobacillus fermentum* nas diferentes concentrações celulares estudadas de fermentação mista

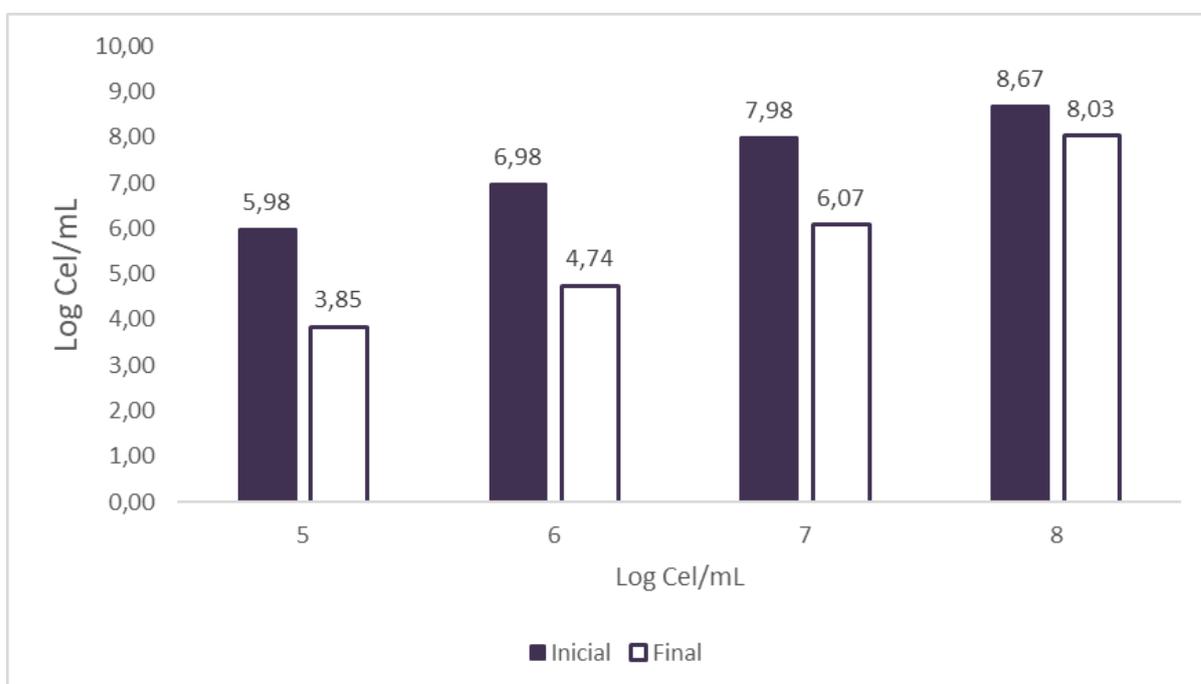


Figura 24 – Contagem inicial e final de *Lactiplantibacillus plantarum* nas diferentes concentrações celulares estudadas de fermentação mista

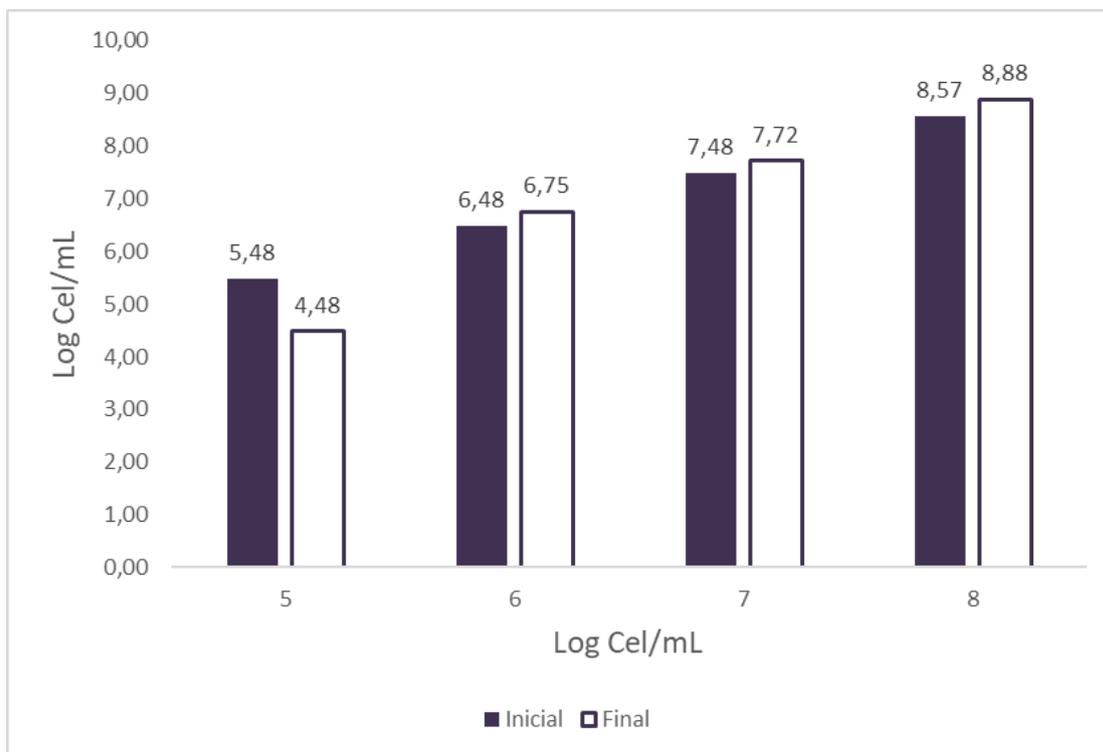


Figura 25 – Contagem inicial e final de *Lactobacillus helveticus* nas diferentes concentrações celulares estudadas de fermentação mista

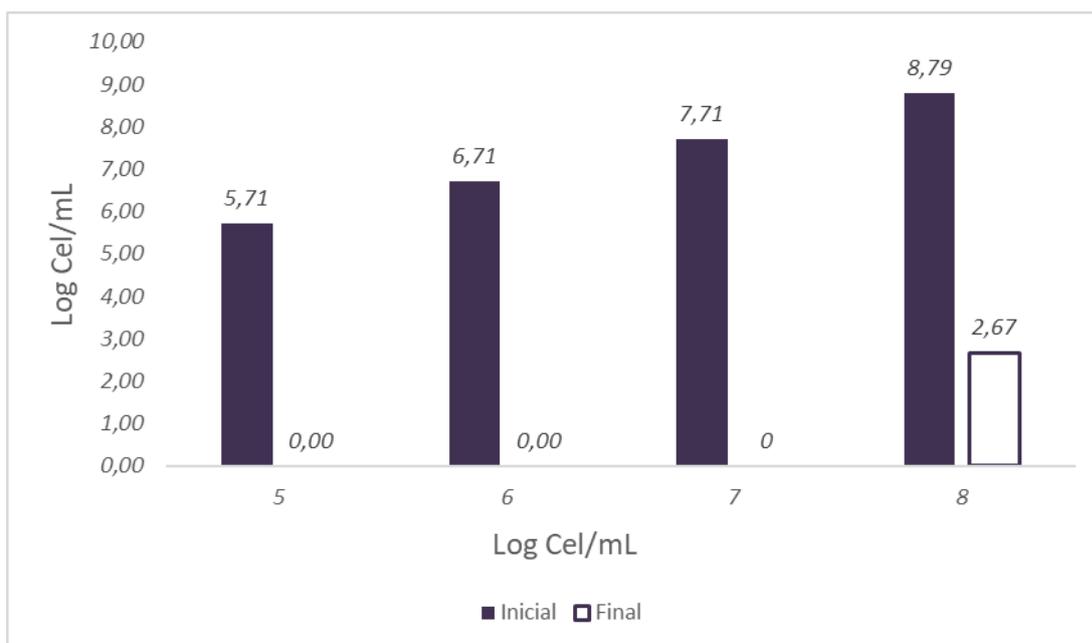


Figura 26 – Contagem inicial e final de *Lactobacillus amylovorus* nas diferentes concentrações celulares estudadas de fermentação mista

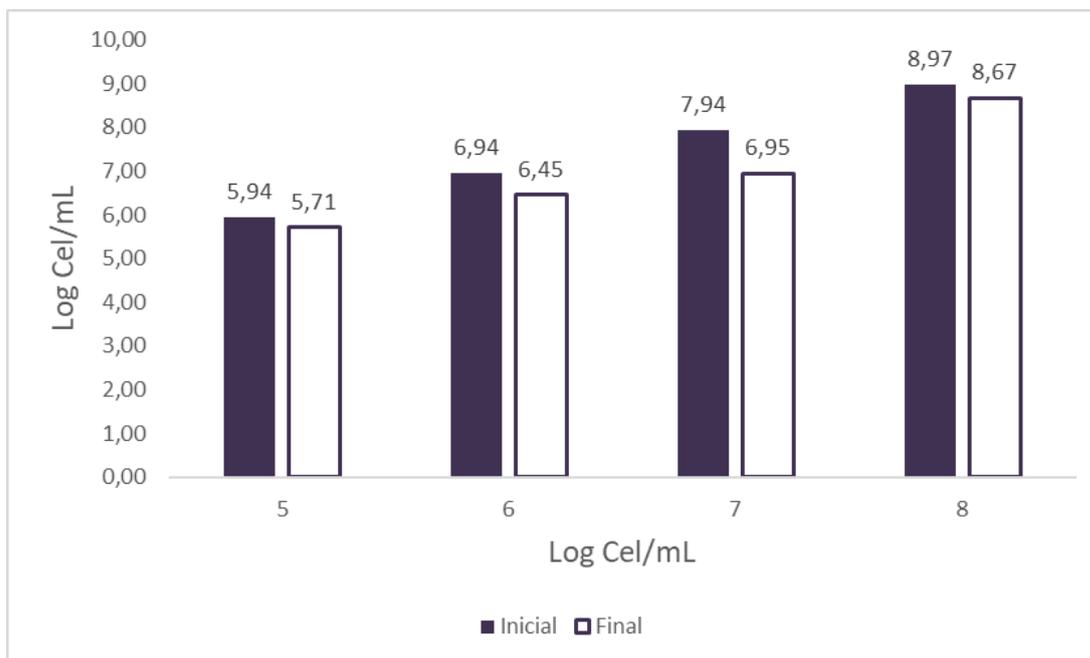
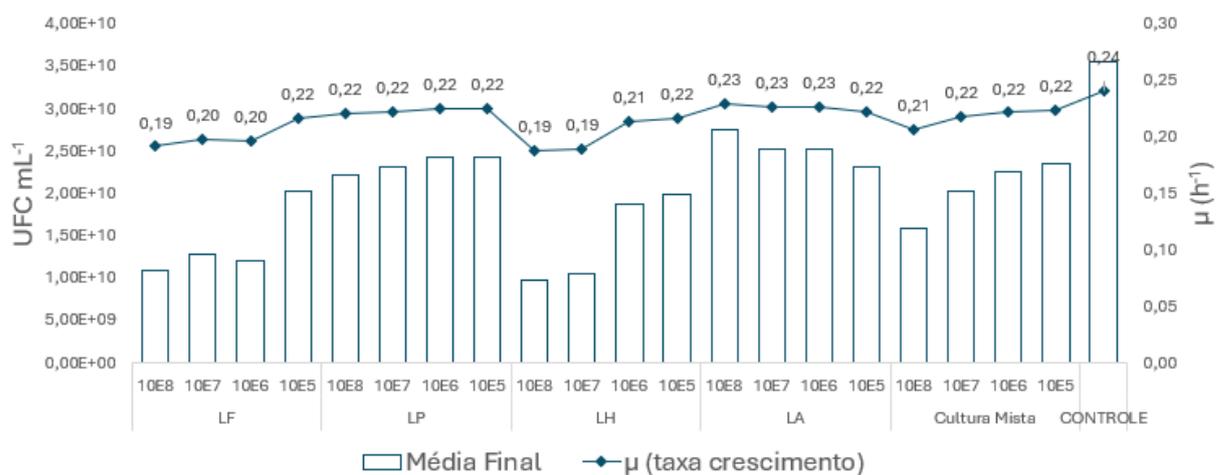


Figura 27 – Velocidades específicas de crescimento máximas ($\mu_{\text{máx}}$) e Log da contagem final de *Sacharomyces cerevisiae* PE-02 nas diferentes concentrações celulares estudadas de fermentação mista



*Considerar para LA = *Lactobacillus amylovorus*, LF = *Limosilactobacillus fermentum*, LH = *Lactobacillus helveticus*, LP = *Lactiplantibacillus plantarum*, Cultura mista = todas as bactérias testadas, Controle = somente *S.cerevisiae*

6 CONCLUSÕES

Nas condições experimentais da pesquisa foi possível observar a influência negativa do *Limosilactobacillus fermentum* no crescimento celular da *Sacharomyces cerevisiae* PE-02 e na eficiência da fermentação devido a produção elevada de ácido láctico e glicerol, em comparação com outros experimentos conduzidos.

Além disso, os resultados indicaram a limitada resistência do *Lactobacillus helveticus* às condições de fermentação, demonstrando que, embora não seja altamente resistente ao processo e ao meio semissintético que foi utilizado, pela sua característica auxotrófica, ele exerce um impacto significativo na eficiência da fermentação, superando a produção de ácido láctico do *L. fermentum*. Já o *L. plantarum* não apresentou as sinergias positivas frequentemente mencionadas na literatura.

Por outro lado, o *Lactobacillus amylovorus* apresentou uma contribuição na eficiência da fermentação, sugerindo a existência de um potencial sinergia positiva entre esse microrganismo e as leveduras, chegando a contribuir com até 1% na eficiência de fermentação e no crescimento celular das leveduras. Entretanto, para uma compreensão completa dessa sinergia, é necessário investigar mais a fundo os mecanismos subjacentes.

Os resultados evidenciaram a influência da concentração celular e do meio de cultivo no desenvolvimento das interações microbianas e de maneira geral, esta pesquisa proporcionou novos pontos de vista sobre a diversidade das interações entre diferentes microrganismos durante o processo de fermentação. Os resultados avançam no entendimento que é fundamental a compreensão dessas interações para otimizar a produção e elevar a eficiência da fermentação etanólica. Além disso, os dados realçam a necessidade de investigações futuras para elucidar os mecanismos envolvidos nessa complexa rede de interações microbianas.

Uma abordagem mais eficaz para avaliar as interações entre diferentes microrganismos consiste na realização de um número maior de bateladas experimentais. Este incremento no número de bateladas permitiria uma análise mais detalhada das dinâmicas microbianas ao longo do tempo, possibilitando a identificação de padrões e tendências de comportamento que poderiam indicar uma possível existência de estabilidade nas interações microbianas. Desta forma, seria possível compreender melhor se, após um período prolongado de observação, as interações entre os microrganismos testados tendem a alcançar um estado de equilíbrio ou estabilidade.

7 LITERATURA CITADA

AHMAD, M. N.; HOLLAND, C. R. Growth kinetics of single-cell protein in batch fermenters. **Journal of Food Engineering**, v. 26, n. 4, p. 443–452, 1995.

AI, J.; LI, A.-L.; SU, B.-X.; MENG, X.-C. Multi-Cereal Beverage Fermented by *Lactobacillus Helveticus* and *Saccharomyces Cerevisiae*. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 6, p. M1259–M1265, 2015.

ALVES, D. M. G. **Respostas fisiológicas de duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* frente ao potássio durante a fermentação alcoólica**. Rio Claro, 2000. 118f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

AMORIN, H.; BASSO, L. C.; ALVEZ, D. M. G. **Métodos Analíticos para o controle da produção de álcool e açúcar**. 2. Ed. Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP, 1996. 195p.

ANDRIETTA, M. G. S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S. R.; STUPIELLO, E. N. A. Bioetanol: Brazil, 30 years of Proalcool. **International Sugar Journal**, v. 109, p. 195-200, 2007.

ANDRIETTA, S. R.; ANDRIETTA, M. G. S.; BICUDO, M. H. P. Comparação do rendimento fermentativo utilizando diferentes metodologias de cálculo para a avaliação do desempenho de um processo industrial. **STAB**, v. 30, n. 4, 2012.

ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO. Renovabio. Disponível em: <<https://www.gov.br/anp/pt-br>>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2024.

ASSÊNCIO, D. C. Manual de ciência molecular, 1. ed. São Paulo: USP, 2002.

AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W. **Biotechnologia: alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Ed. Edgarg Blücher Ltda, v. 5, p. 1-43, 2001.

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

BAIREY, E.; KELSIC, E.D.; KISHONY, R. High-order species interactions shape ecosystem diversity. **Nature Communications**, v. 7, p. 12285, 2016.

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

BASSO, T.O.; GOMES, F.S.; LOPES, M.L.; AMORIM, H.V.; EGGLESTON, G.; BASSO, L.C. Homo and heterofermentative lactobacilli differently affect sugarcane-based fuel ethanol fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 105, p. 169-177, 2014.

BIOCONTAL (2021a) **Rendimento por subprodutos e suas distorções**. Disponível em: < <http://www.biocontal.com.br/informativos/04>> Acesso em: 29 de novembro de 2021.

BIOCONTAL (2021b) **Cálculo rendimento fermentativo por balanço de massa**. Disponível em: < <http://www.biocontal.com.br/informativos/08>> Acesso em 29 de novembro de 2021.

BIOCONTAL (2021c) **Avaliação de unidades industriais utilizando eficiência relativa**. Disponível em: < <http://www.biocontal.com.br/informativos/14>> Acesso em 29 de novembro de 2021.

BECKNER, M.; IVEY, M.L.; PHISTER, T.H. Microbial contamination of fuel ethanol fermentation. **Letters in applied microbiology**, v. 53, n. 4, p. 387-394, 2011.

BOULTON, C.; QUAIN, D. Brewing yeast and fermentation. 1. ed.London: **Blackwell Science**, 2001.

CABAÑAS, K. T.; PEÑA-MORENO, I. C.; PARENTE, D. C.; GARCÍA, A. B.; GUTIÉRREZ, R. G.; DE MORAIS, M. A. Jr. Selection of *Saccharomyces cerevisiae* isolates for ethanol production in the presence of inhibitors. **3 Biotech**. v. 9, p. 1-11, 2019.

CARVALHO, F. P.; DUARTE, W. F.; DIAS, D.R.; PICCOLI, R.H.; SCHWAN, R.F. Interaction of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactococcus lactis* in the fermentation and quality of artisanal cachaça. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 37, n. 1, p. 51-60, 2015.

CASALI, E. O programa nacional do álcool. **Brasil Açucareiro**, v. 91, n. 4, p. 35-39, 1978.

CAO, M., FATMA, Z., SONG, X., HSIEH, P. H., TRAN, V. G., LYON, W. L., SAYADI, M., SHAO, Z., YOSHIKUNI, Y., ZHAO, H. Genetic toolbox for metabolic engineering of *Issatchenkia orientalis*. **Metabolic Engineering**, v. 59, p. 87-97, 2020.

CECATTO-ANTONINI, S.R. **Microbiologia da fermentação alcoólica**: fundamentos, avanços e perspectivas. São Carlos: EdUFSCar, 2021.

CHIN, P. M.; INGLEDEW, W. M. Effect of lactic acid bacteria on wheat mash fermentation prepared with laboratory backset. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 16, n. 4, p. 311-317, 1994.

CHRISTIANSEN, J. K.; HUGHES, J. E.; WELKER, D. L.; RODRÍGUEZ, B. T.; STEELE, J. L.; BROADBENT, J. R. Phenotypic and genotypic analysis of amino acid auxotrophy in *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32. **Applied and Environmental Microbiology**, 2008.

CHRZANOWSKI, G. *Saccharomyces Cerevisiae*—An Interesting Producer of Bioactive Plant Polyphenolic Metabolites. **Int. J. Mol. Sci.** v. 21, n. 7343, 2020.

CODATO, C. B.; BASTOS, R.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Sequential process of solid-state cultivation with fungal consortium and ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* from sugarcane bagasse. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 44, p. 1-8, 2021.

DATAGRO. São Paulo, n. 7, 1999. 16p.

DE SOUZA, J. P.; PRADO, C. D.; ELEUTHERIO, E. C. A.; BONATTO, D.; MALAVAZI, I.; CUNHA, A. F. da. Improvement of Brazilian bioethanol production— Challenges and perspectives on the identification and genetic modification of new strains of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated during ethanol process. **Fungal Biology**, v. 122, p. 583-591, 2018.

DELLA BIANCA, B.E. **Stress tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* strains employed in the fuel ethanol production in Brazil**. 2013. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

DENIS, R.; JACQUES, G.; ANH, L. Batch fermentation of whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus* for lactic acid production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 206–13, 1986.

DING, Y.; NIU, Y.; CHEN, Z.; DONG, S.; LI, H. Discovery of novel *Lactobacillus plantarum* co-existence-associated influencing factor(s) on *Saccharomyces cerevisiae* fermentation performance. **Food Science and technology LWT**, v. 135, n. 110268, 2021.

DONG S.J.; LIN X.H.; LI H. Regulation of *Lactobacillus plantarum* contamination on the carbohydrate and energy related metabolisms of *Saccharomyces cerevisiae* during bioethanol fermentation. **International Journal of Biochemistry Cell Biology**, v. 68, p. 33–41, 2015.

FARIA-OLIVEIRA, F.; DINIZ, R.H.S.; GODOY-SANTOS, F.; PILÓ, F.B.; MEZADRI, H.; CASTRO, I.M.; BRANDÃO, R.L. The Role of Yeast and Lactic Acid Bacteria in the Production of Fermented Beverages in South America. **Food Production and Industry**. cap. 4, p.108-135, 2015.

FAVARO, L.; JANSEN, T.; VAN ZYL, W. Exploring industrial and natural *Saccharomyces cerevisiae* strains for the bio-based economy from biomass: the case of bioethanol. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 39, p. 800-816, 2019.

FERNANDES, A.C. **Cálculos na Agroindústria da Cana-de-açúcar**. 3. ed. Piracicaba: STAB, 2011.

FERNANDES, F.S.; SOUZA, E.S.; CARNEIRO, L.M.; SILVA, J.P.A.; SOUZA, J.V.B.; BATISTA, J.S. Current Ethanol Production Requirements for the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Microbiology**, v. 2022, p. 1 – 14, 2022.

FERRARI, S. E; LOPES, J. J. C; LEME, J. R. A.; OLIVEIRA, E. R. Industrial Efficiency of alcohol fermentation: a comparative study. *In: Internacional Simposium on alcohol feels technology*, 4, Guarujá, 1980. **Anais**. Guarujá: IPT, 1980, p. 139-141.

FREITAS, M.D.; ROMANO, F.P. Tipos de contaminações bacterianas presentes no processo de fermentação alcoólica. **Bioenergia em revista: diálogos**, ano 3, n. 2, p. 29-37, 2013.

GALLO, C. R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação**. Campinas, 1989, 388f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas.

GÓES-FAVONI, S. P.; MONTEIRO, A. C. C.; DORTA, C.; CRIPPA, M. G.; SHIGEMATSU, E.. Fermentação alcoólica na produção de etanol e os fatores determinantes do rendimento. *Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais*, v.9, n.4, p. 285-296, 2018.

GOMES, F. S. **Antagonismo entre leveduras e bactérias na fermentação alcoólica**. Piracicaba, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola superior de agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

GUTIERREZ, L. E.; ANNICCHINO, A. V. K. O; LUCATTI, L. Capacidade fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* enriquecida com ácidos graxos. **Anais da escola superior de agricultura Luiz de Queiroz**, v. 47, n. 2, p. 575-595, 1990.

HE, X.; LIU, B.; XU, Y.; LI, H. Effects of *Lactobacillus plantarum* on the ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, p. 2597-2611, 2021.

HEBERT, E. M.; RAYA, R. R.; DE GIORI, G. S. Modulation of the cell-surface proteinase activity of thermophilic lactobacilli by the peptide supply. **Current Microbiology**, v. 45, p. 385–389, 2002.

KHAN, A. R.; HOQ, M. M. Lactic acid bacteria as contaminant in alcohol fermentation. **Bangladesh Journal of Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 119-121, 1990.

KIDO, Y.; MAENO, S.; TANNO, H.; KICHISE, Y.; SHIWA, Y.; ENDO, A. Niche-specific adaptation of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from malt whisky and dairy fermentations. **Microbial Genomics**, v. 7, n. 4, p. 560, 2021.

KRUCKEBERG A.L; DICKINSON J.R. Carbon metabolism. *In*: DICKINSON J.R.; SCHWEIZER M. (Ed). **The metabolism and molecular physiology of *Saccharomyces cerevisiae***. p. 42–103, 2004.

LAGUNAS, R. Energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* discrepancy between ATP balance and known metabolic functions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 440, p. 661-674, 1976.

LINO, F. S. O; BAJIC, D.; VILA, J C. C.; SANCHES, A.; SOMMER, M. O. A. Complex yeast–bacteria interactions affect the yield of industrial ethanol fermentation. **Nature Communications**, v. 12, p. 1498, 2021.

LIU, Y.; ROUSSEAU, S.; TOURDOT-MARÉCHAL, R.; SADOUDI, M.; GOUGEON, R.; SCHMITT-KOPLIN, P.; ALEXANDRE, H. Wine microbiome: A dynamic world of microbial interactions. **Critical Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 4, p. 856–873, 2015.

LOPES, M. L.; PAULILLO, S. C. L.; GODOY, A.; CHERUBIN, R. A.; LORENZI, M. S.; GIOMETTI, F. H. C.; BERNARDINO, C. D.; AMORIM NETO, H. B. de; AMORIM, H. V. de. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 64-76, 2016.

LUCENA B. T. L.; DOS SANTOS, B. M.; MOREIRA, J. L. S.; NUNES, A. C.; AZEVEDO, V.; MIYOSHI, A.; THOMPSON, F. L.; MORAES JR, M. A. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. **BMC Microbiology**, v. 10, p. 298–306, 2010.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Nutrition and metabolism. Brock biology of microbiology**. 9 ed. NJ: Prentice-Hall, 2000.

MAKANJUOLA, D. B.; TYMON, A.; SPRINGHAM, D. G. Some effects of lactic acid bacteria on laboratory-scale yeast fermentation. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 14, n. 4, p. 350-357, 1992.

MARSIT, S.; DEQUIN, S. Diversity and adaptive evolution of *Saccharomyces* wine yeast: a review. **FEMS Yeast Research**, v. 15, n. 7, p. 67, 2015.

MORAES, B. S.; ZAIAT, M.; BONOMI, A. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 888-903, 2015.

MULLER, L. P.; SANTOS, M. S. M, CARDOSO, C. A. L, BATISTOTE, M. Os efeitos do estresse térmico e etanólico em linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae*. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, 2020.

MUTHAIYAN, A., LIMAYEM, A., RICKE, S.C. Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, p. 351–370, 2011.

NETO, J.M.S. **Emprego do etanol como substituto ou adjuvante do ácido sulfúrico no tratamento das células em fermentação alcoólica contaminada por *Lactobacillus fermentum***. 2019. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados) – Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2019.

NOBRE, T. de P.; HORII, J.; ALCARDE, A. R.. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Food Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 20–25, 2007.

NYA, E., & ETUKUDO, O. Industrial Potentials of *Saccharomyces cerevisiae*. *British Journal of Multidisciplinary and Advanced Studies: Health and Medical Sciences*, v. 4, n. 2, p. 23-46, 2023.

OLIVA NETO, P. **Influência na contaminação por bactérias lácticas na fermentação alcoólica pelo processo de batelada alimentada**. Campinas, 1990. Tese (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas.

OLIVEIRA-FREGUGLIA, R. M.; HORII, Jorge. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* em cultura mista com *Lactobacillus fermentum*. **Scientia Agricola**, v. 55, p. 520-527, 1998.

PARAGGIO, M.; FIORE, C. Screening of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains for the production of acetic acid. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, n. 7, p. 743–747, 2004.

PELCZAR JR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2 ed. São Paulo: Makron Books do Brasil, 1996.

PRETORIUS, I. S.; TOIT, M. du; RENSBURG, P. van. Designer yeasts for the fermentation industry of the 21st century. *Food Technology & Biotechnology*, v. 41, n. 1, p. 3-10, 2003.

PRONK, J. T.; STEENSMAYS, H. Y.; VAN DIJKEN, J. P. Pyruvate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, v. 12, p. 1607-1633, 1996.

PONOMAROVA, O.; GABRIELLI, N.; SÉVIN, D. C.; MÜLLEDER, M.; ZIRNGIBL, K.; BULYHA, K.; SAUER, U. Yeast creates a niche for symbiotic lactic acid bacteria through nitrogen overflow. **Cell Systems**, v. 5, n. 4, 2017.

RAPOSO, M.S. **Metabólitos excretados na fermentação alcoólica como possíveis substratos para o crescimento do gênero *Lactobacillus***. Piracicaba, 2018. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola superior de agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

REIS, V. R.; BASSI, A. P. G.; CERRI, B. C. *et al.* Effects of feedstock and co-culture of *Lactobacillus fermentum* and wild *Saccharomyces cerevisiae* strain during fuel ethanol fermentation by the industrial yeast strain PE-2. **AMB Express**, v. 8, p. 23, 2018.

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. Disponível em < <https://ethanolrfa.org/markets-and-statistics/annual-ethanol-production>> Acesso em 9 de novembro de 2021.

RIBEIRO, C. A. F.; BLUMER, S. A. G.; HORII, J. **Fundamentos de tecnologia sucroalcooleira**. Texto para aula. Piracicaba, v. 2, p. 7-25, 1999.

RICH, J. O.; BISCHOFF, K. M.; LEATHERS, T. D.; ANDERSON, A. M.; LIU, S.; SKORY, C. D. Resolving bacterial contamination of fuel ethanol fermentations with beneficial bacteria - An alternative to antibiotic treatment. **Bioresourse Technology**, v. 247, p. 357-362, 2018.

RODRIGUES F.; LUDOVICO P.; LEÃO C. Sugar metabolism in yeasts: an overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism. In: PÉTER G.; ROSA C. (Ed) **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2005.

ROMANO, P. La purezza fermentativa in *Saccharomyces cerevisiae*. **Industrie delle Bevande**, v. 19, p. 320–321, 1990.

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

SHIMAZU, Y.; WATANABE, M. Effects of yeast strains and environmental conditions on formation of organic acids in must fermentations. **Journal of Fermentation Technology**, v. 59, p. 27–32, 1981.

STUPIELLO, J. P.; HORII, J. **Condução da fermentação alcoólica**. Departamento de Tecnologia Rural - ESALQ, v. 4, n. 17, 1981.

TILLOY, V.; EHSANI, M.; DEQUIN, S.; CADIÈRE, A. Reducing alcohol levels in wines through rational and evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 213, p. 49– 58, 2015.

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

TORRES-GUARDADO, R.; ESTEVE-ZARZOSO, B.; REGUANT, C. *et al.* Microbial interactions in alcoholic beverages. **International Microbiology**, v. 25, p. 1–15, 2022.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology**. 6 ed. Califórnia: Art Méd, 2002.

UDOP. União Nacional da Bionergia. Disponível em: <www.udop.com.br>. Acesso em 22 novembro de 2021.

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

VAN ROSSUM, H.M.; KOZAK, B.U.; NIEMEIJER, M.S. Improving ethanol production and maximum ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by a high-throughput screen. **Scientific Reports**, v. 11, p. 1656, 2021.

VIANA, N.C.; NASCIMENTO do, D.D.; PRADA, M.; DA CRUZ, S.H. Molecular characterization of isolated dominant yeast strains during ethanol fermentation process. **Brazilian Journal of Agriculture**, v. 95, n. 1, p. 48–58, 2020.

VIDAL, E.E.; TENORIO, R.R.; SILVA, F.G.; MORAIS JR, M.A. Caracterização do potencial biotecnológico de leveduras industriais com vista à produção de metabólitos de alto valor agregado. In: **XX Simpósio Nacional de Bioprocessos**. 2015, Fortaleza, Ceará.

VIEGAS, M. C. **Otimização de sistema de fermentação alcoólica contínua utilizando reatores tipo torre e leveduras com características floculantes**. 2003. Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP.

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

WONGSURAKUL, P.; TERMTANUN, M.; KIATKITTIPONG, W.; LIM, J. W.; KIATKITTIPONG, K.; PAVASANT, P.; KUMAKIRI, I.; ASSABUMRUNGRAT, S. Comprehensive Review on Potential Contamination in Fuel Ethanol Production with Proposed Specific Guideline Criteria. **Energies**, v. 15, p. 2986, 2022.

XU, Z.; LU, Z.; SOTEYOME, T.; YE, Y.; HUANG, T.; LIU, J.; PETERS, B. M. Polymicrobial interaction between *Lactobacillus* and *Saccharomyces cerevisiae*: coexistence relevant mechanisms. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 47, p. 386–396, 2021.

APÊNDICE

Tabela A1 – Resultados obtidos para ácidos orgânicos, glicerol e etanol por HPLC, para todos os experimentos e controle.

Tratamentos	Ácido Acético (g/L)	Ácido Lático (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)
PE-02 10E8 e LH 10E8	0,6730	1,2540	2,5460	58,25
PE-02 10E8 e LH 10E8	0,6680	1,1630	2,5200	59,35
PE-02 10E8 e LH 10E8	0,7150	1,2990	2,5990	58,24
Média	0,6853	1,2387	2,5550	58,61
Desvio Padrão	0,0258	0,0693	0,0403	0,56
PE-02 10E8 e LH 10E7	0,5040	0,8723	2,5560	59,36
PE-02 10E8 e LH 10E7	0,4490	0,7354	4,2550	60,35
PE-02 10E8 e LH 10E7	0,4875	0,8260	2,7780	58,35
Média	0,4802	0,8112	3,1963	59,35
Desvio Padrão	0,0282	0,0696	0,9235	1,00
PE-02 10E8 e LH 10E6	0,3770	0,8530	2,8970	60,35
PE-02 10E8 e LH 10E6	0,6230	0,6345	2,9390	59,35
PE-02 10E8 e LH 10E6	0,3610	0,5960	2,4000	58,35
Média	0,4537	0,6945	2,7453	59,35
Desvio Padrão	0,1469	0,1386	0,2998	0,58
PE-02 10E8 e LH 10E5	0,6620	0,3455	3,1680	60,35
PE-02 10E8 e LH 10E5	0,5970	0,3523	3,1000	62,35
PE-02 10E8 e LH 10E5	0,4380	0,1243	2,8380	60,36
Média	0,5657	0,2740	3,0353	61,02
Desvio Padrão	0,1152	0,1297	0,1742	1,15
Mista 1 - 10E8	0,7460	1,3160	3,8710	58,98
Mista 1 - 10E8	0,8109	1,2896	2,9748	59,65
Mista 1 - 10E8	0,6801	1,2041	3,5948	58,96
Média	0,7457	1,2699	3,4802	59,19

Desvio Padrão	0,0654	0,0585	0,4590	0,35
Mista 1 - 10E7	0,4600	0,6190	3,0090	60,24
Mista 1 - 10E7	0,4890	0,7956	3,1270	58,24
Mista 1 - 10E7	0,5410	0,7105	3,8553	60,48
Média	0,4967	0,7084	3,3304	59,65
Desvio Padrão	0,0410	0,0883	0,4584	1,13
Mista 1 - 10E6	0,5630	0,4910	2,3810	60,06
Mista 1 - 10E6	0,5254	0,3362	2,6534	60,33
Mista 1 - 10E6	0,4894	0,3175	2,0986	60,70
Média	0,5259	0,3816	2,3777	60,36
Desvio Padrão	0,0368	0,0952	0,2774	0,21
Mista 1 - 10E5	0,4376	0,1070	3,0963	60,99
Mista 1 - 10E5	0,5673	0,0050	2,4787	60,97
Mista 1 - 10E5	0,5708	0,0080	3,3163	61,39
Média	0,5252	0,0400	2,9638	61,11
Desvio Padrão	0,0759	0,0580	0,4342	0,21
Tratamentos	Ácido Acético (g/L)	Ácido Lático (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)
PE-02 10E8 e LF 10E8	0,711	1,149	4,089	57,40
PE-02 10E8 e LF 10E8	0,631	1,241	5,025	58,38
PE-02 10E8 e LF 10E8	0,7634	1,372	4,591	58,99
Média	0,7018	1,2540	4,5683	58,25
Desvio Padrão	0,0667	0,1121	0,2574	0,39
PE-02 10E8 e LF 10E7	0,6349	0,4435	3,405	58,35
PE-02 10E8 e LF 10E7	0,589	0,5235	3,693	59,09
PE-02 10E8 e LF 10E7	0,6482	0,3124	4,361	59,35
Média	0,6240	0,4265	3,8197	58,93
Desvio Padrão	0,0311	0,1066	0,4904	0,21
PE-02 10E8 e LF 10E6	0,5234	0,001	3,63	59,87
PE-02 10E8 e LF 10E6	0,6984	0,001	3,702	62,35
PE-02 10E8 e LF 10E6	0,6034	0,001	4,185	58,92
Média	0,6084	0,0010	3,8390	60,38
Desvio Padrão	0,0876	0,0000	0,3018	1,72
PE-02 10E8 e LF 10E5	0,5873	0,001	3,06	60,39
PE-02 10E8 e LF 10E5	0,6429	0,001	2,969	60,24
PE-02 10E8 e LF 10E5	0,589	0,001	1,717	61,76
Média	0,6064	0,0010	2,5820	60,80
Desvio Padrão	0,0316	0,0000	0,7505	0,77
PE-02 10E8 e LA 10E8	0,5340	1,1140	2,763	79,17
PE-02 10E8 e LA 10E8	0,3840	0,8330	2,845	79,13
PE-02 10E8 e LA 10E8	0,4170	0,9000	2,804	81,23
Média	0,4450	0,9490	2,8040	79,84
Desvio Padrão	0,0788	0,1468	0,0410	1,20
PE-02 10E8 e LA 10E7	0,4910	0,2370	2,336	79,97
PE-02 10E8 e LA 10E7	0,5210	0,2410	2,983	80,24
PE-02 10E8 e LA 10E7	0,4960	0,2210	3,01	78,40
Média	0,5027	0,2330	2,7763	79,54

Desvio Padrão	0,0161	0,0106	0,3816	0,99
PE-02 10E8 e LA 10E6	0,5730	0,0000	2,872	79,09
PE-02 10E8 e LA 10E6	0,5790	0,0000	2,695	81,36
PE-02 10E8 e LA 10E6	0,6410	0,0000	2,7360	79,38
Média	0,5977	0,0000	2,7677	79,94
Desvio Padrão	0,0376	0,0000	0,0927	1,24
PE-02 10E8 e LA 10E5	0,6660	0,0000	2,883	80,93
PE-02 10E8 e LA 10E5	0,6870	0,0000	3,013	79,57
PE-02 10E8 e LA 10E5	0,6500	0,0000	2,375	78,35
Média	0,6677	0,0000	2,7570	79,62
Desvio Padrão	0,0186	0,0000	0,3371	1,29
Testemunha	0,6240	0,0000	2,451	85,34
Testemunha	0,5836	0,0000	3,353	86,24
Testemunha	0,5729	0,0000	2,778	84,20
Média	0,5935	0,0000	2,8607	85,26
Desvio Padrão	0,0270	0,0000	0,4566	1,02
Tratamentos	Ácido Acético (g/L)	Ácido Lático (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)
PE-02 10E8 e LP 10E8	0,4310	1,2240	1,863	79,12
PE-02 10E8 e LP 10E8	0,4870	1,3970	2,647	77,83
PE-02 10E8 e LP 10E8	0,4400	1,1860	2,8740	76,24
Média	0,4527	1,2690	2,4613	77,73
Desvio Padrão	0,0301	0,1125	0,5305	1,45
PE-02 10E8 e LP 10E7	0,4250	0,2790	3,338	78,24
PE-02 10E8 e LP 10E7	0,5870	0,2220	3,253	79,53
PE-02 10E8 e LP 10E7	0,4875	0,2580	2,285	80,13
Média	0,4998	0,2530	2,9587	79,83
Desvio Padrão	0,0817	0,0288	0,5850	0,42
PE-02 10E8 e LP 10E6	0,4734	0,0000	1,812	78,93
PE-02 10E8 e LP 10E6	0,5760	0,0000	2,201	79,24
PE-02 10E8 e LP 10E6	0,4874	0,0000	2,3000	82,48
Média	0,5123	0,0000	2,1043	80,22
Desvio Padrão	0,0556	0,0000	0,2580	1,97
PE-02 10E8 e LP 10E5	0,5930	0,0000	2,956	79,35
PE-02 10E8 e LP 10E5	0,5270	0,0000	2,886	80,20
PE-02 10E8 e LP 10E5	0,3250	0,0000	3,17	81,59
Média	0,4817	0,0000	3,0040	80,38
Desvio Padrão	0,1396	0,0000	0,1480	1,13

Tabela A2 – Resultados obtidos para carboidratos por cromatografia IC, para todos os experimentos e controle

Tratamentos	ART inicial(g/L)	ART Residual (g/L)
PE-02 10E8 e LH 10E8	140,55	2,3476
PE-02 10E8 e LH 10E8	140,87	3,256
PE-02 10E8 e LH 10E8	140,45	4,685
Média	140,624	3,430
Desvio Padrão	0,22	1,18
PE-02 10E8 e LH 10E7	140,77	2,7868
PE-02 10E8 e LH 10E7	140,67	3,589789
PE-02 10E8 e LH 10E7	141,00	1,5697
Média	140,810	2,649
Desvio Padrão	0,17	1,02
PE-02 10E8 e LH 10E6	141,11	4,5799
PE-02 10E8 e LH 10E6	140,50	3,6989
PE-02 10E8 e LH 10E6	140,67	2,7689
Média	140,758	3,683
Desvio Padrão	0,31	0,91
PE-02 10E8 e LH 10E5	140,96	4,5079
PE-02 10E8 e LH 10E5	140,89	1,495987
PE-02 10E8 e LH 10E5	140,57	2,0347
Média	140,808	2,680
Desvio Padrão	0,21	1,61
Mista 1 - 10E8	138,31	0,9386
Mista 1 - 10E8	139,95	1,39486
Mista 1 - 10E8	140,64	3,56987
Média	139,633	1,968
Desvio Padrão	1,20	1,41
Mista 1 - 10E7	138,28	0,49586
Mista 1 - 10E7	140,45	2,586
Mista 1 - 10E7	140,56	0,6735
Média	139,762	1,252
Desvio Padrão	1,29	1,16
Mista 1 - 10E6	137,77	0,2476
Mista 1 - 10E6	141,49	1,0835
Mista 1 - 10E6	140,89	0,8365
Média	140,049	0,723
Desvio Padrão	2,00	0,43
Mista 1 - 10E5	140,20	0,2875
Mista 1 - 10E5	140,92	0,5887
Mista 1 - 10E5	141,51	0,49784
Média	140,877	0,458
Desvio Padrão	0,65	0,15
PE-02 10E8 e LF 10E8	140,55	2,3486
PE-02 10E8 e LF 10E8	140,87	3,4578

Tratamentos	ART inicial(g/L)	ART Residual (g/L)
PE-02 10E8 e LF 10E8	140,45	1,05656
Média	140,624	2,288
Desvio Padrão	0,22	1,20
PE-02 10E8 e LF 10E7	140,77	2,3468
PE-02 10E8 e LF 10E7	140,67	1,9835
PE-02 10E8 e LF 10E7	141,00	2,08643
Média	140,810	2,139
Desvio Padrão	0,17	0,19
PE-02 10E8 e LF 10E6	141,11	2,93487
PE-02 10E8 e LF 10E6	140,50	0,175
PE-02 10E8 e LF 10E6	140,67	2,09568
Média	140,758	1,735
Desvio Padrão	0,31	1,41
PE-02 10E8 e LF 10E5	140,96	1,86749
PE-02 10E8 e LF 10E5	140,89	2,57785
PE-02 10E8 e LF 10E5	140,57	0,198
Média	140,808	1,548
Desvio Padrão	0,21	1,22
PE-02 10E8 e LA 10E8	185,082	0,00
PE-02 10E8 e LA 10E8	183,948	0,00
PE-02 10E8 e LA 10E8	184,375	2,45
Média	184,468	0,817
Desvio Padrão	0,57	1,41
PE-02 10E8 e LA 10E7	184,848	1,83
PE-02 10E8 e LA 10E7	184,575	3,65
PE-02 10E8 e LA 10E7	184,524	1,65
Média	184,649	2,375
Desvio Padrão	0,17	1,10
PE-02 10E8 e LA 10E6	184,544	5,86
PE-02 10E8 e LA 10E6	184,965	2,46
PE-02 10E8 e LA 10E6	184,312	1,35
Média	184,607	3,223
Desvio Padrão	0,33	2,35
PE-02 10E8 e LA 10E5	184,373	3,70
PE-02 10E8 e LA 10E5	184,233	3,12
PE-02 10E8 e LA 10E5	184,184	0,90
Média	184,264	2,573
Desvio Padrão	0,10	1,48
Testemunha	187,9173448	0
Testemunha	187,4754702	0
Testemunha	187,8075637	0
Média	187,733	0,000
Desvio Padrão	0,23	0,00
PE-02 10E8 e LP 10E8	184,088	7,85
PE-02 10E8 e LP 10E8	184,196	8,45

Tratamentos	ART inicial(g/L)	ART Residual (g/L)
PE-02 10E8 e LP 10E8	184,302	9,74
Média	184,195	8,680
Desvio Padrão	0,11	0,97
PE-02 10E8 e LP 10E7	184,840	4,23
PE-02 10E8 e LP 10E7	185,666	1,74
PE-02 10E8 e LP 10E7	186,540	4,8
Média	185,682	3,590
Desvio Padrão	0,85	1,63
PE-02 10E8 e LP 10E6	184,229	1,87
PE-02 10E8 e LP 10E6	184,713	3,6
PE-02 10E8 e LP 10E6	188,369	2,5
Média	185,770	2,657
Desvio Padrão	2,26	0,88
PE-02 10E8 e LP 10E5	184,469	2,2
PE-02 10E8 e LP 10E5	185,537	0,98
PE-02 10E8 e LP 10E5	184,684	1,3
Média	184,897	1,493
Desvio Padrão	0,56	0,63

Tabela A3 – Resultados obtidos para as eficiências de fermentação de todos os experimentos e controle

Tratamentos	Ef. Fermentação (%)
PE-02 10E8 e LH 10E8	85,6
PE-02 10E8 e LH 10E8	86,4
PE-02 10E8 e LH 10E8	85,4
Média	85,8
Desvio Padrão	0,5
PE-02 10E8 e LH 10E7	87,0
PE-02 10E8 e LH 10E7	88,4
PE-02 10E8 e LH 10E7	84,7
Média	86,7
Desvio Padrão	1,9
PE-02 10E8 e LH 10E6	88,0
PE-02 10E8 e LH 10E6	86,6
PE-02 10E8 e LH 10E6	85,7
Média	86,7
Desvio Padrão	1,2
PE-02 10E8 e LH 10E5	87,1
PE-02 10E8 e LH 10E5	91,1
PE-02 10E8 e LH 10E5	88,6
Média	89,0
Desvio Padrão	2,0
Mista 1 - 10E8	89,6
Mista 1 - 10E8	88,5
Mista 1 - 10E8	86,6
Média	88,2
Desvio Padrão	1,5
Mista 1 - 10E7	91,7
Mista 1 - 10E7	85,7
Mista 1 - 10E7	89,1
Média	88,8
Desvio Padrão	3,0
Mista 1 - 10E6	91,8
Mista 1 - 10E6	88,9
Mista 1 - 10E6	88,6
Média	89,8
Desvio Padrão	1,8
Mista 1 - 10E5	91,2
Mista 1 - 10E5	89,2
Mista 1 - 10E5	88,9
Média	89,8
Desvio Padrão	1,2
PE-02 10E8 e LF 10E8	84,8
PE-02 10E8 e LF 10E8	85,0

Tratamentos	Ef. Fermentação (%)
PE-02 10E8 e LF 10E8	87,2
Média	85,7
Desvio Padrão	1,3
PE-02 10E8 e LF 10E7	85,7
PE-02 10E8 e LF 10E7	86,5
PE-02 10E8 e LF 10E7	87,2
Média	86,5
Desvio Padrão	0,7
PE-02 10E8 e LF 10E6	87,4
PE-02 10E8 e LF 10E6	91,9
PE-02 10E8 e LF 10E6	86,5
Média	88,6
Desvio Padrão	2,9
PE-02 10E8 e LF 10E5	87,8
PE-02 10E8 e LF 10E5	88,1
PE-02 10E8 e LF 10E5	90,7
Média	88,9
Desvio Padrão	1,6
PE-02 10E8 e LA 10E8	89,90
PE-02 10E8 e LA 10E8	90,53
PE-02 10E8 e LA 10E8	92,86
Média	91,1
Desvio Padrão	1,6
PE-02 10E8 e LA 10E7	92,29
PE-02 10E8 e LA 10E7	90,87
PE-02 10E8 e LA 10E7	88,99
Média	90,7
Desvio Padrão	1,7
PE-02 10E8 e LA 10E6	87,9
PE-02 10E8 e LA 10E6	92,7
PE-02 10E8 e LA 10E6	91,3
Média	90,7
Desvio Padrão	2,4
PE-02 10E8 e LA 10E5	91,6
PE-02 10E8 e LA 10E5	89,8
PE-02 10E8 e LA 10E5	88,8
Média	90,1
Desvio Padrão	1,4
Testemunha	90,3
Testemunha	91,8
Testemunha	89,3
Média	90,5
Desvio Padrão	1,2
PE-02 10E8 e LP 10E8	89,9
PE-02 10E8 e LP 10E8	88,1

Tratamentos	Ef. Fermentação (%)
PE-02 10E8 e LP 10E8	87,1
Média	88,4
Desvio Padrão	1,4
PE-02 10E8 e LP 10E7	87,1
PE-02 10E8 e LP 10E7	89,5
PE-02 10E8 e LP 10E7	88,1
Média	88,3
Desvio Padrão	1,2
PE-02 10E8 e LP 10E6	89,9
PE-02 10E8 e LP 10E6	88,9
PE-02 10E8 e LP 10E6	90,6
Média	89,8
Desvio Padrão	0,9
PE-02 10E8 e LP 10E5	89,4
PE-02 10E8 e LP 10E5	89,2
PE-02 10E8 e LP 10E5	90,0
Média	89,5
Desvio Padrão	0,5