



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

EFEITO DO SISTEMA DE FERMENTAÇÃO, DA ADIÇÃO DE ETANOL AO
TRATAMENTO ÁCIDO E DA CONTAMINAÇÃO POR *Lactobacillus sp* NA
PRODUÇÃO DE ETANOL

MARCELO AUGUSTO DE SOUZA COSTA

Araras
2017



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

**EFEITO DO SISTEMA DE FERMENTAÇÃO, DA ADIÇÃO DE ETANOL AO
TRATAMENTO ÁCIDO E DA CONTAMINAÇÃO POR *Lactobacillus sp* NA
PRODUÇÃO DE ETANOL**

MARCELO AUGUSTO DE SOUZA COSTA

ORIENTADOR: PROFa. Dra. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI

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

2017

DE SOUZA COSTA, MARCELO AUGUSTO

EFEITO DO SISTEMA DE FERMENTAÇÃO, DA ADIÇÃO DE ETANOL AO TRATAMENTO ÁCIDO E DA CONTAMINAÇÃO POR *Lactobacillus* sp NA PRODUÇÃO DE ETANOL / MARCELO AUGUSTO DE SOUZA COSTA. -- 2017.

91 f. : 30 cm.

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

Orientador: SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI

Banca examinadora: Margareth Batistote, Reinaldo Gaspar Bastos

Bibliografia

1. batelada alimentada. 2. bactéria contaminante. 3. *Lactobacillus fermentum*. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Marcelo Augusto de Souza Costa, realizada em 10/04/2017:

Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini
UFSCar

MARGARETH BATISTOTE

Profa. Dra. Margareth Batistote
UEMS

Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos
UFSCar

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por tantas realizações conquistadas. Gostaria de agradecer a todas pessoas que sempre acreditaram em mim, me deram força para seguir em frente nos momentos de dificuldades. À minha família, em especial minha avó Ofélia Coradine de Souza, que sempre me apoiou, e que se não fosse por ela nada disso seria possível. À minha namorada Michele da Silva Gomes, que mesmo longe sempre esteve comigo me ajudando de todas as formas possíveis, e me incentivando nos momentos difíceis.

Gostaria de agradecer à minha orientadora Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini, pela orientação, confiança e todos os ensinamentos durante esses anos do curso. Gostaria de agradecer imensamente ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados pela oportunidade e à UFSCar-CCA por toda a estrutura para realizar o trabalho.

A equipe do LAMAM, às professoras Dra. Silvana Perissatto Meneghin e Dra. Marcia Maria Rosa Magri e à técnica Lucia T. Picollo Silva, pela convivência do dia-a-dia, pela ajuda em todos os anos de trabalho no laboratório e por todo o carinho e o bate-papo. A todos os professores do programa pela oportunidade de conhecê-los e principalmente por todo aprendizado nestes anos de trabalho, em especial para o professor Dr. Reinaldo Gaspar Bastos, pela ajuda no experimento.

SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO	01
OBJETIVOS	04
REVISÃO DA LITERATURA	06
1 Setor sucroenergético.....	06
2 Bioquímica da fermentação alcoólica.....	08
3 Sistemas de fermentação.....	10
3.1 Batelada simples.....	11
3.2 Batelada alimentada.....	12
4 Contaminação no processo fermentativo.....	15
5 Formas de controle do crescimento bacteriano.....	18
LITERATURA CITADA	21
CAPÍTULO 1. Efeito do sistema de fermentação sobre a contaminação por <i>Lactobacillus sp</i> no processo de fermentação alcoólica com reciclo celular	33
1 Resumo.....	33
2 Introdução.....	34
3 Materiais e Métodos.....	35
3.1 Micro-organismos.....	35
3.2 Preparação dos inóculos bacterianos e de leveduras.....	36
3.3 Processo fermentativo.....	37
3.4 Análises.....	38
3.4.1 Análises microbiológicas.....	38
3.4.2 Análises físico-químicas.....	39
3.4.3 Análises estatísticas.....	40
3.5 Cálculo da eficiência fermentativa e de variação logarítmica...	40
4 Resultados e Discussão.....	40
4.1 Análises microbiológicas.....	40

4.2	Análises físico-químicas.....	45
5	Conclusões.....	56
6	Literatura citada.....	56
CAPÍTULO 2. Efeito da adição de etanol ao tratamento ácido para o controle da contaminação por <i>Lactobacillus fermentum</i>.....		59
1	Resumo.....	59
2	Introdução.....	60
3	Materiais e Métodos.....	63
3.1	Micro-organismos.....	63
3.2	Preparação dos inóculos bacterianos e de leveduras.....	63
3.3	Determinação da concentração mínima de etanol inibitória à <i>L. fermentum</i> quando adicionado ao tratamento ácido.....	64
3.4	Processo fermentativo com reciclo e tratamento celular.....	65
3.5	Análises.....	66
3.5.1	Análises microbiológicas.....	66
3.5.2	Análises físico-químicas.....	67
3.5.3	Análises estatísticas.....	68
3.6	Cálculo da eficiência fermentativa e de variação logarítmica...	68
4	Resultados e Discussão.....	68
4.1	Determinação da concentração mínima de etanol inibitória à <i>L. fermentum</i> quando adicionado ao tratamento ácido.....	68
4.2	Processo fermentativo com reciclo e tratamento celular.....	70
4.2.1	Análises microbiológicas.....	70
4.2.2	Análises físico-químicas.....	75
5	Conclusões.....	85
6	Literatura citada.....	85
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....		90

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Esquema representativo das características e diferenças entre os processo fermentativo contínuo e batelada alimentada com reciclo de células..	14

Capítulo 1

Tabela 1. Variação logarítmica (média e desvio-padrão) do crescimento de <i>S. cerevisiae</i> (PE) em fermentação não contaminada e contaminada com <i>L. fermentum</i> (PE + LF) e <i>L. plantarum</i> (PE + LP) em sistema de batelada simples e alimentada com reciclo celular.....	43
Tabela 2. Variação logarítmica (média e desvio-padrão) do crescimento de <i>L. fermentum</i> e <i>L. plantarum</i> em fermentação conduzida por <i>S. cerevisiae</i> em sistema de batelada simples e alimentada com reciclo celular.....	45
Tabela 3. Análise de variância dos valores de pH nas fermentações desenvolvidas em caldo de cana, com a cultura pura de <i>S. cerevisiae</i> e contaminadas com <i>L. fermentum</i> ou <i>L. plantarum</i> , ao longo de seis ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, pH inicial 4,5, em sistema de batelada simples e batelada alimentada com reciclo celular.....	46
Tabela 4. Análise de variância da produção de etanol nas fermentações desenvolvidas em caldo de cana, com a cultura pura de <i>S. cerevisiae</i> e contaminadas com <i>L. fermentum</i> ou <i>L. plantarum</i> , ao longo de seis ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, pH inicial 4,5, em sistema de batelada simples e batelada alimentada com reciclo celular.....	48
Tabela 5. Análise de variância dos valores de ART nas fermentações desenvolvidas em caldo de cana, com a cultura pura de <i>S. cerevisiae</i> e contaminadas com <i>L. fermentum</i> ou <i>L. plantarum</i> , ao longo de seis ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, pH inicial 4,5, em sistema de batelada simples e batelada alimentada com reciclo celular.....	51

Capítulo 2

Tabela 1. Variação logarítmica (média e desvio-padrão) do crescimento de <i>S. cerevisiae</i> (PE) em fermentação não contaminada e contaminada com <i>L. fermentum</i> (PE + LF) em sistema de batelada alimentada com reciclo celular e tratamento ácido com e sem adição de 5% de etanol.....	72
Tabela 2. Variação logarítmica (média e desvio-padrão) do crescimento de <i>L. fermentum</i> (LF) em fermentação conduzida por <i>S. cerevisiae</i> em sistema de batelada alimentada com reciclo celular e tratamento ácido com e sem adição de 5% de etanol.....	73

- Tabela 3. Análise de variância dos valores de pH nas fermentações desenvolvidas em caldo de cana, com a cultura pura de *S. cerevisiae* e contaminada com *L. fermentum*, ao longo de seis ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, em sistema de batelada alimentada com reciclo celular e tratamento ácido sem adição de etanol e com adição de 5% de etanol..... 76
- Tabela 4. Análise de variância da produção de etanol nas fermentações desenvolvidas em caldo de cana, com a cultura pura de *S. cerevisiae* e contaminada com *L. fermentum*, ao longo de seis ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, em sistema de batelada alimentada com reciclo celular e tratamento ácido sem adição de etanol e com adição de 5% de etanol..... 78
- Tabela 5. Análise de variância dos valores de ART residual nas fermentações desenvolvidas em caldo de cana nas fermentações desenvolvidas com *S. cerevisiae* (PE) e *L. fermentum* (PE+LF) ao longo de seis ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, pH inicial 4,5, em sistema de batelada alimentada com reciclo celular e tratamento ácido sem adição de etanol e com adição de 5% de etanol..... 81

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema representativo das etapas de conversão de açúcares a etanol que ocorrem no citosol das células de leveduras.....	10
Figura 2. Esquema representativo do processo fermentativo em batelada alimentada com reciclo de células.....	13

Capítulo 1

Figura 1. Número de leveduras (UFC/mL) nas fermentações desenvolvidas em caldo de cana, com a cultura pura de <i>S. cerevisiae</i> (PE) e contaminadas com <i>L. fermentum</i> (PE+LF) ou <i>L. plantarum</i> (PE+LP), ao longo de seis ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, pH inicial 4,5, em sistema de batelada simples (A) e batelada alimentada (B) com reciclo celular. 'Inicial' refere-se aos resultados no início do 1º. ciclo fermentativo.....	42
Figura 2. Número de bactérias (UFC/mL) nas fermentações desenvolvidas em caldo de cana com <i>S. cerevisiae</i> (PE) e <i>L. fermentum</i> (PE+LF) ou <i>L. plantarum</i> (PE+LP), ao longo de seis ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, pH inicial 4,5, em sistema de batelada simples (A) e batelada alimentada (B) com reciclo celular. 'Inicial' refere-se aos resultados no início do 1º. ciclo fermentativo.....	44
Figura 3. Valor de pH do caldo de cana nas fermentações desenvolvidas com a cultura pura de <i>S. cerevisiae</i> (PE) e contaminadas com <i>L. fermentum</i> (PE+LF) ou <i>L. plantarum</i> (PE+LP), ao longo de seis ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, pH inicial 4,5, em sistema de batelada simples (A) e batelada alimentada (B) com reciclo celular.....	47
Figura 4. Produção de etanol (g/100 mL) nas fermentações desenvolvidas em caldo de cana, com a cultura pura de <i>S. cerevisiae</i> (PE) e contaminadas com <i>L. fermentum</i> (PE+LF) ou <i>L. plantarum</i> (PE+LP), ao longo de seis ciclos fermentativos de 9 horas, pH inicial 4,5, a 30°C, em sistema de batelada simples (A) e batelada alimentada (B) com reciclo celular.....	49
Figura 5. Açúcar redutor total residual (ART, g/100 mL) nas fermentações desenvolvidas em caldo de cana, com a cultura pura de <i>S. cerevisiae</i> (PE) e contaminadas com <i>L. fermentum</i> (PE+LF) ou <i>L. plantarum</i> (PE+LP), ao longo de seis ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, pH inicial 4,5, em sistema de batelada simples (A) e batelada alimentada (B) com reciclo celular. ART inicial= 17,7 g/100 mL.....	53

Figura 6. Eficiência fermentativa (%) das fermentações desenvolvidas em caldo de cana, com a cultura pura de *S. cerevisiae* (PE) e contaminadas com *L. fermentum* (PE+LF) ou *L. plantarum* (PE+LP), ao longo de seis ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, pH inicial 4,5, em sistema de batelada simples (A) e batelada alimentada (B) com reciclo celular. As linhas horizontais e os números em porcentagem indicam o valor médio de eficiência de cada fermentação..... 55

Capítulo 2

Figura 1. Número de *L. fermentum* (UFC/mL) determinado antes do tratamento (Inicial), após o tratamento e após o crescimento em caldo de cana da massa celular tratada em solução ácida (pH 2,0) com e sem adição de etanol, a 30°C, 160 rpm, por 2 horas..... 69

Figura 2. Número de leveduras (UFC/mL) nas fermentações desenvolvidas em caldo de cana, com a cultura pura de *S. cerevisiae* (PE) e contaminada com *L. fermentum* (PE+LF), ao longo de seis ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, em sistema de batelada alimentada com reciclo celular e tratamento ácido sem adição de etanol (A) e com adição de 5% de etanol (B). Legenda: 'Inicial'= início do 1º. ciclo fermentativo; '*'= após o tratamento das células; nos demais, as contagens se referem ao final do ciclo fermentativo, antes do tratamento das células..... 71

Figura 3. Número de bactérias (UFC/mL) nas fermentações desenvolvidas em caldo de cana com *S. cerevisiae* ao longo de seis ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, em sistema de batelada alimentada com reciclo celular e tratamento ácido sem adição de etanol (A) e com adição de 5% de etanol (B). Legenda: 'Inicial'= início do 1º. ciclo fermentativo; '*'= após o tratamento das células; nos demais, as contagens se referem ao final do ciclo fermentativo, antes do tratamento das células..... 74

Figura 4. Valor de pH do caldo de cana nas fermentações desenvolvidas com *S. cerevisiae* (PE) e *L. fermentum* (PE+LF) ao longo de seis ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, pH inicial 4,5, em sistema de batelada alimentada com reciclo celular e tratamento ácido sem adição de etanol (A) e com adição de 5% de etanol (B)..... 77

Figura 5. Produção de etanol nas fermentações desenvolvidas com *S. cerevisiae* (PE) e *L. fermentum* (PE+LF) ao longo de seis ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, pH inicial 4,5, em sistema de batelada alimentada com reciclo celular e tratamento ácido sem adição de etanol (A) e com adição de 5% de etanol (B)..... 80

Figura 6. ART residual nas fermentações desenvolvidas em caldo de cana, com a cultura pura de *S. cerevisiae* (PE) e contaminadas com *L. fermentum* (PE+LF), ao longo de seis ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, pH inicial 4,5, em sistema de batelada alimentada com tratamento celular com solução ácida (A) e solução ácida com 5% de etanol (B). ART inicial= 17,7 g/100 mL.... 82

Figura 7. Eficiência fermentativa (%) das fermentações desenvolvidas em caldo de cana, com a cultura pura de *S. cerevisiae* (PE) e contaminada com *L. fermentum* (PE+LF), ao longo de seis ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, pH inicial 4,5, em sistema de batelada alimentada com tratamento celular com solução ácida (A) e solução ácida com 5% de etanol (B). As linhas horizontais e os números em porcentagem indicam o valor médio de eficiência de cada fermentação.....

EFEITO DO SISTEMA DE FERMENTAÇÃO, DA ADIÇÃO DE ETANOL AO TRATAMENTO ÁCIDO E DA CONTAMINAÇÃO POR *Lactobacillus sp* NA PRODUÇÃO DE ETANOL

Autor: MARCELO AUGUSTO DE SOUZA COSTA

Orientador: Profa. Dra. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI

RESUMO

A fermentação é uma das etapas mais críticas do processo de produção de etanol combustível. Alguns fatores influenciam diretamente na eficiência fermentativa, como por exemplo, o sistema de fermentação utilizado, a linhagem selecionada empregada e a contaminação por bactérias, especialmente as do gênero *Lactobacillus*. Para controle das bactérias, as indústrias aplicam antibióticos e biocidas, porém, esses produtos podem acarretar aumento de custo e problemas ambientais para a indústria. O tratamento ácido (solução de ácido sulfúrico, pH 2,0) do fermento empregado entre os ciclos fermentativos nem sempre é eficaz para combater a contaminação bacteriana. Nesse contexto, o presente trabalho teve por objetivos inicialmente avaliar o efeito do sistema de fermentação -batelada simples e batelada alimentada - sobre a contaminação do mosto de caldo de cana com as bactérias *Lactobacillus*, em fermentação com seis ciclos celulares conduzida pela levedura industrial *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. Em seguida avaliou-se o efeito da adição de etanol ao tratamento ácido para o controle do crescimento de *L. fermentum*, em fermentação em batelada alimentada com reciclo celular. Em sistema de batelada alimentada, verificou-se maior produção de etanol, maior eficiência fermentativa e maior variação logarítmica de crescimento da levedura. A bactéria *L. fermentum* foi mais prejudicial à fermentação do que *L. plantarum*, resultando em maior sobra de açúcar no meio fermentado e menor eficiência fermentativa, nos dois sistemas. O efeito das contaminações no sistema de batelada simples foi maior do que no sistema de batelada com alimentação especialmente pelo fato de a alimentação permitir um maior desenvolvimento da levedura, que pode assim competir em melhor condição com a bactéria contaminante. Em relação à modificação do tratamento das células entre os ciclos fermentativos, só com o tratamento ácido, a população de *L. fermentum* reduziu quase 3 ciclos log ao final do sexto ciclo fermentativo, no entanto, quando se adicionou 5% de etanol à solução ácida, a bactéria perdeu completamente a viabilidade celular já ao final do primeiro ciclo fermentativo com o tratamento. Não houve alteração na produção de etanol na fermentação contaminada com *L. fermentum*, comparando-se os tratamentos celulares com e sem adição de 5% de etanol. O tratamento ácido + 5% de etanol foi capaz de reduzir a população de *L. fermentum* sem causar impacto à eficiência fermentativa, e com uma concentração de ART residual baixa (cerca de 4 g/100 mL), ao final de 6 ciclos fermentativos de 9 horas, em sistema de batelada alimentada.

Palavras-chave: batelada alimentada, bactéria contaminantes, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces cerevisiae*.

EFFECT OF THE FERMENTATION SYSTEM, THE ADDITION OF ETHANOL TO THE ACID TREATMENT AND THE CONTAMINATION BY *Lactobacillus sp* ON THE ETHANOL PRODUCTION

Author: MARCELO AUGUSTO DE SOUZA COSTA

Adviser: Prof Dr SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI

ABSTRACT

The fermentation is one of the most critical steps of the fuel ethanol production. Some factors directly influence the fermentation efficiency, such as the fermentation system, the selected yeast and the bacterial contamination, especially from the genus *Lactobacillus*. For the control of the contamination, the industries apply antibiotics and biocides, however, these products can result in increased cost and environmental problems for the industry. The use of the acid treatment (sulphuric acid solution, pH 2.0) of the cells between the cycles of fermentation is not always effective to combat the bacterial contamination. In this context, the present study aimed to evaluate the effect of fermentation system – simple batch and fed batch – on the contamination of the sugarcane juice with *Lactobacillus sp*, in a cell-recycled fermentation with the selected yeast strain of *S. cerevisiae* PE-2. Following, the effect of ethanol addition to the acid treatment was evaluated to control the bacterial growth in fed-batch system with cell recycle. In the fed-batch system, a higher ethanol production and efficiency was verified, as well as a higher logarithmic variation of the yeast growth. The bacterium *L. fermentum* was more harmful to the fermentation than *L. plantarum*, resulting in more sugar left in the fermented must and lower fermentative efficiency, in both systems. The effect of contaminations in the single batch system was higher than in the fed-batch system especially since the substrate feeding allowed a better yeast development, which could be more competitive with the contaminant bacterium. Regarding the modification in the acid treatment performed between the fermentative cycles, only with the acid treatment, the population of *L. fermentum* reduced almost 3 log cycles at the end of the sixth fermentative cycle, however, when 5% of ethanol was added to the acid solution, the bacterium lost completely the cell viability right after the first fermentative cycle. There was no alteration in the ethanol production in the fermentation contaminated with *L. fermentum*, comparing the cell treatments with and without the addition of 5% ethanol. The acid treatment + 5% ethanol was able to reduce the population of *L. fermentum* without impact to the fermentative efficiency and with a low residual sugar concentration in the fermentative must (around 4 g/100 mL), at the end of six nine-hour fermentative cycles, in fed-batch system.

Key-words: fed-batch, bacterial contamination, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces cerevisiae*.

INTRODUÇÃO

A indústria sucroenergética no Brasil traz muitos benefícios para as regiões onde se encontra, pois propicia muitos empregos (diretos e indiretos) fazendo que tenha um grande impacto não só na economia local, mas também na economia do país. A obtenção do etanol combustível é produzida a partir da fermentação de açúcares pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a qual converte o substrato em etanol. Este micro-organismo é capaz de resistir a condições de estresse e apresenta alta eficiência fermentativa, crescimento rápido, uso eficaz do açúcar, alta capacidade de produzir etanol, os quais são fatores fundamentais para a produção em escala industrial. Atualmente o setor utiliza leveduras isoladas do próprio processo fermentativo, conhecidas como leveduras personalizadas, as quais são utilizadas como inóculo nas indústrias na safra seguinte. Dentre as selecionadas, as linhagens PE-2 e CAT-1 são responsáveis pela maior parte do etanol produzido no Brasil.

No Brasil, há dois tipos distintos de processo fermentativo, o processo contínuo e o processo descontínuo, sendo que no processo descontínuo há dois subgrupos, o processo de batelada simples e o processo de batelada alimentada. O processo mais utilizado no Brasil é o de batelada alimentada com reciclo celular. Basicamente, o que difere um do outro é que no sistema de batelada alimentada são realizadas alimentações dosadas do substrato em intervalos de tempo, enquanto no

sistema de batelada simples o substrato é adicionado nas dornas já com o volume final. Uma das vantagens de se realizar o sistema de batelada alimentada é que há uma maior maximização dos lucros, devido sua alta produtividade, alto crescimento celular e um menor índice de contaminação.

A fermentação é uma das etapas mais críticas do processo de produção de etanol, pelo fato do agente ser um micro-organismo e também pela facilidade que se tem de contaminação bacteriana no processo. Essa contaminação é uma das responsáveis por ocasionar grandes perdas na produção do etanol, além do fato de reduzir a eficiência fermentativa, pois as bactérias presentes no caldo acabam utilizando os açúcares presentes no caldo de cana para produzir outros compostos que não são de interesse da indústria sucroenergética.

As bactérias contaminantes que são mais encontradas na fermentação alcoólica industrial são na maioria *Lactobacillus* e *Bacillus*, e podem ser provenientes de vários lugares, como por exemplo, equipamentos e utensílios mal higienizados que são utilizados no processo e do próprio campo. A contaminação no processo também ser devido à natureza do processo industrial, pois se trata de um grande volume de substrato processado, causando certa dificuldade no controle e assepsia do processo fermentativo.

O gênero mais abundante no processo é de fato o *Lactobacillus*, sendo tradicionalmente classificado em dois sub-grupos de acordo com as vias metabólicas utilizadas para converter os substratos em produto, as bactérias homofermentativas e as heterofermentativas, representadas por *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus fermentum*, respectivamente.

Portanto, pesquisas que visem uma melhor compreensão dos efeitos provocados pela contaminação das bactérias *L. fermentum* e *L. plantarum* no processo de fermentação alcoólica são muito importantes. Como o sistema de fermentação pode interferir no rendimento fermentativo, é também relevante avaliar em que extensão o sistema fermentativo pode afetar a contaminação bacteriana, o que motiva a execução do presente trabalho.

Para combater os problemas causados principalmente pela contaminação por bactérias, as destilarias utilizam o tratamento ácido do fermento, que consiste na mistura da massa celular centrifugada após a fermentação, com uma solução de ácido sulfúrico, pH 2,0 a 2,5, por um período de 2 horas em média. No entanto, esse

tratamento pode não ser suficiente para diminuir os níveis de contaminação, o que leva as indústrias a procurar por outras alternativas.

A utilização de antibióticos convencionais e biocidas é muito frequente nas destilarias para o combate da contaminação bacteriana, no entanto, o alto custo e os resíduos que permanecem nos subprodutos acabam por inviabilizar o seu emprego. Além disso, pode ocorrer problema ambiental quando se utiliza o tratamento com antibiótico, pois após a fermentação, a vinhaça (resíduo da destilação do mosto fermentado) é reutilizada nos campos como adubo e traços dos antibióticos podem voltar para o campo, causando um efeito de resistência das bactérias ou selecionando as bactérias resistentes para aquele determinado antibiótico. Assim, quando ocorrer a contaminação bacteriana no processo fermentativo novamente, o antibiótico pode não mais fazer efeito sobre as bactérias, demandando aumento da dose ou substituição por outro antibiótico.

Considerando que a utilização de antibióticos deva ser minimizada e baseando-se em trabalhos anteriormente realizados, procurou-se também avaliar no presente trabalho o efeito da adição de etanol ao tratamento ácido do fermento para verificar o efeito sobre a contaminação por *L. fermentum* e sobre a levedura do processo. A utilização do etanol não iria gerar um custo extra para a indústria visto ser o produto principal da mesma e eliminaria os efeitos residuais sobre a biomassa da levedura e vinhaça, os quais são subprodutos da indústria do bioetanol.

OBJETIVOS

Geral:

O presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito do sistema de fermentação - batelada simples e batelada alimentada - sobre a contaminação do mosto de caldo de cana com bactérias *Lactobacillus sp*, e uma forma de controle do crescimento bacteriano baseado em uma modificação na etapa do tratamento ácido.

Específicos:

- Avaliar o efeito da contaminação do mosto de caldo de cana por *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus plantarum*, em sistema de batelada alimentada comparada com batelada simples, em fermentação conduzida pela levedura *S. cerevisiae* linhagem selecionada PE-2, com base nos parâmetros fermentativos bem como verificar se há relação entre a espécie da bactéria contaminante e o sistema de fermentação quanto aos efeitos sobre os parâmetros fermentativos;

- Avaliar a adição de etanol ao tratamento ácido realizado entre os ciclos fermentativos tem-se efeito sobre a bactéria contaminante e a levedura do processo, reestabelecendo os parâmetros fermentativos aos níveis de uma fermentação sem contaminação.

REVISÃO DA LITERATURA

1 Setor sucroenergético

O setor sucroenergético é um dos principais setores do agronegócio brasileiro, com contribuição importante e direta para o PIB nacional. O produto 'etanol' produzido pelo setor é um dos biocombustíveis mais consumidos no mundo, sendo os Estados Unidos e Brasil os maiores produtores mundiais (BASSO et al., 2011). Segundo o terceiro levantamento da CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), realizado no mês de dezembro de 2016, a safra 2016/17 de cana-de-açúcar foi de 694,54 milhões de toneladas, um crescimento avaliado em 4,4% em relação à safra 2015/2016. No entanto, houve uma redução de 8,5% na produção de etanol em razão da preferência pela produção de açúcar. A produção de etanol anidro deverá ter um aumento de 1,5% devido ao aumento do consumo da gasolina em detrimento ao etanol hidratado (CONAB, 2017).

No Brasil, o estado que mais contribui para o setor é o estado de São Paulo, sendo o maior produtor de cana-de-açúcar do Brasil, conseqüentemente o maior produtor de álcool e açúcar do setor sucroenergético. A contribuição do estado de São Paulo para o setor é de 52% (4.498,3 mil hectares), seguido por Goiás com 10,4% (885,8 mil hectares), Minas Gerais com 10,1% (866,5 mil hectares), Mato

Grosso do Sul com 7% (596,8 mil hectares), Paraná com 6% (515,7 mil hectares), Alagoas com 3,7% (323,6 mil hectares), Pernambuco com 3% (254,2 mil hectares) e Mato Grosso com 2,7% (232,8 mil hectares). Estes oito estados são responsáveis por 94,9% da produção do Brasil (CONAB, 2016). Fica evidente que o setor sucroalcooleiro vem passando por uma grande expansão e o aumento na demanda do etanol se torna cada vez maior. Um dos fatores que contribuiu para o aumento da demanda do etanol é o aumento no percentual de 25% para 27,5% de etanol anidro adicionado à gasolina. Esta mudança foi resultado da alteração na legislação, com a publicação da Lei nº 13.033, em 25 de setembro de 2014, que condicionou o aumento da mistura à comprovação de sua viabilidade técnica segundo a união da indústria de cana-de-açúcar (ÚNICA, 2015).

Embora o cenário da produção se mostre positivo para o setor sucroenergético mesmo após anos da implantação da produção de etanol em larga escala no Brasil, tem-se notado cada vez mais frequente a palavra “crise” no setor sucroenergético. Mesmo diante de um crescimento vertiginoso da produção na última década, a persistente dificuldade financeira, o endividamento e a baixa lucratividade são aspectos mais ressaltados nas cinco últimas safras (SANTOS et al., 2016). Muitas das dificuldades enfrentadas pelo setor atualmente devem-se aos efeitos de variações no clima (MARTINS; OLIVETTE, 2015) e ao comprometimento da receita das indústrias com despesas operacionais (FIGLIOLINO, 2012; NASTARI, 2014; NEVES, 2014; NASCIMENTO, 2014), as quais ilustram o momento, contrastando com o tamanho e potencial dessa agroindústria (SANTOS et al., 2016).

Não é a primeira vez que o setor sucroenergético passa por dificuldade. A crise de 1989 perdurou até o início da década de 2000, em razão da queda na cotação do petróleo (RAMOS, 2012). Apesar da crise atual, assim como em 1989, há um cenário de otimismo para recuperação do setor, haja vista a produção da cana-de-açúcar que vem crescendo a cada ano, comprovando a força e o potencial do setor. Outra alternativa que o setor vem buscando é a pesquisa por novas fontes de renda, como por exemplo, a queima do bagaço para a co-geração de bioenergia, a qual se tornou uma terceira fonte de renda para as indústrias sucroenergéticas, ao lado do açúcar e etanol.

O setor sucroenergético tem se concentrado cada vez mais nas pesquisas para a produção de etanol de segunda geração. Atualmente, o governo federal e a iniciativa privada vêm incentivando a produção de combustíveis provenientes de

fontes renováveis, as quais podem ser óleos vegetais, materiais lignocelulósicos, entre outros. Dentre os mais variados tipos de biocombustíveis, o etanol proveniente dos materiais lignocelulósicos tem encontrado ampla aceitação por serem oriundos de fontes renováveis, reduzirem o descarte de resíduos agroindustriais no meio ambiente e por agregarem valor a materiais de baixo valor agregado, o que pode resultar em uma nova fonte de renda para os produtores rurais (LIMA et al., 2015)

No contexto da produção de etanol a partir de caldo e melaço, o setor tem se voltado mais intensamente para as pesquisas e estudos para otimizar os processos na produção do etanol, bem como a diminuição nos prejuízos. O processo de fermentação é um dos principais alvos da indústria do etanol combustível, visando otimizar e reduzir perdas na produção de etanol, como por exemplo, por contaminação bacteriana. Portanto, é fundamental e necessário o conhecimento das condições do processo e dos fatores que interferem na produção de etanol (FERRI et al., 2014).

2 Bioquímica da fermentação alcoólica

O etanol pode ser produzido por fermentação alcoólica com açúcares fermentescíveis a partir de produtos agrícolas, materiais celulósicos ou resíduos de plantas (BAPTISTA et al., 2006). Atualmente a produção de etanol a nível industrial, obtida pela fermentação alcoólica, utiliza predominantemente matérias-primas contendo açúcares e amidos, por serem economicamente mais favoráveis (HIRA; OLIVEIRA, 2009). A produção do biocombustível 'etanol' no Brasil utiliza a cana-de-açúcar como substrato, a qual apresenta balanço energético mais favorável que o milho, por exemplo, para a produção de etanol (BASSO et al., 2008; DELLA-BIANCA et al., 2013).

O processo fermentativo para obtenção de etanol por via fermentativa é constituído basicamente de três etapas: a primeira, o preparo do mosto; a segunda, o processo fermentativo; e a terceira, a destilação do vinho fermentado. Inicialmente a cana é moída, obtendo-se um caldo com 78% a 86% de água e 10% a 20% de sacarose, além de açúcares redutores, cinzas e compostos nitrogenados, que são de 0,8% a 3,5% no total, com pH que varia de 5,2 a 6,8 (LIMA et al., 2001).

O processo de produção de etanol ocorre pela ação da levedura *S. cerevisiae*, que realiza a conversão do substrato em etanol (AMORIM, 2005).

Bioquimicamente, a fermentação é a oxidação incompleta do açúcar, gerando como subproduto um composto orgânico oxidável. Inicialmente a sacarose, que é o açúcar de reserva da cana, sofre hidrólise pela enzima invertase sendo convertida em glicose e frutose. Ambas entram na via glicolítica e, através de uma sequência de reações, são convertidas a piruvato. Este primeiramente é descarboxilado pela enzima piruvato descarboxilase, formando acetaldeído e liberando CO₂. Posteriormente o acetaldeído é reduzido a etanol, sendo essa reação catalisada pela enzima desidrogenase alcoólica (MISSAWA, 2009).

A fermentação alcoólica pode ser entendida como a transformação de açúcares em etanol e pode ser esquematizada pela seguinte reação:



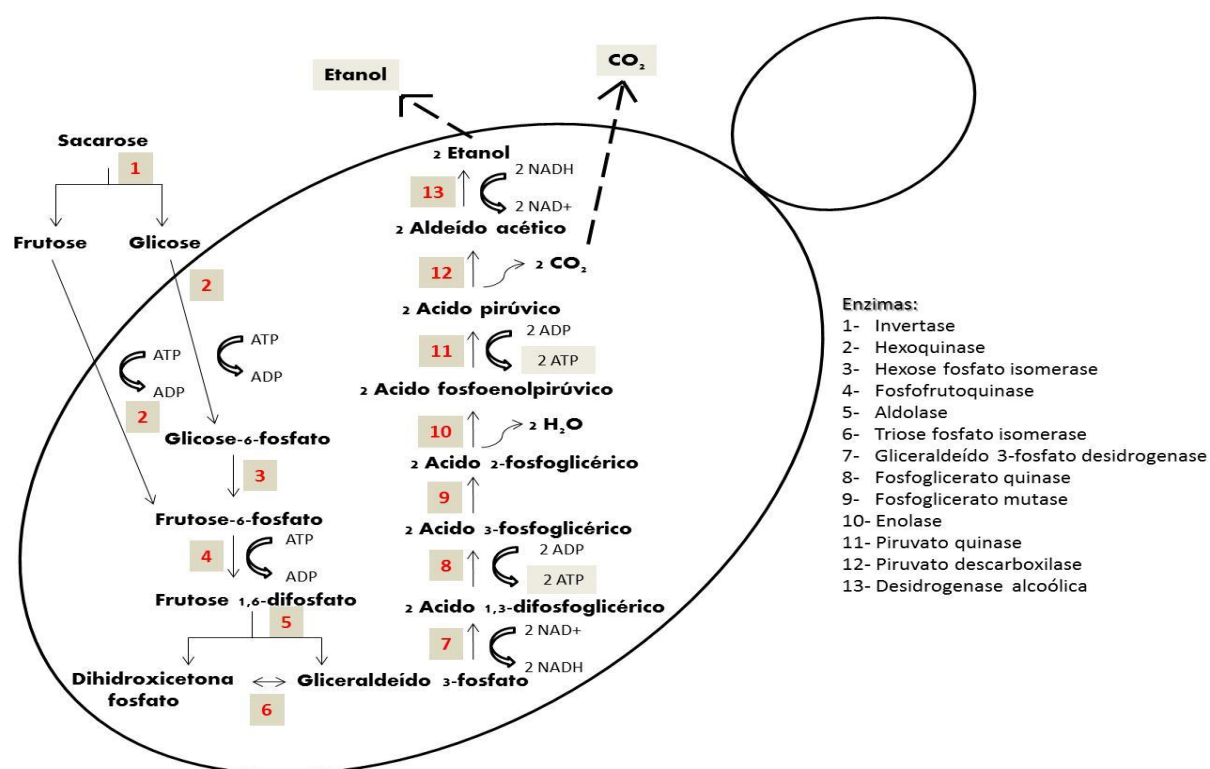
De acordo com a estequiometria, a partir de 1 g de glicose poderiam ser produzidos 0,51 g de etanol e 0,49 g de dióxido de carbono, porém, vários fatores, como por exemplo, contaminação bacteriana, contaminação por leveduras nativas, condições não ideais de pH e temperatura, entre outros fatores, e até mesmo a síntese celular e de produtos secundários, limitam o rendimento estequiométrico a valores muitas vezes bem inferiores a 100% da conversão do açúcar em etanol (GUIDINI, 2013).

A fermentação alcoólica resulta de dois processos distintos, glicólise (via de Embden-Meyerhof-Parnas) e o metabolismo anaeróbio do piruvato. Em microorganismos eucarióticos, a glicólise realiza-se na matriz citoplasmática, e divide-se em duas partes: a fase inicial de seis carbonos e a fase final de três carbonos. A finalidade do metabolismo do açúcar é gerar uma forma de energia, a Adenosina Trifosfato (ATP), que será empregada na realização de diversas funções fisiológicas (absorção, excreção e outras) e biossínteses necessárias à manutenção da vida, crescimento e multiplicação da levedura (ROMÃO, 2011).

Na fase dos seis carbonos, ocorre a fosforilação da glicose, por duas vezes, originando frutose 1,6-difosfato, com consumo de duas moléculas de ATP. Na fase dos três carbonos, ocorre a conversão a piruvato, formando-se quatro moléculas de ATP. O processo de redução de piruvato a etanol pode dividir-se também em duas etapas: na primeira etapa ocorre a descarboxilação do piruvato em uma reação irreversível catalisada pelo piruvato descarboxilase, e na segunda etapa o acetaldeído é reduzido a etanol (LIMA et al., 2001).

A transformação da sacarose em etanol e CO₂ envolve 12 reações em sequência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica, conforme esquema na Figura 1. O etanol e o CO₂ não são os únicos produtos obtidos por meio da fermentação alcoólica, além destes há vários subprodutos que são produzidos, como por exemplo, ácidos orgânicos, outros álcoois e o glicerol, um dos principais subprodutos da fermentação (BAI et al., 2008).

Figura 1. Esquema representativo das etapas de conversão de açúcares a etanol que ocorrem no citosol das células de leveduras.



Fonte: Do autor, baseado em Nelson e Cox (2014).

3. Sistemas de fermentação

Há dois tipos mais utilizados de sistemas de fermentação, o processo contínuo e o processo de batelada, sendo que no processo de batelada há dois subgrupos, o processo de batelada simples e o processo de batelada alimentada, os quais serão revisados a seguir.

3.1 Batelada simples

O processo de batelada simples é efetuado com um inóculo por tanque, que consiste na preparação do substrato adequado ao desenvolvimento do micro-organismo. Segundo Ceccato-Antonini (2010), a fermentação alcoólica que se desenvolve nas dornas de fermentação possui três etapas distintas:

1) A pré-fermentação, a qual se inicia quando o fermento (leveduras) é adicionado ao mosto devidamente preparado e se caracteriza por ativa multiplicação das células e elevação lenta e gradual da temperatura do meio.

2) Após cinco a seis horas, com pouca espuma, inicia-se a fermentação principal, que é reconhecida pela elevação rápida da temperatura, queda da densidade do mosto por causa do desaparecimento dos açúcares e da formação equivalente do álcool.

3) A acidez eleva-se abaixando o pH, desaparecendo as espumas, com duração de 9 a 10 horas.

No processo de batelada, a fermentação só tem início quando toda a dorna é completada com substrato e ocorre a mistura do mosto com o fermento, e o seu final é considerado quando ocorre a “morte” da dorna, ou seja, quando não há mais atividade das leveduras devido à baixa concentração de nutrientes presente no meio. Geralmente, a fermentação tem uma duração de 8 a 10 horas. A fermentação em batelada pode apresentar baixa eficiência e produtividade quando comparada à batelada alimentada, pois quando o substrato é adicionado de uma só vez no início da fermentação, ele exerce efeitos de inibição (CARVALHO; SATO, 2001; TOSETTO, 2002; PORTO, 2005).

O processo de batelada simples é econômico, e tem como vantagem as boas condições de higienização, conseqüentemente menor índice de contaminação, e a possibilidade de realizar manutenção sempre que for necessário. Outras vantagens da batelada são a flexibilidade de operação e condição de controle mais estreito da estabilidade genética do micro-organismo (CARVALHO; SATO, 2001; SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001).

Embora o processo de batelada simples tenha um menor índice de contaminação bacteriana comparada ao processo de batelada alimentada devido às melhores condições assépticas do processo, ainda pode-se dizer que há chances de ocorrer contaminação no processo. Levando em consideração que a fermentação é uma das etapas mais importantes e sem dúvida a mais crítica do processo, é

fundamental que haja muita atenção para o controle da contaminação bacteriana (CEBALLOS-SCHIAVONE, 2009). O caldo de cana utilizado no processo apresenta altos teores de nutrientes orgânicos e inorgânicos, altos teores de açúcar, temperatura e pH favoráveis para o desenvolvimento de micro-organismos contaminantes (GALLO; CANHOS, 1991).

3.2 Batelada alimentada

O processo de batelada alimentada, basicamente, apresenta as seguintes características: inicialmente, um inóculo por tanque é transferido a partir do tanque de tratamento para os fermentadores; em seguida, após a transferência do inóculo, realiza-se a alimentação dosada do meio e aos poucos, até o volume desejado. Assim que o substrato é convertido em etanol, o meio fermentado é enviado para a centrifuga, onde as células de levedura são separadas e enviadas para tanques de tratamento, onde são tratadas a fim de iniciar um novo ciclo (ANDRIETTA et al., 2011). A Figura 2 traz um esquema representativo do processo fermentativo em batelada com reciclo de células.

O desenvolvimento de uma estratégia de alimentação apropriada é um ponto importante em fermentação em batelada alimentada. Várias estratégias têm sido desenvolvidas para controlar a concentração de nutrientes dentro de intervalo ótimos, e tem sido aplicada para a cultura de células de alta densidade de vários micro-organismos (LEE et al., 1999).

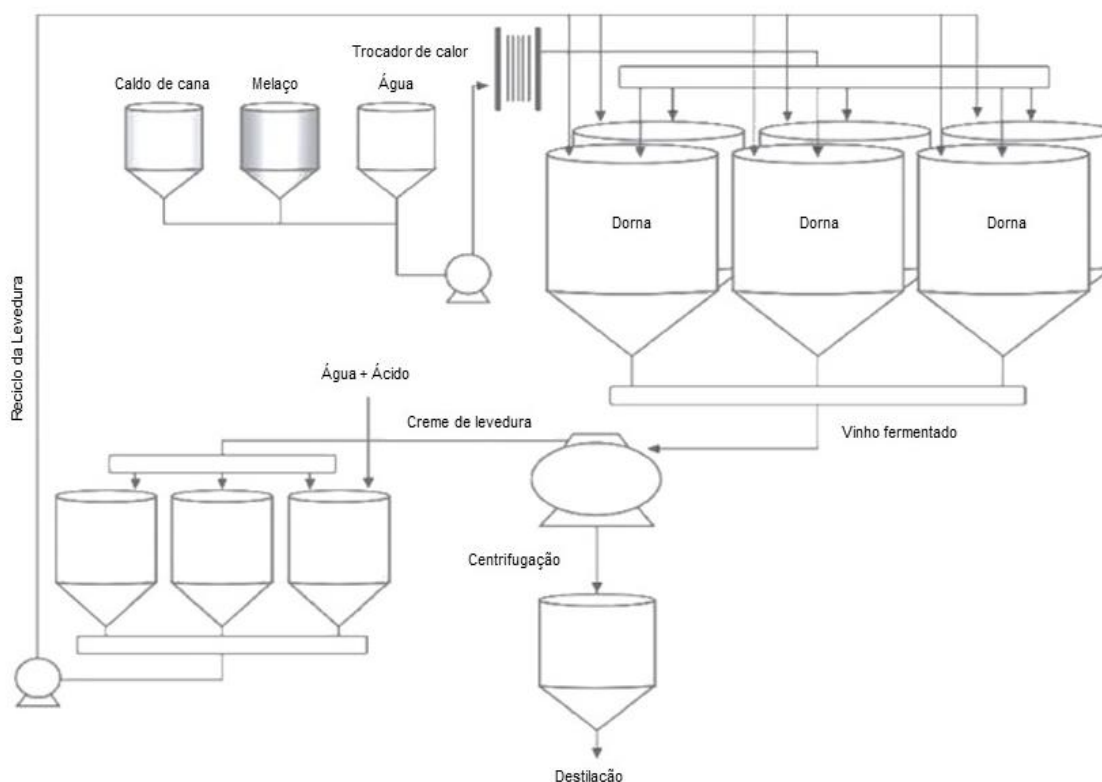
O sistema de batelada alimentada tem grande vantagem de adaptação do micro-organismo ao substrato, obtendo uma maior produção de etanol. As unidades industriais trabalham com leveduras adaptadas ao substrato, portanto, as alimentações das dornas são constantes. Com isso espera-se que o consumo do substrato seja quase total (MARQUES, 2008).

O cultivo em batelada alimentada possui várias vantagens em termos de maximização dos lucros por sua alta produtividade, visto o alto crescimento celular e manutenção de condições que evitam a repressão, permitindo manipular as variáveis de controle como temperatura, pH, e a velocidade de alimentação do substrato (KIM et al., 2001).

Este tipo de operação é interessante por possibilitar a manutenção da velocidade de crescimento em altos valores, já que a alimentação acaba

renovando o meio no fermentador, garantindo certo controle das fontes necessárias ao crescimento (BETLEM et al., 2002).

Figura 2. Esquema representativo do processo fermentativo com reciclo de células.



Fonte: Lopes et al. (2016), modificado

O processo de batelada alimentada apresenta maior eficiência fermentativa, possibilidade de aumento do teor alcoólico e conseqüentemente redução na quantidade de vinhaça produzida, além de apresentar uma maior flexibilidade do processo e menor susceptibilidade às contaminações (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001). Este aumento da eficiência fermentativa está diretamente relacionado à adaptação das células de leveduras ao meio fermentativo, pois como o substrato é adicionado aos poucos no processo fermentativo, há menos açúcar no meio de fermentação fazendo com que as leveduras tenham um menor estresse osmótico. O estresse osmótico das

células de leveduras na fermentação alcoólica ocorre quando as leveduras são expostas às altas concentrações de açúcar (BASSO et al., 2011).

Segundo Lopes et al. (2016), a fermentação em batelada alimentada possui algumas vantagens quando comparada à contínua, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Esquema representativo das características e diferenças entre os processos fermentativo contínuo e batelada alimentada com reciclo de células.

Características	Sistema de fermentação	
	Contínuo	Batelada Alimentada
Rendimento fermentativo (%)	87 - 89,5	88,9 – 90,5
Contaminação bacteriana do mosto (UFC/mL)	3,8 - 9,9 x 10 ⁷	2,0 – 3,9 x 10 ⁷
Ácido sulfúrico (g/L de etanol produzido)	8 – 14 g/L	6 – 7 g/L
Antibióticos (g/L de etanol produzido)	5,7 – 13 g/L	3,8 – 8 g/L
Anti-espumante (g/L de etanol produzido)	0,47 – 0,75 g/L	0,45 – 0,70 g/L

Fonte: Lopes et al. (2016), modificado.

Uma das características do processo industrial brasileiro para produção de etanol é o reciclo celular, ocorrendo em torno de 400 ciclos fermentativos durante a safra, cerca de dois reciclos por dia, sendo que pode variar de uma indústria para outra. Essa situação pode levar as leveduras ao estresse causado pela alta concentração de açúcar, alto teor alcoólico, baixo pH e competição com outros micro-organismos (LALUCE et al., 1991; DORTA et al., 2006). No entanto, as leveduras têm alguns mecanismos em respostas ao estresse (BROWN et al., 2013; REIS et al., 2013), como por exemplo, o acúmulo de trealose e glicogênio (FERREIRA et al., 1999; PAULILO et al., 2003). A trealose atua como um composto de proteção para a célula de levedura, formando uma espécie de membrana a qual favorece a levedura na tolerância à desidratação e altas concentrações de etanol (PANEK et al., 1990; FERREIRA et al., 1999). O glicerol, um dos principais

subprodutos da fermentação etanólica, atua como regulador em choques osmóticos (WALKER, 1998; ALVES, 2000).

Um procedimento comum adotado pelas destilarias brasileiras que empregam o reciclo das células é o uso de ácido sulfúrico, em solução com pH na faixa de 2,0 a 2,5, por um período de cerca de 1-2 horas (BASSO et al., 2008; LOPES et al., 2016). Esse tratamento ácido tem efeito sobre as bactérias, reduzindo a população em cerca de 44,5%, e na sua ausência as fermentações industriais estão sujeitas à perdas de açúcar devido à contaminação bacteriana (GALLO, 1989; LOPES et al., 2016).

4 Contaminação no processo fermentativo

Durante o processo de fermentação alcoólica para a produção de etanol, em uma safra, o fermento sofre inúmeras reciclagens e interferências externas sejam elas oriundas do caldo que compõem o mosto, do próprio ambiente, além de outras fontes, tonando-se vulnerável à contaminação por outros micro-organismos principalmente por leveduras nativas (aquelas que não são colocadas no processo) e bactérias. Por este motivo, é fundamental o constante monitoramento do processo fermentativo, sendo a utilização de meios de crescimento diferenciais e seletivos bastante comuns para este fim (OLIVEIRA; PAGNOCCA, 1988; CECCATO-ANTONINI; SILVA, 2000).

Devido ao alto volume da produção, a fermentação industrial é vulnerável à contaminação bacteriana e por leveduras nativas (AMORIM; OLIVEIRA, 1982; BASSO et al., 2008; LUCENA et al., 2010). Estas leveduras nativas competem com as leveduras industriais adicionadas no processo fermentativo pelo substrato, ocasionando sérias dificuldades operacionais (OLIVEIRA; PAGNOCCA, 1988; BASSO et al., 2008; LOPES et al., 2016). Além das leveduras nativas, as bactérias também competem pelos açúcares e nutrientes presentes no substrato. Esta competição causa muitos problemas para a produção do etanol, tais como a inibição da fermentação, produção de ácidos orgânicos, redução do rendimento fermentativo e a floculação (OLIVA-NETO; YOKOYA, 1997; LOPES et al., 2004).

Outro fator que contribui para a contaminação bacteriana é que os processos fermentativos utilizados no Brasil não ocorrem de forma estéril e a grande quantidade de nutrientes disponíveis no mosto o torna muito propício para a

contaminação bacteriana. A contaminação bacteriana é uma das responsáveis por grandes perdas na eficiência fermentativa. Os prejuízos causados pela contaminação na fermentação alcoólica têm início na lavoura com a matéria-prima. A cana-de-açúcar excessivamente contaminada, além dos problemas de eficiência no tratamento e limpeza do caldo, leva um grande número de bactérias e produtos de seu metabolismo para o processo fermentativo (AMORIM; OLIVEIRA, 1982; KAJI; CANHOS, 1989).

A origem da contaminação microbiológica pode ser proveniente da cana-de-açúcar, bactérias vindas do campo ou mesmo proveniente de equipamentos e utensílios mal higienizados que são utilizados no processo. Os micro-organismos epifíticos (crescem e vivem sobre a superfície vegetal) da bainha da cana são na maioria *Lactobacillus* e *Bacillus*, sendo estes micro-organismos a principal origem da contaminação do caldo de cana (CEBALLOS-SCHIAVONE, 2009). A contaminação no processo também pode ocorrer devido à natureza do processo industrial e a grandes volumes de substrato processado, pois geralmente não há um alto controle das condições assépticas. A contaminação é considerada um fator importante devido à perda de açúcares e traz efeitos prejudiciais no desempenho fermentativo, como baixa produção de etanol, floculação e baixa viabilidade da célula de levedura (SERRA et al., 1979; AMORIM; OLIVEIRA 1982; OLIVA-NETO; YOKOYA, 1994; NARENDRANATH et al., 1997; BAYROCK; INGLEDEW, 2004).

As contaminações bacterianas podem chegar às concentrações de 10^8 - 10^9 células/mL e são muitas vezes caracterizadas pelo acúmulo de subprodutos como ácido láctico e ácido acético. Estes ácidos orgânicos podem inibir o crescimento das leveduras no processo de fermentação (BAYROCK; INGLEDEW, 2004; BURTNER et al., 2009). A maioria dos contaminantes bacterianos durante a fermentação alcoólica é constituída de bactérias produtoras de ácido láctico (GALLO, 1989; LUCENA et al., 2010), provavelmente devido à sua maior tolerância em meio com baixo pH e a tolerância à alta concentração de etanol, quando comparado com outros micro-organismos (KANDLER, 1983; KANDLER; WEISS, 1986; SKINNER; LEATHERS, 2004).

Levantamentos da predominância da microbiota presentes no processo fermentativo mostram que 98,52% das bactérias encontradas e isoladas eram Gram-positivas, sendo o gênero *Lactobacillus* o mais frequente (59,75%) entre eles (GALLO, 1989; LUCENA et al., 2010; CAETANO; MADALENO, 2011). As bactérias

Lactobacillus são tradicionalmente classificadas em dois subgrupos de acordo com as vias metabólicas utilizadas para converter os substratos em produto, as homofermentativas e as heterofermentativa (KANDLER, 1983).

As bactérias homofermentativas produzem ácido láctico e ATP a partir de hexoses, por meio da glicólise, e possuem metabolismo anaeróbio, não fermentando pentoses ou gluconato (CHERUBIN, 2003). As heterofermentativas utilizam outras vias enzimáticas (KANDLER; WEISS, 1986) produzindo ácido láctico, etanol ou acetato, mais CO₂ e ATP, a partir de hexoses (AXELSSON et al., 1993; COGAN; JORDAN, 1994). Com a conversão do acetilfosfato para acetato ao invés de etanol, é produzido um ATP adicional. Em seguida, a regeneração do NAD⁺ excedente é realizada através de um acceptor de elétrons alternativo. Em condições aeróbias, este acceptor alternativo pode ser o oxigênio (CONDON, 1987), mas em condições anaeróbias ou mesmo condições limitadas de oxigênio, a frutose pode ser reduzida a manitol (von WEYMARN et al., 2002). Por isso a frutose se torna um co-substrato fundamental para os *Lactobacillus* heterofermentativos, porém a maioria dos resultados encontrados na literatura sobre os efeitos da contaminação bacteriana na fermentação tem utilizado substratos à base de glicose.

As bactérias *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus vini* têm sido referidas como sendo os principais agentes responsáveis pela agregação de células de levedura, e conseqüentemente a ocorrência de floculação (YOKOYA; OLIVA-NETO, 1991). A bactéria da espécie *L. fermentum* é um bastonete de 0,5 a 0,9 µm de largura, sendo que o comprimento varia bastante, podendo apresentar-se isolado ou aos pares. É Gram-positiva, não esporulada e raramente possui motilidade. As principais características fisiológicas dessas bactérias são: anaeróbias facultativas, heterofermentativas, catalase negativa, temperatura ótima entre 30°C a 40°C e pH na faixa de 5,5 a 5,9 (OLIVEIRA et al., 1995). *L. plantarum* é uma bactéria em forma de bastonete, Gram-positiva e encontrada em silagens e em alguns produtos alimentícios. São bactérias homofermentativas e convertem mais de 80% dos açúcares fermentescíveis à lactato (MCFALL; MONTEVILLE, 1989).

Basso et al. (2014) estudaram os efeitos das bactérias *L. fermentum* (heterofermentativa) e *L. plantarum* (homofermentativa) sobre a fermentação alcoólica conduzida pela linhagem selecionada CAT-1 e verificaram que as linhagens apresentaram um comportamento diferente quanto ao consumo do substrato, sendo que *L. fermentum* consumiu mais rápido os açúcares em

comparação à *L. plantarum*. Pode-se notar também que *L. fermentum* produziu manitol e menos ácido láctico e ácido acético, em relação à *L. plantarum*, a qual produziu apenas ácido láctico, em maior quantidade.

Carvalho-Netto et al. (2015) analisaram a fisiologia molecular da levedura PE-2 em duas condições de fermentação: fermentação típica, quando a maioria das células de levedura está em suspensão; e fermentação com agregados celulares, com as células floculadas. Observaram o perfil de transcrição dessa levedura através de RNA-seq em escala industrial em fermentação descontínua com alimentação. A análise comparativa das duas condições revelou perfis de transcrição diferenciados principalmente por uma repressão gênica profunda nas amostras com agregados. Os dados também indicaram que a bactéria *L. fermentum* era a espécie bacteriana responsável pela co-agregação da levedura e pelos altos níveis de ácidos orgânicos detectados nas amostras.

5 Formas de controle do crescimento bacteriano

O controle da contaminação bacteriana em fermentações alcoólicas nas indústrias sucroenergéticas brasileiras tem sido um dos fatores mais importantes para o aumento da eficiência fermentativa (GODOY et al., 2008). Geralmente as indústrias utilizam antibióticos para o controle da contaminação bacteriana, chegando a utilizar de 3,8 até 13 g/L de antibiótico dependendo do sistema da condução da fermentação (LOPES et al., 2016). Existem metodologias e testes rápidos para identificar os melhores antibióticos a serem utilizados, considerando que os antibióticos reduzem significativamente a contaminação bacteriana nas usinas (AMORIM; OLIVEIRA, 1982; BORGES et al., 2015).

No Brasil os antibióticos mais utilizados são a penicilina, tetraciclina e antibióticos a base de monensina. A penicilina é a mais vantajosa economicamente, devido sua dosagem ser de 500 a 1000 UI/L mosto, sendo esta dosagem menor que a dos demais antibióticos disponíveis para uso em fermentações. A monensina é uma substância monitorada em países europeus importadores de levedura seca quanto ao seu residual no produto final. Ambos agem em bactérias Gram-positivas, sendo a monensina considerada a mais eficiente (BREGAGNOLI, 2006; MORAES et al., 2006).

A oxitetraciclina atua em bactérias Gram-negativas e positivas. O mecanismo de ação das tetraciclinas está em bloquear o receptor no ribossomo que se liga aos t-RNA na transcrição genética, conferindo capacidade de inibir a síntese proteica e posterior inibição da replicação das bactérias (SILVA, 2010). O uso indiscriminado e contínuo dos antibióticos convencionais durante os processos fermentativos nas indústrias de álcool provoca seletividade nas cepas de bactérias presentes nestes processos. Com isso, as bactérias selecionadas tornam-se menos sensíveis à ação dos antibióticos (CINELLI, 2012).

Além desses, outros tipos de antibióticos são também utilizados, como por exemplo o Kamoran®, o qual age seletivamente como bactericida e bacteriostático. Este é obtido através da fermentação de *Streptomyces cinnamonensis* que produz o princípio ativo monensina sódica cristalina. Quando o antibiótico Kamoran WP foi lançado, a indicação de dosagem era de 1 a 3 ppm, porém já houve alteração em sua dosagem para 4 ppm, indicando o aumento da resistência das bactérias ao antibiótico (QUIMICA REAL, 2009; SILVA, 2010).

A partir de 2007, foram introduzidos novos agentes antimicrobianos para o controle da contaminação bacteriana em função da pressão para reduzir o uso de antibióticos devido ao efeito residual na biomassa de leveduras, pois não é permitida a utilização de leveduras que contenham resíduos de antibióticos para a produção de ração animal ou para a alimentação humana (MENEZHIN et al., 2008; LOPES et al., 2016).

Dióxido de cloro e ácidos derivados do lúpulo (fração alfa e beta) são alguns desses novos antimicrobianos utilizados como alternativas para o controle da contaminação bacteriana ao invés de antibióticos (GODOY et al., 2008; LOPES et al., 2016). Um dos biocidas bastante estudados e utilizados são os biocidas a base do lúpulo. As flores femininas do lúpulo apresentam uma estrutura morfológica denominada “cone de lúpulo”, cujas pétalas contêm glândulas de lupulina, que é constituída por uma resina rica em ácidos alfa e beta (RUCKLE; SENN, 2006). Esta lupulina contém óleos essenciais (0,2 – 3%), ácidos beta ou lupulonas (1,5 – 9,5%) e ácidos alfa ou humulonas (2,0 – 16%) que variam em suas proporções nas diferentes variedades da planta. Estes ácidos presentes interferem no transporte de metabólitos na membrana celular e modificam o pH intracelular, o que provoca a morte das bactérias por meio de insuficiência nutricional (SILVA; FARIA, 2008). Para obtenção do efeito bacteriostático, a dosagem do extrato de lúpulo deve manter a

concentração mínima do princípio ativo entre 3 a 5 mg/L. Nessa faixa de dosagem, não há alteração no crescimento e metabolismo de *S. cerevisiae* (OLIVEIRA et al., 1996). Os biocidas a base de lúpulo atuam principalmente sobre as bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus*, limitando seus metabolismos e melhorando as condições fermentativas para as leveduras. Isso proporciona melhores condições para o crescimento das leveduras que irão fermentar mais rapidamente o mosto e com maior produção de álcool (RUCKLE; SENN, 2006).

O dióxido de cloro tem sido utilizado como agente sanitizante com atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e negativas (ZHU et al., 2013). A utilização desse composto em concentrações variando de 10 a 125 ppm foram suficientes para o controle do crescimento de bactérias comumente encontradas na fermentação alcoólica, com efeito similar ao Kamoran® na concentração de 3 ppm (MENECHIN et al., 2008). O uso de dióxido de cloro é hoje uma realidade nas destilarias brasileiras, sendo que o seu emprego diminuiu em até 30% o uso de ácido sulfúrico, um decréscimo de cerca de sete vezes no custo com insumos por metro cúbico de álcool produzido em comparação com os métodos convencionais, e a partir do quinto ciclo de fermentação, houve um aumento de 5% no rendimento do processo (P&S, 2016).

Uma modificação no tratamento ácido foi proposta por Ceballos-Schiavone (2009) incorporando etanol à cuba para o controle da contaminação bacteriana. Testando diferentes valores de pH (2,5 e 6,0) e concentrações de etanol (15, 20, 25, 30 e 35%), verificou-se que as bactérias *Lactobacillus* se mostraram sensíveis às concentrações superiores a 20% (v/v) de etanol, não sendo observados efeitos negativos sobre as células de leveduras quando utilizadas as concentrações de 20 a 25% (v/v).

Ainda nessa direção, Bassi et al. (2013) avaliaram o efeito da adição de 13% de etanol à solução de ácido sulfúrico (pH 2,0) para o controle do crescimento de *Dekkera bruxellensis*, uma importante levedura contaminante do processo fermentativo, e verificaram que ocorreu a inibição do crescimento de *D. bruxellensis* sem significativo efeito sobre a linhagem *S. cerevisiae* do processo. Houve uma redução na produção de etanol, no entanto, o tratamento proposto teve um efeito seletivo sobre as leveduras contaminante e do processo, o que torna essa estratégia interessante para ser estudada mais profundamente. Os autores ainda destacam que a ação sobre bactérias contaminantes deve ser também avaliada.

LITERATURA CITADA

- ALVES, D. M. G. **Respostas fisiológicas de duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* frente ao potássio durante a fermentação alcoólica.** 2000. 118 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Rio Claro: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita”, 2000.
- AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J. Infecção na fermentação: como evitá-la. **Açúcar Álcool**, v. 5, p. 12–18, 1982.
- AMORIM, H, V. **Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia.** Piracicaba: FERMENTEC, 2005, 434 p.
- ANDRIETTA, M. G. S; ANDRIETTA, S. R; STUPIELLO, E. N. A. Bioethanol – what has Brazil learned about yeasts inhabiting the ethanol production processes from sugar cane?. In: BERNARDES, M. A. S. (Ed.) **Biofuel production - recent developments and prospects.** InTech, p.67-85, 2011.
- AXELSSON, L.; HOLCK, A.; BIRKELAND, S. E.; AUKRUST, T.; BLOM, H. Cloning and nucleotide-sequence of a gene from *Lactobacillus sake* lb706 necessary for sakacin-a production and immunity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 2868–2875, 1993.

- BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v. 14, p. 89-105, 2008.
- BAPTISTA, C. M. S. G.; CÓIAS J. M. A.; OLIVEIRA, A. C. M.; OLIVEIRA, N. M. C.; ROCHA, J. M. S.; DEMPSEY, M. J.; LANNIGAN, K. C.; BENSON, P. S. Natural immobilization of microorganisms for continuous ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 40, p. 127–131, 2006.
- BASSI, A. P. G.; SILVA, J. C. G.; REIS, V. R.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Effects of single and combined cell treatments based on low pH and high concentrations of ethanol on the growth and fermentation of *Dekkera bruxellensis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 1661-1676, 2013.
- BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research.**, v. 8, n. 7, p. 1155–1163, 2008.
- BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: BERNARDES, M. A. S. (Ed.) **Biofuel production - recent developments and prospects**. InTech, Disponível: <<http://www.intechopen.com/books/biofuel-production-recent-developments-and-prospects/bioethanol-what-has-brazil-learned-about-yeasts-inhabiting-the-ethanolproduction-rocesses-from-sug>>, p. 85-100, 2011.
- 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.

- BAYROCK D. P; INGLEDEW W. M. Inhibition of yeast by lactic acid bacteria in continuous culture: nutrient depletion and or acid toxicity?. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 362–368, 2004.
- BETLEM, B. H. L; MULDER, P; ROFFEL, B. Optimal mode of operation for biomass production. **Chemical Engineering Science**, v. 57, n. 14, p. 2799-2809, 2002.
- BORGES, E. P.; LOPES, M. L.; BERNARDINO, C.; AMORIM, H. V. The benefits of applied research: 37 years of discoveries, adaptations and solutions. **Sugar Industry**, v. 4, p. 209–216, 2015.
- BREGAGNOLI, F. C. R. **Comportamento fisiológico de microrganismos submetidos a biocidas convencional e natural na produção de cachaça orgânica**. 2006. 80 f. Tese (Doutorado em microbiologia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.
- BROWN, N. A.; CASTRO, P. A.; CASTRO, P. F. B.; SAVOLDI, M.; BUCKERIDGE, M. S.; LOPES M. L.; de LIMA. P. S. C.; BORGES, E. P.; AMORIM, H. V.; GOLDMAN, M. H. BONATTO, D.; MALAVAZI, I.; GOLDMAN. G. H. Transcriptional profiling of Brazilian *Saccharomyces cerevisiae* strains selected for semi-continuous fermentation of sugarcane must. **FEMS Yeast Research**, v. 13, n. 3, p. 277-290, 2013.
- BURTNER, C.; MURAKAMI, C. J.; KENNEDY, B. K.; KAEBERLEIN, M. A. A molecular mechanism of chronological aging in yeast. **Cell Cycle**, v. 8, p. 1256-1270, 2009.
- CAETANO, A. C. G.; MADALENO, L. L. Controle de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica com a aplicação de biocidas naturais. **Ciência & Tecnologia: FATEC-JB**, v. 2, n. 1, p. 27-37, 2011.
- CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação descontínua. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E; BORZANI, W. **Biotechnologia industrial – engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, v. 2, p. 193-204, 2001.

- CARVALHO-NETTO, O. V.; CARAZZOLLE, M. F.; MOFATTO, L. S.; TEIXEIRA, P. J. P. L.; NORONHA, M. F.; CALDERÓN, L. A. L.; MIECZKOWSKI, P. A.; ARGUESO, J. L.; PEREIRA, G. A. G. *Saccharomyces cerevisiae* transcription reprogramming due to bacterial contamination during industrial scale bioethanol production. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 13, p. 1-13, 2015.
- CEBALLOS-SCHIAVONE, C. H. M. **Tratamento térmico do caldo de cana-de-açúcar visando a redução de contaminantes bacterianos - *Lactobacillus* na produção de etanol e eficiência de tratamento do fermento por etanol**. 2009. 177 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, Brasil, 2009.
- CECCATO-ANTONINI, S. R. **Microbiologia da fermentação alcoólica: a importância do monitoramento microbiológico**. 1. ed. São Carlos: EDUFSCar, 2010, 105 p.
- CECCATO-ANTONINI, S. R.; SILVA, D. F. Eficiência de meios diferenciais no isolamento de cepas de leveduras de processos industriais de fermentação alcoólica. **STAB**, v. 18, p. 40-46, 2000.
- CHERUBIN, R. A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 2003. 137 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- CINELLI, B. A. **Produção de etanol a partir da fermentação simultânea à hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial**. 2012. 68 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.
- COGAN, T, M.; JORDAN, K. N. Metabolism of *Leuconostoc* bacteria. **Journal of Dairy Science**. v. 77, p. 2704–2717, 1994.
- CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento: acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar safra 2014/15**. v. 1, n. 4, p. 1-29, Brasília, 2016. Disponível em:

http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_04_13_08_45_51_boletim_cana_portugues_-_4o_lev_-_14-15.pdf. Acesso em: 01 de julho de 2016.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento: acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar safra 2016/17**. v. 3, n. 3, p. 1-70, Brasília, 2017.

Disponível em:

<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_12_27_16_30_01_boletim_cana_portugues_-3o_lev_-_16-17.pdf> Acesso em: 10/02/2017.

CONDON, S. Responses of lactic-acid bacteria to oxygen. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 46, p. 269–280, 1987.

DELLA-BIANCA, B. E.; BASSO, T. O; STAMBUK, B. U.; BASSO, L. C; GOMBERT, A. K. What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 3, p. 979–991, 2013.

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

FERREIRA L. V.; AMORIM H. V.; BASSO, L. C. Fermentação de trealose e glicogênio endógenos em *Saccharomyces cerevisiae*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 1, 1999.

FERRI, A.; COSTA, M. A. S.; BATISTOTE, M.; NAKA, M. H. Análise do perfil de produção de etanol em usinas localizadas na região da Grande Dourados – MS. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, p. 251-268, 2014.

FIGLIOLINO, A. **Panorama do setor de açúcar e álcool**. Texto apresentado na Câmara Setorial de Açúcar e Álcool do Ministério da Cultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília: Mapa, 2012.

GALLO, C. R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica**. 1989. 388 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos)

– Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 1989.

GALLO, C. R.; CANHOS, V. P. Efeito do tratamento ácido no fermento sobre a microbiota bacteriana contaminante da fermentação alcoólica. **STAB**, v. 9, n. 6, p. 35-37, 1991.

GODOY, A.; AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, A. J. Continuous and batch fermentation processes: advantages and disadvantages of these processes in the Brazilian ethanol production. **International Sugar Journal.**, v. 110, p. 175–181, 2008.

GUIDINI, C. Z. **Fermentação alcoólica em batelada alimentada empregando *Saccharomyces cerevisiae* de características floculantes.** 2013. 127 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

HIRA, A.; OLIVEIRA, L. G. No substitute for oil? How Brazil developed its ethanol industry. **Energy Policy**, v. 37, n. 6, p. 2450–2456, 2009.

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

KANDLER, O. Carbohydrate-metabolism in lactic-acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 209–224, 1983.

KANDLER, O.; WEISS, N. Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212AL. In: SNEATH, N. S.; MAIR, M. E.; SHARPE, J. G.; HOLT, J. G. (Eds). **Bergey's manual of systematic bacteriology.** Vol. 2, Baltimore: Williams and Wilkins, p. 1209 – 1234, 1986.

KIM, I. C; KIM, C. H; HONG, S. I; KIM, S. W. Fed-batch cultivation for the production of clavulanic acid by an immobilized *Streptomyces clavuligerus* mutant. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 9, p. 869-872, 2001.

- LALUCE, C.; PALMIERI, M. C.; CRUZ, R. C. L. Growth and fermentation characteristics of new selected strains of *Saccharomyces* at high temperatures and high cell densities. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 37, n. 6, p. 528-536, 1991.
- LEE, J.; LEE, S. Y.; PARK, S.; MIDDELBERG, A. P. J. Control of fed-batch fermentations. **Biotechnology Advances**. v. 17, n. 1, p. 29-48, 1999.
- LIMA, E. E.; SILVA, F. L. H.; OLIVEIRA, L. S. C.; SILVA, A. S.; NETO, J. M. S. Produção de etanol de segunda geração proveniente do bagaço de pendúculos do caju. **Revista Caatinga**, v. 28, n. 2, p. 26-35, 2015.
- LIMA, U. A., BASSO, L. C., AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Ed.). **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**, v.3, São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2001.
- LOPES, M. L.; AMORIM, H. V.; GODOY, A.; OLIVEIRA, A. J.; CHERUBIN, R. A.; BASSO, L. C. **Interaction between yeast and acetic acid bacteria in industrial fermentation for ethanol production: a case study**. In: 11th International Congress on Yeasts., vol. 1, 2004.
- LOPES, M. L.; PAULILLO, S. C. L.; GODOY, A.; CHERUBIN, R. A.; LORENZI, M. S.; GIOMETTI, F. H. C.; BERNARDINO, C. D.; NETO, H. B. A.; AMORIM, H. V. Ethanol production in Brazil: a bridge between Science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 47, n. 1, p. 64-76, 2016.
- LUCENA, B. T. L; dos SANTOS, B. M; MOREIRA, J. L. S; MOREIRA, A. P. B; NUNES A. C; AZEVEDO, V; MIYOSHI, A; THOMPSON, F. L; MORAIS, M. A. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. **BMC Microbiology**, v. 10, p. 298–306, 2010.
- MARQUES, A. S. **Estudo da influência da complementação de nutrientes no mosto sobre o processo de fermentação alcoólica em batelada**. 2008. 95 f.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2008.

- MARTINS, V. A.; OLIVETTE, M. P. **Cana-de-açúcar: safra 2013/2014 e fatores climáticos: panorama dos impactos na produtividade nos escritórios de desenvolvimento rural (EDRs) no estado de São Paulo**. Boletim Indicadores do Agronegócio, Instituto de Economia Agrícola (IEA), v. 10, n. 3, mar. 2015.
- McFALL, S. M.; MONTVILLE, P. E. pH mediated regulation of piruvate catabolism in *Lactobacillus plantarum* chemostat cultures. **Indian Journal of Microbiology**, v. 4, n. 5, p. 335-340, 1989.
- MENEGHIN, S. P.; REIS, F. C.; ALMEIDA, P. G.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Chlorine dioxide against bacteria and yeasts from the alcoholic fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 337–343, 2008.
- MISSAWA, S. K. **Modificação de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* para o aumento da produtividade de álcool e floculação condicional**. 2009. 150 f. Tese (Doutorado em genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.
- MORAES, J. A. S., BERCHIELLI, T. T., REIS, R. A. Aditivos. In: BERCHIELLI, T. T., PIRES, A.V., OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2006, p. 539-561.
- NARENDRANATH, N. V.; HYNES, S. H.; THOMAS K. C.; INGLEDEW, W. M. Effects of *Lactobacilli* on yeast-catalyzed ethanol fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 63, n. 11, p. 4158–4163, 1997.
- NASCIMENTO, D. Crise nas usinas chega à Justiça. **Revista RPA News**, n. 164, p. 6-13, 2014.
- NASTARI, P. **Avaliação e perspectivas do setor sucroenergético**. Texto apresentado na Câmara Setorial de Açúcar e Alcool do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília: Mapa, 2014.

- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2014, 456 p.
- NEVES, M. F. **Caminhos da cana**. Sertãozinho: Canaoeste, 2014, 56 p.
- OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Evaluation of bacterial contamination in a fed-batch fermentation process. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 697–699, 1994.
- OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Effects of nutritional factors on growth of *Lactobacillus fermentum* mixed with *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation. **Revista de Microbiologia**, v. 28, n. 1, p. 25–31, 1997.
- OLIVEIRA, A. J.; GALLO, C. R.; ALCARDE, V. E. Efeito da temperatura e pH na germinação de esporos de bactérias em processos de fermentação alcoólica. **Álcool e Açúcar**, v. 15, n. 80, p. 32-35, 1995.
- OLIVEIRA, A. J.; GALLO, C. R.; ALCARDE, V. E.; GODOY, A; AMORIM, H. V. **Métodos para o controle microbiológico na produção de açúcar e álcool**. Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ/ESALQ, 1996.
- OLIVEIRA, M. C. F. L.; PAGNOCCA, F. C. **Aplicabilidade de meios seletivos empregados na indústria cervejeira para detecção de leveduras selvagens em unidades sucroalcooleiras**. In: Simpósio Nacional de Fermentação, VIII. São Lourenço: Sinaferm. p. 78–81, 1988.
- P&S. **Substituto de antibióticos, produto da BioE Integrated Solutions faz usinas sucroalcooleiras reduzirem custos e danos ao meio ambiente**. 2016. Disponível em: <<http://www.ps.com.br/noticia/substituto-de-antibioticos-produto-da-bioe-integrated-solutions-faz-usinas-sucroalcooleiras-reduzirem-custos-e-danos-ao-meio-ambiente>> Acesso em: 10/03/2017
- PANEK, A. C.; MANSURE, J. J. A.; PASCHOALIN, M. F.; PANEK, A. D. Regulation of trehalose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* mutants during temperatures shifts. **Biochimie**, v. 72, n. 1, p. 77-79, 1990.

- PAULILLO, S. C. L.; YOKOYA, F.; BASSO, L. C. Mobilization of endogenous glycogen and trehalose of industrial yeasts. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 3, 2003.
- PORTO, L. M. **Modelagem de processo industrial de fermentação alcoólica contínua com reatores de mistura ligados em série**. 2005. 122 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
- QUÍMICA REAL: **Manual Kamoran no controle bacteriano em fermentações alcoólicas que sangram e secam levedura seca**. Belo Horizonte: Kamoran News, v. 1, n. 1, mar. 2009.
- RAMOS, P. Financiamentos subsidiados e dívidas de usineiros no Brasil: uma história secular e atual? **Revista História Econômica & História de Empresas**, v. 14, n. 2, p. 7-32, 2012.
- REIS, V. R.; BASSI, A. P. G.; SILVA, J. C. G ; CECCATO-ANTONINI, S. R. Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts exhibiting rough colonies and pseudohyphal morphology with respect to alcoholic fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1121-1131, 2013.
- ROMÃO, B. B. **Produção de etanol por hidrólise ácida de melão de soja**. 2011. 93 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.
- RUCKLE, L., SENN, T. Hop acids as natural antibacterials can efficiently replace antibiotics in ethanol production. **Betatec Hop Products**, v. 7, n. 9, 2006.
- SANTOS, G. R.; GARCIA, E. A.; SHIKIDA, P. F. A.; JUNIOR, D. J. R. A Agroindústria canvieira e a produção de etanol no Brasil: características, potenciais e perfil da crise atual. In: Santos, G. R. (Ed.). **Quarenta anos de etanol em larga escala no Brasil: desafios, crise e perspectivas**. Brasília: Ipea, 2016, 315 p.
- SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. Biorreatores e processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Ed.).

Biotecnologia industrial. 1 ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., v. 2, p. 179-192, 2001.

SERRA, G. E.; CEREDA, M. P.; FERES, R. J.; BERTOZO, M. T.; VICENTE, A. T.;
Contaminação da fermentação alcoólica: “floculação do fermento”. **Brasil Açucareiro**, v. 93, n. 1, p. 26–31, 1979.

SILVA, G. K. C. **Avaliação da ação de diferentes antibióticos sobre o crescimento de microrganismos contaminantes do processo fermentativo para obtenção do etanol**. 2010. 93 f. Trabalho de Conclusão Curso (Graduação do curso de Tecnologia em Biocombustíveis). Faculdade de Tecnologia, Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, Araçatuba, 2010.

SILVA, P. H. A.; FARIA, F. C. Avaliação da intensidade de amargor e do seu princípio ativo em cervejas de diferentes características e marcas comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 902-906, 2008.

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

TOSETTO, G. M. **Influência da matéria-prima no comportamento cinético de levedura na produção de etanol**. 2002. 147 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

ÚNICA. **União da indústria de cana de açúcar: mistura no combustível**, 2015.
Disponível em:
<<http://www.unica.com.br/convidados/27470993920324775593/mistura-no-combustivel/>> Acesso em: 10/03/17

von WEYMARN, N.; HUJANEN, M.; LEISOLA, M. Production of D-mannitol by hetero-fermentative lactic acid bacteria. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1207–1213, 2002.

WALKER, G. M. **Yeast physiology and biotechnology**. Chichester: John Wiley & Sons, 1998, 560 p.

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

ZHU, C., CHEN, Z.; YU, G. Fungicidal mechanism of chlorine dioxide on *Saccharomyces cerevisiae*. **Annals of Microbiology**, v. 63, p. 495-502. 2013.

CAPÍTULO 1. Efeito do sistema de fermentação sobre a contaminação por *Lactobacillus sp* no processo de fermentação alcoólica com reciclo celular

1 Resumo

Na produção de etanol combustível, a fermentação é uma das etapas mais críticas. O sistema de fermentação utilizado, batelada (simples ou alimentada) ou contínuo, a linhagem selecionada empregada e a contaminação por bactérias e leveduras nativas afetam a eficiência fermentativa. As bactérias contaminantes que são mais encontradas na fermentação alcoólica industrial são na maioria *Lactobacillus*, sendo que as maiores ocorrências são de *L. fermentum* e *L. plantarum*. O presente estudo visou avaliar o efeito do sistema de fermentação – batelada simples ou batelada alimentada – sobre a fermentação conduzida pela levedura industrial selecionada *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e contaminada com as bactérias *L. fermentum* e *L. plantarum*. Foram realizados seis ciclos fermentativos de 9 horas em caldo de cana 16° Brix, pH 4,5, a 30°C, com reciclo celular. Análises de pH, álcool, açúcar redutor total, número de leveduras e bactérias e cálculo de eficiência fermentativa foram realizados para avaliar o efeito do sistema de fermentação e da contaminação bacteriana sobre a fermentação. O sistema de fermentação – batelada simples ou batelada alimentada – afetou os parâmetros fermentativos nas fermentações contaminadas com as bactérias *Lactobacillus*. Em

sistema de batelada alimentada, verificou-se maior produção de etanol, maior eficiência fermentativa e maior variação logarítmica de crescimento da levedura. A bactéria *L. fermentum* foi mais prejudicial à fermentação do que *L. plantarum*, resultando em maior sobra de açúcar no meio fermentado e menor eficiência fermentativa, nos dois sistemas. O efeito das contaminações no sistema de batelada simples foi maior do que no sistema de batelada com alimentação especialmente pelo fato de a alimentação permitir um maior desenvolvimento da levedura, que pode assim competir em melhor condição com a bactéria contaminante.

2 Introdução

O setor sucroenergético é um dos principais setores do agronegócio brasileiro, contribuindo diretamente para o PIB nacional. Atualmente o setor vem sofrendo uma grande expansão no Brasil, devido à demanda pelo etanol combustível. Com isso empresas e órgãos ligados ao setor vem intensificando cada vez mais os estudos que visam otimizar e reduzir perdas no processo de produção de etanol. No Brasil, o etanol combustível é produzido a partir da fermentação de açúcares pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a qual realiza a conversão do substrato em etanol (BASSO et al., 2008; DELLA-BIANCA et al., 2013). Este micro-organismo é capaz de resistir a condições de estresse e apresenta alta eficiência fermentativa, crescimento rápido, uso eficaz do açúcar, alta capacidade de produzir etanol, os quais são fatores fundamentais para a produção em escala industrial. Atualmente o setor utiliza leveduras isoladas do próprio processo fermentativo, conhecidas como leveduras selecionadas ou personalizadas. Dentre elas, as linhagens PE-2 e CAT-1 são responsáveis pela maior parte do etanol produzido no Brasil (ANDRIETTA et al., 2007).

No Brasil, a fermentação pode ocorrer por dois tipos distintos de processo fermentativo, o processo contínuo e o processo em batelada, sendo que no processo de batelada há dois subgrupos, o processo de batelada simples e o processo de batelada alimentada. Basicamente, o que difere um do outro é que no sistema de batelada alimentada são realizadas alimentações dosadas do substrato em intervalos de tempo, enquanto no sistema de batelada simples o substrato é adicionado nas dornas já com o volume final. Uma das vantagens de se realizar o

sistema de batelada alimentada é a alta produtividade, alto crescimento celular e um menor índice de contaminação (ANDRIETTA et al., 2011).

A fermentação é uma das etapas mais críticas do processo de produção de etanol, pelo fato de o agente ser biológico (micro-organismo) e também pela facilidade que se tem de contaminação bacteriana no processo. Essa contaminação é uma das responsáveis por ocasionar grandes perdas na produção do etanol, além do fato de reduzir a eficiência fermentativa, pois as bactérias presentes no caldo acabam utilizando os açúcares presentes no mosto para produzir outros compostos que não são de interesse da indústria sucroenergética. As bactérias contaminantes que são mais encontradas na fermentação alcoólica industrial são na maioria *Lactobacillus* e *Bacillus*, e podem ser provenientes de vários lugares, como por exemplo, equipamentos e utensílios mal higienizados que são utilizados no processo e do próprio campo. A contaminação no processo também pode ser devido à natureza do processo industrial, pois se trata de um grande volume de substrato processado, causando certa dificuldade no controle da higienização do processo fermentativo (CEBALLOS-SCHIAVONE, 2009).

O gênero mais abundante no processo é de fato o *Lactobacillus*, sendo tradicionalmente classificado em dois sub-grupos de acordo com as vias metabólicas utilizadas para converter os substratos em produto, as homofermentativas e as heterofermentativas, representadas por *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus fermentum*, respectivamente (BASSO et al., 2014). Portanto, pesquisas que visam uma melhor compreensão dos efeitos provocados pela contaminação das bactérias *L. fermentum* e *L. plantarum* no processo de fermentação alcoólica são muito importantes. Com isso o trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos da contaminação bacteriana com as bactérias *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus fermentum*, nos sistemas de batelada simples e batelada alimentada conduzida pela levedura industrial PE-2.

3 Material e Métodos

3.1 Micro-organismos

As linhagens de bactérias utilizadas neste trabalho foram *L. fermentum* CCT5852 (ATCC19255) e *L. plantarum* CCT0580 (ATCC8014). Foi utilizada a

linhagem de levedura industrial selecionada *S. cerevisiae* PE-2 como levedura do processo fermentativo. Todas as culturas microbianas pertencem ao banco de culturas do LAMAM (Laboratório de Microbiologia Aplicada e Molecular) /CCA/UFSCar-Campus de Araras.

As bactérias estão sendo mantidas em meio MRS (10 g/L peptona, 8 g/L extrato de carne, 4 g/L extrato de levedura, 20 g/L glicose, 1 g/L Tween, 2 g/L fosfato de potássio, 3 g/L acetato de sódio anidro, 2 g/L citrato de amônia dibásico, 0,2 g/L sulfato de magnésio, 0,05 g/L sulfato de manganês, em água destilada; Himedia®) e a levedura em meio YPD (10 g/L extrato de levedura, 20 g/L glicose, 20 g/L peptona e 20 g/L Agar, em água destilada), a 4°C.

3.2 Preparação dos inóculos bacterianos e de leveduras

Para o preparo do inóculo da levedura, foram transferidas duas alçadas de leveduras recém-crescidas em placas de Petri no meio sólido YPD, para dez frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL do meio de crescimento (YPD líquido). Os frascos foram mantidos durante 24 horas a 30°C, a 160 rpm, sendo em seguida o meio centrifugado a 3400 rpm por 6 minutos. O sobrenadante foi descartado, a massa celular obtida ressuspensa e inoculada em caldo de cana na concentração de 4°Brix, pH 5,5 por um período de 24 horas a 30°C, a 160 rpm em cinco Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de caldo 4°Brix, até a obtenção de cerca de 2×10^9 células/mL. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer utilizando-se a solução do corante azul de metileno-citrato de sódio para contagem de células viáveis (LEE et al., 1981).

Para o preparo do inóculo das bactérias, foram transferidas duas alçadas da cultura da bactéria para um tubo Falcon contendo 30 mL de MRS líquido. O tubo foi mantido a 35°C por 24 horas. Em seguida, transferiu-se 1 mL da suspensão da bactéria para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio MRS líquido, sendo os frascos mantidos durante 24 horas a 35°C. A seguir, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 8000 rpm, por 10 minutos, a 4°C, em centrífuga refrigerada Eppendorf®, e a massa celular transferida para frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de caldo de cana 4°Brix, até a obtenção de cerca de 2×10^8 UFC/mL. A padronização do número de bactérias foi feita após leitura da absorbância (a 540 nm) em espectrofotômetro ThermoBiomate®, com base em uma

curva-padrão “Absorbância X número de UFC/mL”, de forma que um valor de absorbância (a 540 nm) de aproximadamente 0,5 era equivalente a aproximadamente 2×10^8 UFC/mL.

As suspensões de células da levedura e das bactérias foram padronizadas para a contagem desejada e ressuspendidas em meio de fermentação (caldo de cana 16°Brix, pH 5,5, adicionado de 1 mL/L de solução de sais). A solução de sais adicionada ao meio de fermentação consistiu de 50 g/L de sulfato de amônio, 20 g/L de fosfato monobásico de potássio, 10 g/L de sulfato de magnésio, 1 g/L de sulfato de zinco e 1 g/L de sulfato de manganês, dissolvidos em água destilada. Essa solução foi esterilizada em autoclave a 120°C, 1 atm, 15 minutos e a seguir armazenada a 4°C.

O caldo de cana utilizado para o preparo dos meios foi obtido na Usina São João, safra 2016/2017, e armazenado em garrafas plásticas em temperatura de freezer (-10°C) até o momento do uso. Os meios de caldo de cana foram esterilizados em autoclave, a 120°C por 15 minutos, 1 atm.

3.3 Processo fermentativo

O processo de fermentação foi realizado tanto em batelada simples quanto em batelada alimentada. No processo de batelada alimentada, o volume inicial foi de 25 mL do meio de fermentação, em Erlenmeyers de 500 mL, inoculado com 20 mL da suspensão das células microbianas (10 mL de levedura + 10 mL de bactéria, para as fermentações em co-culturas) para uma concentração final de cerca de 1×10^8 UFC/mL de leveduras e 1×10^7 UFC/mL de bactérias. Foram realizadas 5 alimentações de 31 mL cada (mosto concentração de 16°Brix, pH 4,5), em intervalos de 90 minutos. Após 7 horas e 30 minutos de fermentação, o volume de 200 mL foi completado e a fermentação prosseguiu por mais 1 hora e 30 minutos para a finalização do teste fermentativo (9 horas de fermentação). Os frascos foram mantidos em estufa sem agitação, a 30°C. Para as alimentações foram utilizados tubos falcon estéreis de 50 mL.

Após o término do período de fermentação, foi retirada uma amostra para análise microbiológica, sendo o restante centrifugado a 8000 rpm, por 10 minutos, a 5°C, em centrífuga refrigerada Eppendorf®. O sobrenadante foi armazenado a -10°C para análises, as células foram inoculadas novamente em novo meio de

fermentação e o procedimento foi repetido nos próximos ciclos. Foram realizados 6 ciclos de fermentação de 9 horas.

O processo de fermentação em batelada simples foi realizado da mesma forma que na batelada alimentada, com a diferença que as células microbianas foram adicionadas à um volume de 200 mL do meio de fermentação, e não houve as etapas de alimentações. Os experimentos foram realizados a 30°C por um período de 9 horas de fermentação, sendo realizados também 6 ciclos fermentativos.

Foram realizadas três fermentações em cada sistema, em triplicata, sendo:

- PE-2
- PE-2 + *L. fermentum*
- PE-2 + *L. plantarum*

3.4 Análises

Foi retirado 1 mL de amostra do meio de fermentação no início do ciclo 1 (inicial) e ao final dos ciclos 3 e 6, após 9 horas de fermentação, para as análises microbiológicas. Em seguida, ao final de cada ciclo fermentativo, as células foram retiradas do meio de fermentação por centrifugação, a 8000 rpm por 10 minutos, a 4°C, em centrífuga Eppendorf®, e o sobrenadante foi armazenado em tubos Falcon, a -10°C para as análises físico-químicas.

3.4.1 Análises microbiológicas

Para contagem das leveduras, foi realizada uma diluição seriada e em seguida foi realizado o plaqueamento em placas de Petri contendo meio YPD com adição de cloranfenicol (concentração final de 50 mg/mL) e tetraciclina (concentração final de 50 mg/mL). Em seguida as placas foram incubadas e mantidas a 30°C por 3 dias, para contagem de UFC/mL. Foram plaqueadas 3 diluições (10^{-7} , 10^{-6} e 10^{-5}), em duplicata, para cada uma das repetições das fermentações.

Das fermentações onde houve inoculação das bactérias, a amostra retirada foi diluída em série e em seguida foi realizado o plaqueamento em placas de Petri contendo meio MRS com adição de actidione (concentração final de 5 mg/L). Em seguida, as placas foram incubadas e mantidas a 35°C por 3 dias, para contagem de

UFC/mL. Foram plaqueadas 3 diluições (10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3}), em duplicata, para cada uma das repetições das fermentações.

O número inicial de UFC/mL de bactérias e levedura no sistema de batelada alimentada foi corrigido em função do volume inicial do meio de fermentação (45 mL), dividindo o valor obtido após a contagem por 4,4 (relação do volume final/volume inicial do meio de fermentação, ou seja, $200/45$), para fins de comparação com os valores obtidos no sistema de batelada simples, onde o volume inicial de fermentação foi 200 mL.

3.4.2 Análises físico-químicas

Após a centrifugação do meio fermentado e separação das células microbianas para o reciclo celular, o sobrenadante foi analisado quanto ao pH, utilizando pH-metro digital MS Tecnopon mPA210; etanol (em g/100 mL), por meio da destilação de 10 mL das amostras em microdestilador Tecnal TE-012 e determinação da densidade da solução hidroalcoólica em densímetro digital Anton-Paar®, conforme Amorim (1997); e açúcar redutor total (ART), pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (ADNS) conforme procedimento abaixo descrito (MILLER, 1959, modificado).

Foi transferido 1 mL de cada amostra para balões volumétricos de 100 mL, sendo em seguida, adicionados 30 mL de água destilada e 2,5 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado e homogeneizado. Os balões foram levados para banho-maria a 65°C por 15 minutos. As amostras foram resfriadas em água corrente e em seguida adicionados 2,8 mL de solução de NaOH 12 mols/L e completado o volume do balão até o menisco com água destilada. Foi retirado 1 mL de cada solução preparada transferindo-se para tubos de ensaio, onde foi adicionado 1 mL da solução estoque de ADNS e 1 mL de água destilada, tendo no total 3 mL. As amostras foram submetidas ao banho térmico (água fervente) por 5 minutos, e em seguida foram resfriadas em água corrente e receberam 5 mL de água destilada, perfazendo um total de 8 mL. Os tubos foram homogeneizados por 5 segundos em vórtex e foi realizada a leitura da absorbância a 540 nm em espectrofotômetro digital (ThermoBiomate® 3). O mesmo procedimento foi realizado utilizando-se água destilada ao invés da amostra para se obter o branco da reação, necessário para calibrar o aparelho. Para o cálculo do ART foi elaborada uma curva padrão

utilizando-se solução de glicose em concentrações variando de 0,12 a 1,2 g/L ($R^2 = 0,9938$). A concentração de ART nas amostras foi calculada com base na equação:

$$ART (g/100mL) = \left(\frac{Absorbância\ da\ amostra + 0,0545}{0,6863} \right) \times diluição\ da\ amostra$$

3.4.3 Análise estatística

Os resultados dos testes fermentativos foram analisados pelo teste de análise de variância utilizando o esquema fatorial (3 cultivos X 2 sistemas de fermentação X 6 ciclos fermentativos) utilizando-se o software *Assistat 7.7 Beta*.

3.5 Cálculo da eficiência fermentativa e de variação logarítmica

Para o cálculo da eficiência fermentativa, foi aplicada a fórmula baseada no cálculo estequiométrico teórico de Gay-Lussac (0,511 g de etanol/g de glicose), a seguir:

$$Eficiência\ Fermentativa = \frac{\left[\left(\frac{Etanol}{ART\ Inicial - ART\ Final} \right) \times 100 \right]}{0,511}$$

O cálculo foi aplicado para os dados de etanol, ART inicial e ART final, em g/100 mL, para cada ciclo de cada fermentação (9 horas).

Foi calculada a variação logarítmica do crescimento, considerando-se os valores de UFC/mL inicial e ao final do sexto ciclo fermentativo. Foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Variação logarítmica do crescimento} = (\log \text{ UFC/mL final} - \log \text{ UFC/mL inicial})$$

4 Resultados e Discussão

4.1 Análises microbiológicas

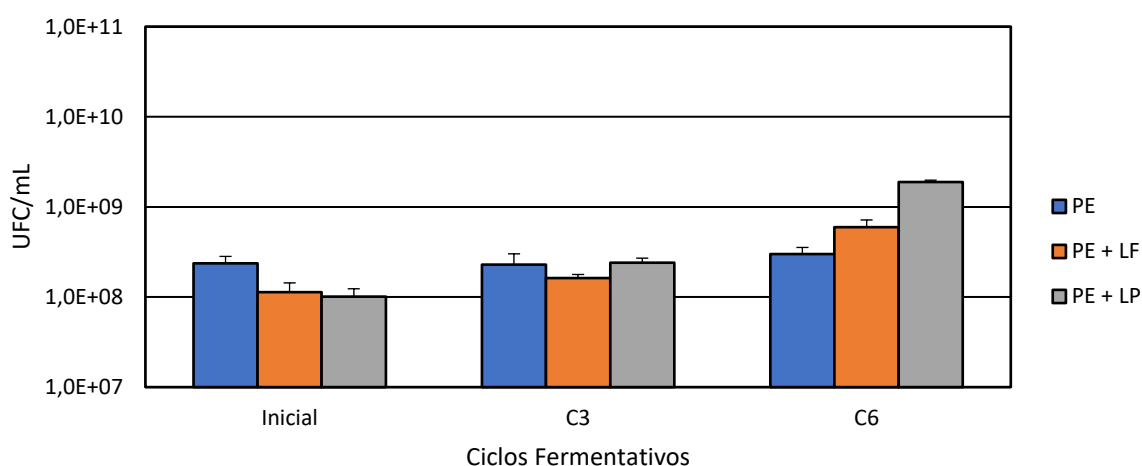
Durante a fermentação alcoólica no sistema de batelada simples, os resultados mostraram que houve crescimento da levedura em todas as fermentações conforme apresentado na Figura 1A. No sistema de batelada

alimentada, o padrão de crescimento da levedura foi semelhante ao de batelada simples como apresentado na Figura 1B. Embora todas as fermentações houve crescimento da levedura PE-2, a fermentação que houve o maior crescimento da levedura foi a fermentação em co-cultura com a bactéria *L. plantarum* nos dois sistemas de fermentação, sendo que, na fermentação em batelada simples a levedura teve um aumento no valor de UFC/mL de 1×10^8 (tempo 0) para $1,89 \times 10^{10}$ (final do 6º ciclo fermentativo); enquanto no sistema de batelada alimentada a levedura teve um aumento no valor de UFC/mL de $2,29 \times 10^8$ para $1,77 \times 10^{10}$.

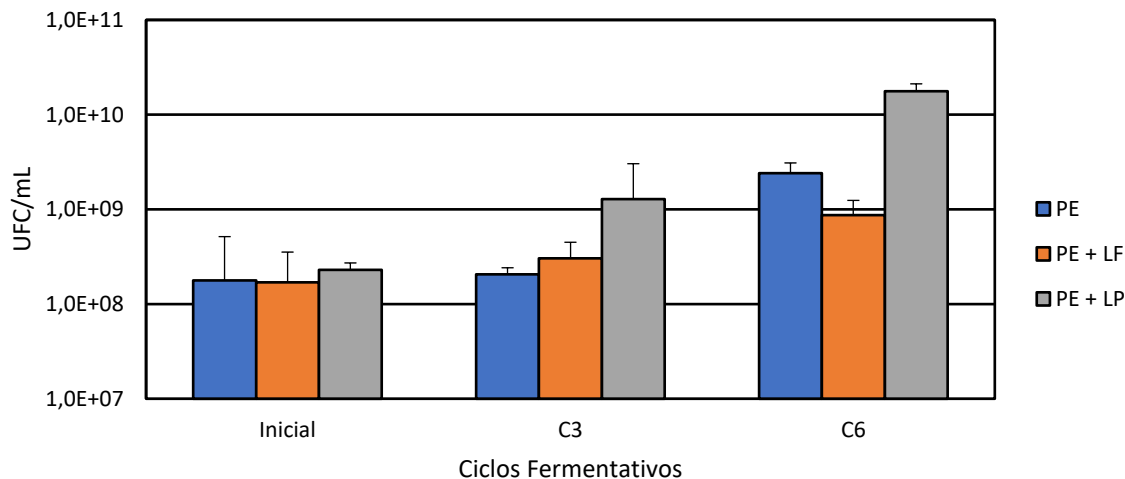
A Tabela 1 mostra a variação logarítmica do crescimento da levedura, considerando-se o valor de UFC/mL inicial e ao final do sexto ciclo fermentativo. Conforme apresentado nos dados anteriores, a tabela confirma que a levedura apresentou maior variação de crescimento no sistema de batelada alimentada (aumento de 2,26 ciclo log) quando em cultura pura e em associação com *L. plantarum*, quando comparada com a batelada simples (aumento de 1,28 ciclo log). Na fermentação contaminada com *L. fermentum*, há um efeito do sistema de fermentação, pois no sistema de batelada alimentada houve uma variação maior (crescimento de 1,15 ciclo log) quando comparado ao sistema de batelada simples (crescimento de 0,10 ciclo log), porém estes valores são bem inferiores mostrando assim que praticamente não houve diferença quanto ao crescimento da levedura ao final de seis ciclos fermentativos nos dois sistemas na fermentação em co-cultura com a *L. fermentum*, mostrando assim que houve efeito da contaminação pela bactéria *L. fermentum* sobre a viabilidade da levedura.

Figura 1. Número de leveduras (UFC/mL) nas fermentações desenvolvidas em caldo de cana, com a cultura pura de *S. cerevisiae* (PE) e contaminadas com *L. fermentum* (PE+LF) ou *L. plantarum* (PE+LP), ao longo de seis ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, pH inicial 4,5, em sistema de batelada simples (A) e batelada alimentada (B) com reciclo celular. 'Inicial' refere-se aos resultados no início do 1º. ciclo fermentativo.

A



B



Basso et al. (2014) estudaram os efeitos das bactérias *L. fermentum* (heterofermentativa) e *L. plantarum* (homofermentativa) sobre a fermentação alcoólica conduzida pela linhagem selecionada CAT-1 em batelada alimentada e verificaram que a bactéria *L. fermentum* (heterofermentativa) foi mais prejudicial na fermentação do que *L. plantarum*.

Tabela 1. Variação logarítmica (média e desvio-padrão) do crescimento de *S. cerevisiae* (PE) em fermentação não contaminada e contaminada com *L. fermentum* (PE + LF) e *L. plantarum* (PE + LP) em sistema de batelada simples e alimentada com reciclo celular¹

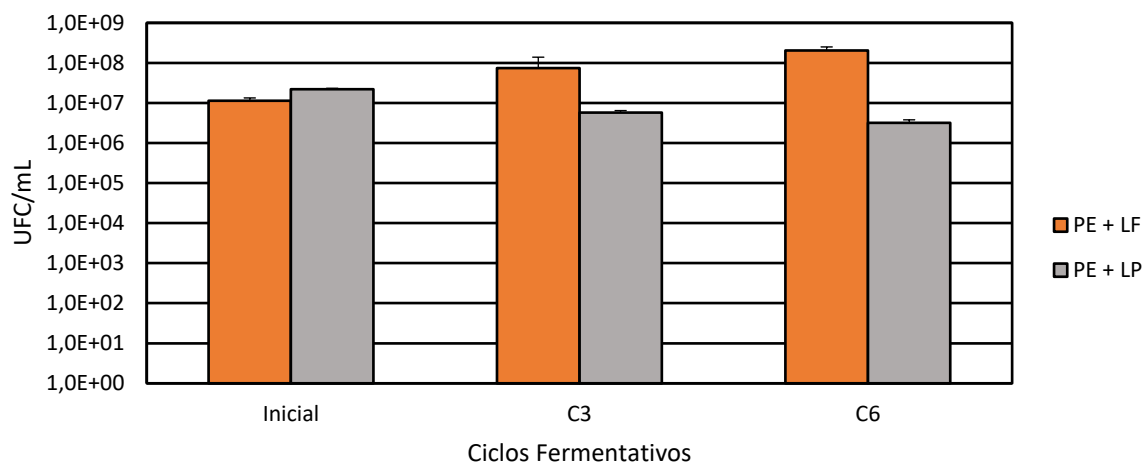
Cultivo	Sistema de fermentação	
	Batelada simples	Batelada alimentada
PE	0,10 ± 0,12	1,15 ± 0,10
PE + LF	0,72 ± 0,10	0,69 ± 0,07
PE + LP	1,28 ± 0,07	2,26 ± 0,06

¹Considerou-se a variação do número de UFC/mL ao final do 6º. ciclo em relação ao inicial

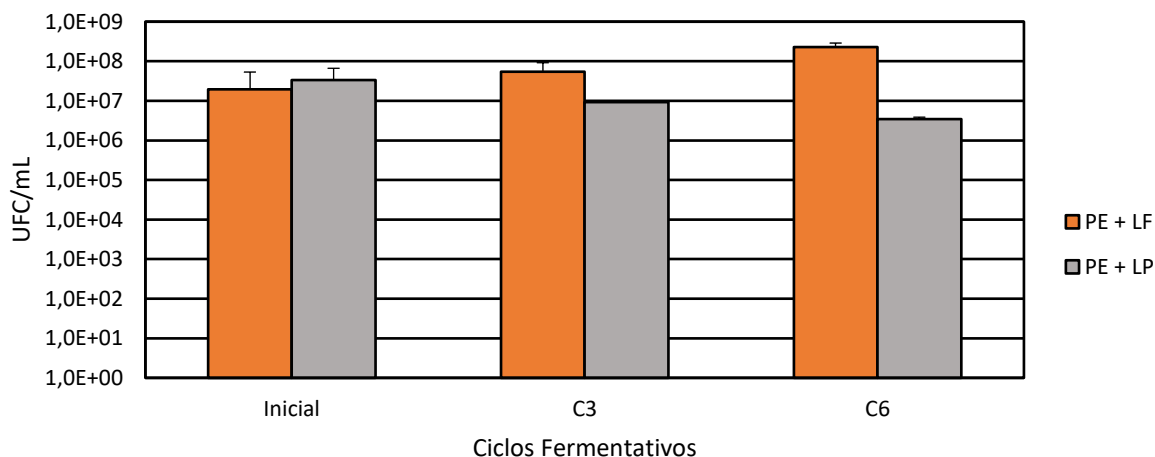
Em relação ao crescimento bacteriano no sistema de batelada simples, pode ser verificado que *L. fermentum* apresentou aumento no número de UFC/mL ao longo dos ciclos fermentativos, de 1,25 ciclos log, sendo maior que no sistema de batelada alimentada (1,07 ciclos log). A bactéria *L. plantarum* apresentou decréscimo no número de UFC no decorrer dos ciclos de fermentação, nos dois sistemas (queda de 0,48 ciclo log, no sistema de batelada simples; queda de 0,66 ciclos log, no sistema de batelada alimentada) conforme apresenta a figura 2A e 2B e a tabela 2. Nessas condições, a queda da viabilidade da bactéria *L. plantarum* pode ser devido à alguma interação específica com as células da levedura, como produção de substâncias pela levedura, causando morte celular, ou ainda uma deficiência no crescimento dessa bactéria em caldo de cana. A morte das células de *L. plantarum* pode ter beneficiado o crescimento da levedura por causa das substâncias liberadas pela autólise celular, já que houve aumento no número de UFC da levedura quando em co-cultura com *L. plantarum*. Da mesma forma, o aumento do número de UFC/mL de *L. fermentum* pode estar relacionado à menor variação de crescimento da levedura no sistema de batelada alimentada (Tabela 1).

Figura 2. Número de bactérias (UFC/mL) nas fermentações desenvolvidas em caldo de cana com *S. cerevisiae* (PE) e *L. fermentum* (PE+LF) ou *L. plantarum* (PE+LP), ao longo de seis ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, pH inicial 4,5, em sistema de batelada simples (A) e batelada alimentada (B) com reciclo celular. 'Inicial' refere-se aos resultados no início do 1º. ciclo fermentativo.

A



B



Carvalho-Netto et al. (2015) analisaram a fisiologia molecular da levedura PE-2 em uma usina do estado de São Paulo que utilizava processo de batelada alimentada, durante 3 meses, em dois tipos distintos de fermentação: fermentação típica (sem floculação) e fermentação com floculação. Os dados mostraram que no sistema onde havia a floculação, 93% das bactérias encontradas eram *L. fermentum*, enquanto na fermentação típica apenas 41% das bactérias encontradas eram *L. fermentum*. Na fermentação com floculação, o crescimento da levedura foi menor que na fermentação típica devido à presença da bactéria. A fermentação com

floculação apresentou produção de etanol bem inferior e um maior consumo de açúcar quando comparado com a fermentação típica, além do fato de ter uma alta produção de ácido lático e ácido acético.

Tabela 2. Variação logarítmica (média e desvio-padrão) do crescimento de *L. fermentum* e *L. plantarum* em fermentação conduzida por *S. cerevisiae* em sistema de batelada simples e alimentada com reciclo celular^{1,2}

Cultivo	Sistema de fermentação	
	Batelada simples	Batelada alimentada
PE + <i>L. fermentum</i>	1,25 ± 0,03	1,07 ± 0,22
PE + <i>L. plantarum</i>	- 0,48 ± 0,13	- 0,66 ± 0,19

¹Considerou-se a variação do número de UFC/mL ao final do 6º. ciclo em relação ao inicial; ² Valor negativo refere-se à diminuição no número de UFC

4.2 Análises físico-químicas

A análise de variância dos valores de pH do caldo de cana mostrou que houve diferença significativa entre os cultivos, entre os sistemas de fermentação e entre os ciclos fermentativos, isoladamente. Porém, houve interação entre esses parâmetros de forma que dependendo do tipo de cultivo (contaminado ou não com bactéria), do sistema de fermentação e dos ciclos fermentativos, houve uma resposta diferente quanto ao pH da fermentação (Tabela 3).

Verificou-se que no sistema de batelada simples houve uma queda nos valores para os três cultivos sendo que, independentemente da contaminação por bactéria. No entanto, a fermentação PE-2 + *L. fermentum* foi a que apresentou uma variação maior de pH entre o início e o final dos ciclos fermentativos, sendo que a maior queda do pH foi no sexto ciclo fermentativo (3,6), seguido pelo cultivo PE-2 + *L. plantarum* (3,7 – sexto ciclo fermentativo) e depois a fermentação sem contaminação (4,0 – sexto ciclo fermentativo), conforme Figura 3A.

No sistema de batelada alimentada, as maiores variações de pH foram observadas na fermentação contaminada com *L. plantarum* (3,8) e sem contaminação (3,9), ambas no sexto ciclo fermentativo (Figura 3B). Comparando-se

os dois sistemas de fermentação, observou-se que o pH final da fermentação foi menor no sistema de batelada simples (Figuras 3A e 3B).

Basso et al. (2014) estudaram os efeitos das bactérias *L. fermentum* e *L. plantarum* sobre a fermentação alcoólica conduzida pela linhagem selecionada CAT-1 em fermentação por batelada alimentada. Os dados mostraram que com a bactéria *L. fermentum* houve uma maior queda no pH, seguido pela fermentação com a bactéria *L. plantarum*, e a que teve a menor queda de pH foi a fermentação que tinha somente a levedura CAT-1. Esses resultados foram semelhantes aos aqui encontrados.

Tabela 3. Análise de variância dos valores de pH nas fermentações desenvolvidas em caldo de cana, com a cultura pura de *S. cerevisiae* e contaminadas com *L. fermentum* ou *L. plantarum*, ao longo de seis ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, pH inicial 4,5, em sistema de batelada simples e batelada alimentada com reciclo celular.

Causa de variação	SQ	GL	QM	F
Cultivo	0,18672	2	0,09336	9,5744 **
Sistema	0,12134	1	0,12134	12,4436 **
Ciclos Fermentativos	1,57415	5	0,31483	32,2872 **
Cultivo X Sistema	0,03645	2	0,01823	1,8691 ns
Cultivo X Ciclos	0,17216	10	0,01722	1,7656 ns
Sistema X Ciclos	0,10380	5	0,02076	2,1290 ns
Cultivo X Sistema X Ciclos	0,30005	10	0,03000	3,0771 **
Tratamentos	2,49466	35	0,07128	7,3097 **
Resíduo	0,70207	72	0,00975	
Total	3,19673	107		

** = significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

* = significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$)

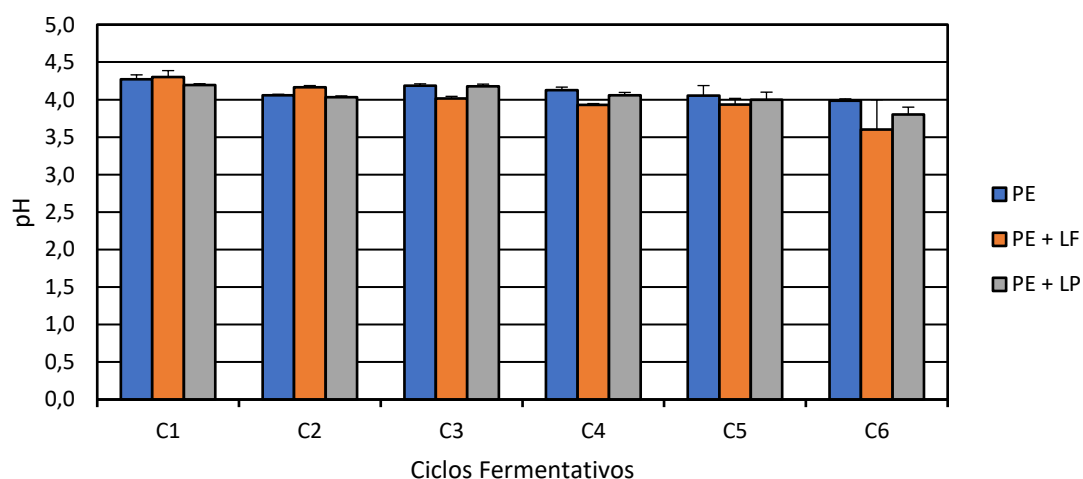
ns= não significativo ($p \geq 0,05$)

O pH é um fator importante para as fermentações industriais devido à sua importância tanto no controle da contaminação bacteriana quanto ao seu efeito

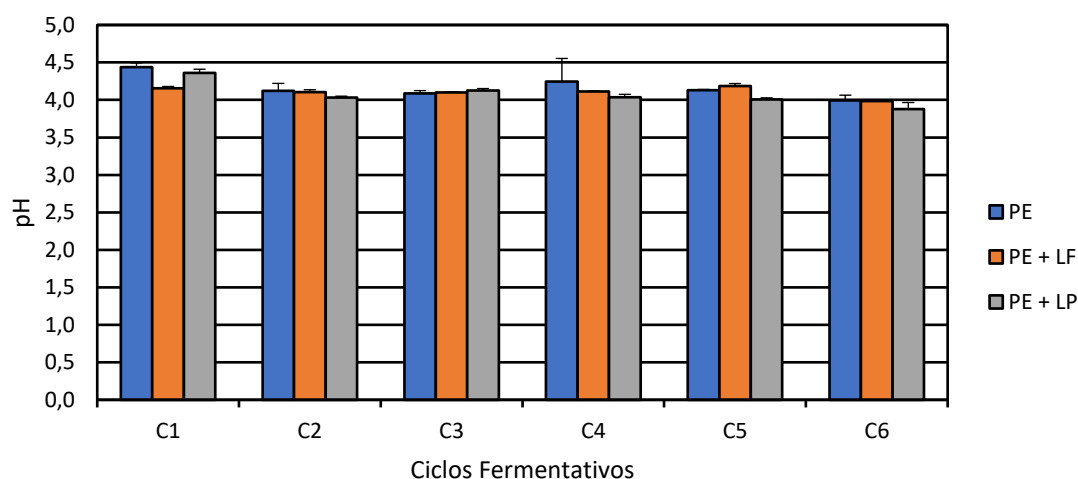
sobre o crescimento da levedura, taxa de fermentação e formação de subprodutos (SOUZA, 2009). A faixa ideal do pH para a fermentação alcoólica é entre 4,0 a 5,0 (LIMA et al., 2001). A diminuição do pH ao longo do processo fermentativo se deve principalmente à excreção de ácidos orgânicos, absorção de aminoácidos básicos, excreção de dióxido de carbono e absorção de fosfato, como observado para a fermentação da cerveja (COOTE; KIRSOP, 1976).

Figura 3. Valor de pH do caldo de cana nas fermentações desenvolvidas com a cultura pura de *S. cerevisiae* (PE) e contaminadas com *L. fermentum* (PE+LF) ou *L. plantarum* (PE+LP), ao longo de seis ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, pH inicial 4,5, em sistema de batelada simples (A) e batelada alimentada (B) com reciclo celular.

A



B



Da mesma forma que para o pH, foi verificada também interação significativa entre sistema de fermentação, cultivos e ciclos fermentativos para a produção de etanol, mostrando que para cada sistema de fermentação, há uma resposta quanto à produção de etanol que está na dependência do tipo de cultivo (contaminado ou não com bactérias) e dos ciclos fermentativos (Tabela 4).

Tabela 4. Análise de variância da produção de etanol nas fermentações desenvolvidas em caldo de cana, com a cultura pura de *S. cerevisiae* e contaminadas com *L. fermentum* ou *L. plantarum*, ao longo de seis ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, pH inicial 4,5, em sistema de batelada simples e batelada alimentada com reciclo celular.

Causa de variação	SQ	GL	QM	F
Cultivo	32,13087	2	16,06543	241,2731 **
Sistema	11,90021	1	11,90021	178,7191 **
Ciclos Fermentativos	74,78865	5	14,95773	224,6374 **
Cultivo X Sistema	5,10172	2	2,55086	38,3092 *
Cultivo X Ciclos	1,77071	10	0,17707	2,6593 **
Sistema X Ciclos	2,55046	5	0,51009	7,6606 **
Cultivo X Sistema X Ciclos	3,56659	10	0,35666	5,3564 **
Tratamentos	131,80921	35	3,76598	56,5580 **
Resíduo	4,79420	72	0,06659	
Total	136,60341	107		

** = significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

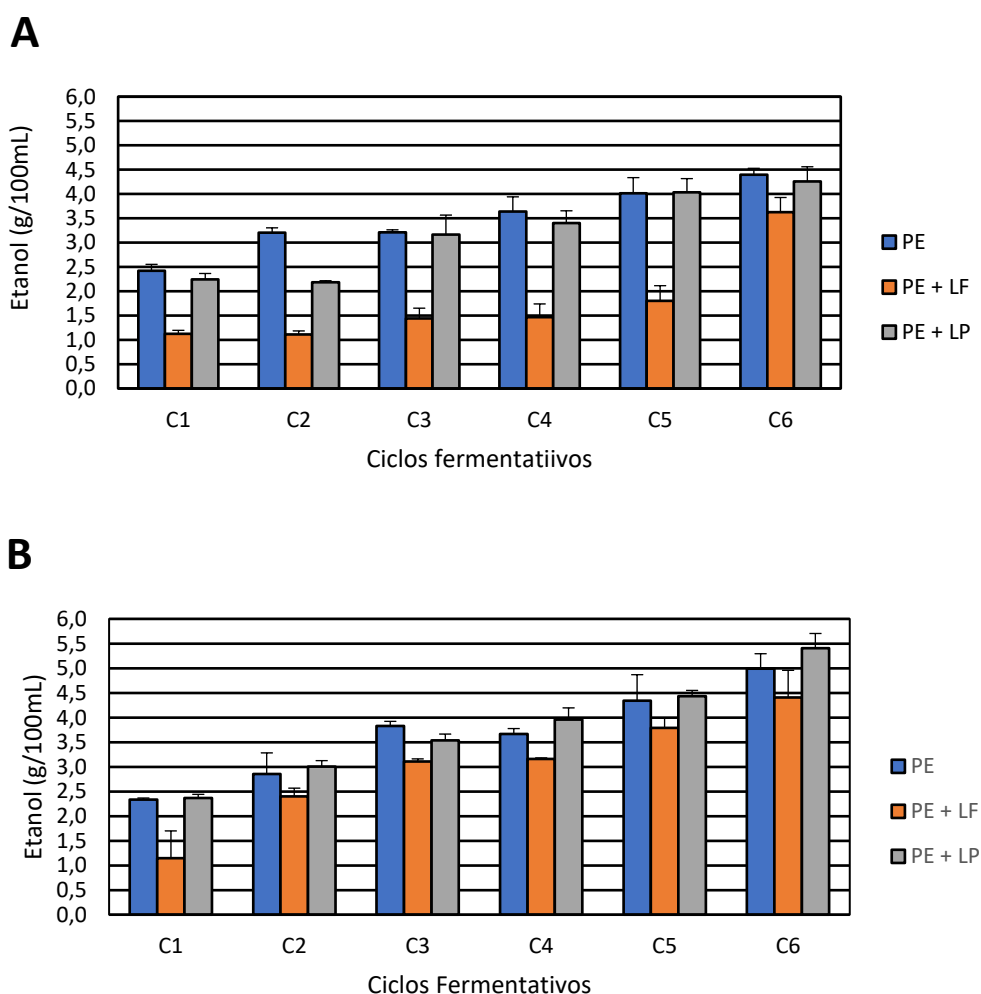
* = significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$)

ns= não significativo ($p \geq 0,05$)

No sistema de batelada simples, as fermentações com somente a levedura (4,4 g/100mL) e a contaminada com *L. plantarum* (4,2 g/100mL) apresentaram valores superiores de teor alcoólico à fermentação com *L. fermentum* (3,2 g/100mL), sendo que todas as fermentações tiveram sua maior produção de etanol no sexto ciclo fermentativo. Com *L. plantarum*, houve um atraso na produção de etanol até o 2º. ciclo fermentativo (1,2 g/100ml), comparando-se com a fermentação não

contaminada (3,2 g/100mL), somente no sexto ciclo de fermentação os valores se equipararam. Este fato pode ser devido ao fato de os efeitos da bactéria *L. plantarum* não ser tão impactante quanto os efeitos ocasionados pela bactéria *L. fermentum*, e também à queda da população de *L. plantarum*, conforme já apresentado nos dados de crescimento microbiano (Figura 2A). Embora tenha havido um pico, dobrando a produção de etanol do quinto para o sexto ciclo na fermentação com PE + *L. fermentum*, ficaram evidentes os efeitos prejudiciais causados pela bactéria *L. fermentum*. Com *L. fermentum*, a produção de etanol foi inferior em todos os ciclos fermentativos (Figura 4A).

Figura 4. Produção de etanol (g/100 mL) nas fermentações desenvolvidas em caldo de cana, com a cultura pura de *S. cerevisiae* (PE) e contaminadas com *L. fermentum* (PE+LF) ou *L. plantarum* (PE+LP), ao longo de seis ciclos fermentativos de 9 horas, pH inicial 4,5, a 30°C, em sistema de batelada simples (A) e batelada alimentada (B) com reciclo celular.



No sistema de fermentação em batelada alimentada, o efeito de *L. plantarum* foi ainda menor, pois a produção de etanol da fermentação com a *L. plantarum* foi de 5,4 g/100mL, sendo semelhante em relação à fermentação sem contaminação onde sua produção foi de 5,1 g/100mL, ambas no sexto ciclo fermentativo. Nota-se que até o quinto ciclo de fermentação o sistema de batelada alimentada teve um comportamento semelhante ao sistema de batelada simples (na fermentação sem contaminação e contaminada com a *L. plantarum*), porém no sexto ciclo fermentativo a batelada alimentada teve um pico maior de produção do que o sistema de batelada simples. Na fermentação contaminada com a *L. fermentum*, a produção de etanol foi inferior em todos os ciclos fermentativos, sendo que sua maior produção de etanol foi no sexto ciclo (3,4 g/100mL) comparando-se com a fermentação sem contaminação. Embora a fermentação contaminada com a *L. fermentum* tenha apresentado um valor inferior comparado as outras duas fermentações, quando comparamos com o sistema de batelada simples (1,7 g/100mL) a produção de etanol até o quinto ciclo de fermentação foi bem superior no sistema de batelada alimentada (3,3 g/100mL – quinto ciclo fermentativo) desde do primeiro ciclo fermentativo, conforme apresentado na figura 4B. Fermentações contaminadas com *L. fermentum* mostraram menor produção de etanol quando comparadas à fermentação sem contaminação (BASSO et al., 2014; CARVALHO-NETTO et al., 2015), enquanto na fermentação com a bactéria *L. plantarum*, a produção de etanol foi próxima à fermentação na qual tinha somente a levedura (BASSO et al., 2014).

Quando se compara os dois sistemas de fermentação, batelada simples e batelada alimentada, verifica-se que o impacto das contaminações é maior no início dos ciclos em batelada simples, havendo uma recuperação a seguir, e muito mais tardia para *L. fermentum*. Com a batelada alimentada, o aumento na produção de etanol já é observado desde o 2º. ciclo fermentativo nas fermentações contaminadas e segue aumentando até o final do 6º. ciclo fermentativo, atingindo valores superiores àqueles na batelada simples (Figuras 4A e 4B).

Constata-se assim que no sistema de batelada alimentada a produção de etanol foi maior, especialmente nas fermentações contaminadas com *L. fermentum* e *L. plantarum*. Esse resultado pode ser explicado pelo efeito da alimentação do caldo de cana sobre o crescimento da levedura, diminuindo o efeito osmótico resultante da alta concentração de açúcar presente no sistema em batelada. Foi verificado que no sistema em batelada alimentada há um melhor desenvolvimento da levedura (Tabela

1), o que possibilita uma melhor *performance* fermentativa e capacidade de competir com a bactéria contaminante.

Quanto ao ART, foi verificada também interação significativa entre sistema de fermentação, cultivos e ciclos fermentativos, mostrando que para cada sistema de fermentação há uma resposta quanto ao consumo de açúcar redutor total, que está na dependência do tipo de cultivo (contaminado ou não com bactérias) e dos ciclos fermentativos (Tabela 5).

Tabela 5. Análise de variância dos valores de ART nas fermentações desenvolvidas em caldo de cana, com a cultura pura de *S. cerevisiae* e contaminadas com *L. fermentum* ou *L. plantarum*, ao longo de seis ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, pH inicial 4,5, em sistema de batelada simples e batelada alimentada com reciclo celular.

Causa de variação	SQ	GL	QM	F
Cultivo	1484,61330	2	742,30665	44,3474 **
Sistema	204,16000	1	204,16000	12,1971 **
Ciclos Fermentativos	20460,22735	5	4092,04547	244,4699 **
Cultivo X Sistema	1373,21740	2	686,60870	41,0199 **
Cultivo X Ciclos	7383,84800	10	738,38480	44,1131 **
Sistema X Ciclos	2008,74702	5	401,74940	24,0016 **
Cultivo X Sistema X Ciclos	984,13316	10	98,41332	5,8795 **
Tratamentos	33898,94623	35	968,54132	57,8633 **
Resíduo	1205,16813	72	16,73845	
Total	35104,11437	107		

** = significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

* = significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$)

ns= não significativo ($p \geq 0,05$)

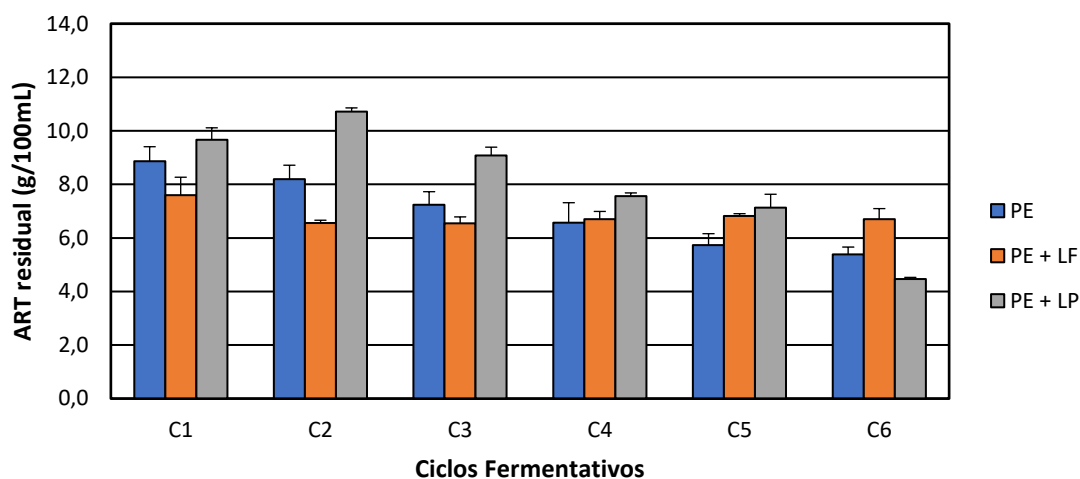
No sistema de batelada simples, pode ser verificado que a fermentação que apresentou a menor quantidade de açúcar redutor total residual foi com PE-2 + *L. plantarum* no sexto ciclo fermentativo (4,2 g/100mL), conforme apresentado na figura 5A. Este é um dos fatores que justifica a alta produção de etanol também ocorrida nessa fermentação no sexto ciclo de fermentação (Figura 4A). Na fermentação com PE-2 + *L. fermentum*, houve menor sobra de açúcar nos primeiros

três ciclos de fermentação comparando com as outras duas fermentações. Apesar de ter havido mais alto consumo de açúcar nesses ciclos, a produção de etanol foi muito baixa, indicando que a presença da bactéria na fermentação teve um impacto negativo, possivelmente porque a bactéria utilizou os açúcares para produzir outros tipos de compostos que não o etanol. A partir do quarto ciclo de fermentação, as outras fermentações (PE-2; PE-2 + *L. plantarum*) apresentaram consumo superior, resultando em menos açúcar residual no meio de fermentação comparado com a fermentação com PE + *L. fermentum* (Figura 5A).

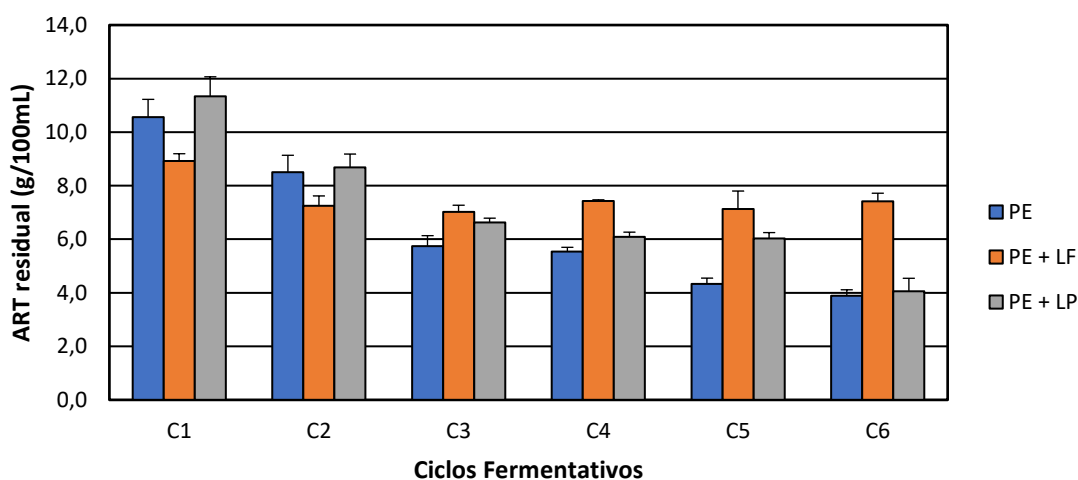
Em relação ao sistema de batelada alimentada (Figura 5B), a fermentação que apresentaram maior consumo de açúcar foram a contaminada com a bactéria *L. plantarum* (4,0 g/100mL) e a sem contaminação (3,9 g/100mL) justificando assim a alta produção de etanol conforme já foi apresentado na figura 4B. A fermentação contaminada com a *L. fermentum* apresentou a menor sobra de açúcar nos dois primeiros ciclos fermentativos, sendo que após o terceiro ciclo de fermentação a contaminada com a *L. fermentum* foi a fermentação com a maior sobra de açúcar. Quando comparado a fermentação com a *L. fermentum* com as outras fermentações no sexto ciclo fermentativo, nota-se que a fermentação com a *L. fermentum* teve uma sobra muito maior (7,5 g/100mL) em relação a fermentação sem contaminação (3,9 g/100mL) e a com a bactéria *L. plantarum* (4,0 g/100mL), evidenciando mais uma vez o efeito negativo que as bactérias exercem sobre a fermentação,

Figura 5. Açúcar redutor total residual (ART, g/100 mL) nas fermentações desenvolvidas em caldo de cana, com a cultura pura de *S. cerevisiae* (PE) e contaminadas com *L. fermentum* (PE+LF) ou *L. plantarum* (PE+LP), ao longo de seis ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, pH inicial 4,5, em sistema de batelada simples (A) e batelada alimentada (B) com reciclo celular. ART inicial= 17,7 g/100 mL.

A



B



Carvalho-Netto et al. (2015) verificaram que a fermentação contaminada com *L. fermentum* apresentou maior consumo de açúcar. Basso et al. (2014) mostraram que a fermentação com *L. fermentum* apresentou consumo total de frutose e um baixo consumo da glicose, enquanto na fermentação com *L. plantarum* houve maior consumo da glicose do que da frutose, porém, não apresentando consumo total de nenhum dos dois açúcares.

Em relação à eficiência fermentativa no sistema de batelada simples (Figura 6A) pode-se notar que houve um aumento do quinto (aproximadamente 31%) para o sexto (aproximadamente 65%) ciclo fermentativo na fermentação contaminada com a bactéria *L. fermentum*, enquanto para a fermentação com *L. plantarum* e para a fermentação somente com a levedura, os valores foram mais constantes principalmente a partir do segundo ciclo fermentativo. Analisando a média eficiência fermentativa, a fermentação contaminada com *L. plantarum* apresentou a maior média de eficiência fermentativa, sendo de 65,3%, seguida pela fermentação não contaminada (63,4%), e bem abaixo a fermentação contaminada com *L. fermentum* (31,7%).

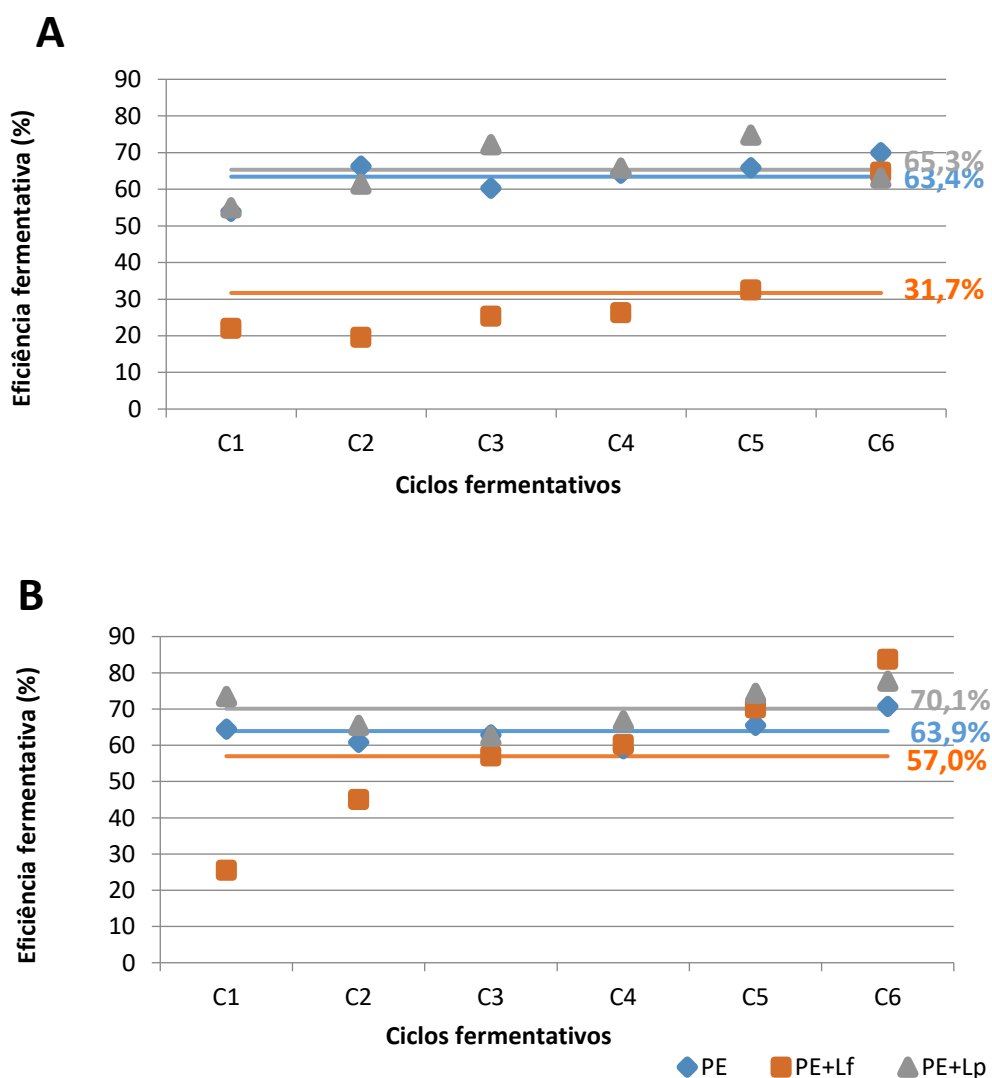
No sistema de batelada alimentada (Figura 6B), verificou-se que ao contrário da fermentação em batelada simples, a eficiência fermentativa aumentou gradativamente ao longo dos ciclos fermentativos contaminados com *L. fermentum*, enquanto para as outras fermentações os valores foram mais constantes. Assim como no sistema de batelada simples a fermentação com a bactéria *L. plantarum* teve a maior média em sua eficiência fermentativa (70,1%), seguido pela fermentação somente com a levedura (63,9%) e a fermentação com a bactéria *L. fermentum* (57%).

Verificou-se, portanto, que em sistema de batelada alimentada ocorreu um aumento na eficiência fermentativa nas fermentações contaminadas por *Lactobacillus*, sendo mais eficiente quando *L. fermentum* foi o contaminante. Nessa situação, houve um aumento na eficiência fermentativa em relação à batelada simples; com *L. plantarum*. Na fermentação sem contaminação, não houve mudança na eficiência fermentativa comparando-se os dois sistemas. A maior variação de crescimento da levedura no sistema de batelada alimentada pode ser devido à alimentação do meio de fermentação, o que acabou por resultar em melhor conversão do açúcar em etanol e conseqüentemente no aumento da eficiência fermentativa (figura 6).

Embora tenha havido melhora na eficiência de conversão dos açúcares do caldo em etanol no sistema de batelada alimentada, a sobra de açúcar na fermentação contaminada com *L. fermentum* é muito superior à das outras fermentações (cerca de 80-90% maior), indicando uma fermentação mais lenta. Outro fator que possa justificar essa fermentação mais lenta é que se trabalhou com um tempo de fermentação de 9 horas, o que pode ter sido insuficiente para que todo

o açúcar disponível fosse convertido em etanol. No entanto, fermentações mais longas são indesejáveis na indústria. Essas características tornam essa bactéria um contaminante muito importante na indústria da fermentação, merecendo mais estudos acerca de formas de controle.

Figura 6. Eficiência fermentativa (%) das fermentações desenvolvidas em caldo de cana, com a cultura pura de *S. cerevisiae* (PE) e contaminadas com *L. fermentum* (PE+LF) ou *L. plantarum* (PE+LP), ao longo de seis ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, pH inicial 4,5, em sistema de batelada simples (A) e batelada alimentada (B) com reciclo celular. As linhas horizontais e os números em porcentagem indicam o valor médio de eficiência de cada fermentação.



Uma outra questão a ser esclarecida é a forma como foi realizada a alimentação da fermentação no presente trabalho. Devido à impossibilidade de trabalhar com uma vazão constante de alimentação no decorrer da fermentação, como é habitualmente feito no sistema industrial de batelada alimentada, foram realizadas cinco alimentações do meio de fermentação no decorrer de 9 horas do ciclo fermentativo. A resposta dos micro-organismos e os parâmetros fermentativos em um e outro procedimento devem ser diferentes. O presente trabalho pode mostrar que no sistema de batelada simples, o efeito das contaminações foi maior do que no sistema de batelada com alimentação periódica, como poderia ser chamado o método aqui utilizado, especialmente pelo fato de a alimentação permitir um maior desenvolvimento da levedura, que pode assim competir em melhor condição com a bactéria contaminante.

5 Conclusões

O sistema de fermentação – batelada simples ou batelada alimentada – afetou os parâmetros fermentativos nas fermentações contaminadas com as bactérias *Lactobacillus*.

Em sistema de batelada alimentada, verificou-se maior produção de etanol e maior eficiência fermentativa, devido sua adaptação ao meio fermentativo. A bactéria *L. fermentum* foi mais prejudicial à fermentação do que *L. plantarum*, resultando em maior sobra de açúcar no meio fermentado e menor eficiência fermentativa, nos dois sistemas.

Não houve diferenças quanto ao crescimento da levedura PE-2 e das bactérias nos dois sistemas de fermentação, indicando que o aumento na eficiência fermentativa no sistema de batelada alimentada foi devido provavelmente à melhor conversão de açúcar em etanol devido às alimentações periódicas de caldo de cana no sistema de batelada alimentada.

6 Literatura citada

AMORIM, H. V. **Introdução à bioquímica da fermentação alcoólica**. Araras: IAA/Cordenadoria Regional Sul, 1997.

- ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, S. R.; STUPIELLO, E. N. A. Bioethanol – what has Brazil learned about yeasts inhabiting the ethanol production processes from sugar cane?. In: BERNARDES, M. A. S. (Ed.) **Biofuel production - recent developments and prospects**. InTech, p. 67-85, 2011.
- ANDRIETTA, M. G. S.; STECKELBERG, C. E.; ANDRIETTA, S. R. Bioetanol – Brasil 30 anos na vanguarda. **MultiCiências**, v. 7, p. 1-16, 2007.
- BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, 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, n. 1, p. 169-177, 2014.
- CARVALHO-NETTO, O. V.; CARAZZOLLE, M. F.; MOFATTO, L. S.; TEIXEIRA, P. J. P. L.; NORONHA, M. F.; CALDERÓN, L. A. L.; MIECZKOWSKI, P. A.; ARGUESO, J. L.; PEREIRA, G. A. G. *Saccharomyces cerevisiae* transcription reprogramin due to bacterial contamination during industrial scale bioetanol production. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 13, p. 1-13, 2015.
- CEBALLOS-SCHIAVONE, C. H. M. **Tratamento térmico do caldo de cana-de-açúcar visando a redução de contaminantes bacterianos - *Lactobacillus* na produção de etanol e eficiência de tratamento do fermento por etanol**. 2009. 177 f. (Dissertação de Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, Brasil, 2009.
- COOTE, N.; KIRSOP, B. H. Factors responsible for the decrease in pH during beer fermentations. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 82, n. 3, p. 149-153, 1976.

DELLA-BIANCA, B. E.; BASSO, T. O.; STAMBUK, B. U.; BASSO, L. C.; GOMBERT, A. K. What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 3, p. 979–991, 2013.

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y.; Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 11, p. 641-649, 1981.

LIMA, U. A., BASSO, L. C., AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Ed.). **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**, v.3, São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2001.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

SOUZA, C. S. **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *S. cerevisiae***. 2009. 136 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto Butantã, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

CAPÍTULO 2. Efeito da adição de etanol ao tratamento ácido para o controle da contaminação por *Lactobacillus fermentum*

1 Resumo

A contaminação bacteriana é um dos principais fatores que causa queda na eficiência fermentativa, trazendo grandes prejuízos para as destilarias. O uso de antibióticos e biocidas como formas de controle podem acarretar em aumento de custo e problemas ambientais para a indústria. O emprego do tratamento ácido (solução de ácido sulfúrico, pH 2,0) do fermento entre os ciclos fermentativos nem sempre é eficaz para combater a contaminação bacteriana. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da adição de etanol ao tratamento ácido na fermentação alcoólica em batelada alimentada para o controle do crescimento da bactéria *Lactobacillus fermentum* e sobre os parâmetros fermentativos. Inicialmente, a concentração de etanol a ser adicionada ao tratamento ácido foi otimizada, testando-se concentrações variando de 1 a 13% de etanol (v/v). Em seguida, foram realizados seis ciclos fermentativos conduzidos pela levedura industrial *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 em cultura pura e em co-cultura com a *L. fermentum* em mosto de caldo de cana 16° Brix a 30°C por um período de 9 horas de fermentação. Ao final dos ciclos fermentativos as células foram submetidas ao tratamento ácido (pH 2,0) e ao tratamento ácido com adição de 5% de etanol, por 2 horas a 30°C sob agitação. Só com o tratamento ácido, a população bacteriana

reduziu quase 3 ciclos log ao final do sexto ciclo fermentativo, no entanto, quando se adicionou 5% de etanol à solução ácida, a bactéria perdeu completamente a viabilidade celular já ao final do primeiro ciclo fermentativo com o tratamento. Não houve alteração na produção de etanol na fermentação contaminada com *L. fermentum*, comparando-se os tratamentos celulares com e sem adição de 5% de etanol. Observou-se um aumento na eficiência fermentativa (80%) com a utilização do tratamento ácido + 5% de etanol, em relação ao tratamento sem adição de etanol (73%) e especialmente em relação à fermentação realizada sem tratamento celular (57%), na presença de *L. fermentum*. O tratamento ácido + 5% de etanol foi capaz de reduzir a população de *L. fermentum* sem causar impacto à eficiência fermentativa, e com uma concentração de ART residual baixa (cerca de 4 g/100 mL), ao final de 6 ciclos fermentativos de 9 horas, em sistema de batelada alimentada.

2 Introdução

O Brasil e os Estados Unidos da América são os maiores produtores do biocombustível etanol, produzindo juntos mais de 94 bilhões de litros de etanol por ano, cerca de 85% da produção mundial. No entanto há diferenças no sistema de produção de etanol comparando os dois países, principalmente quanto ao substrato, tipo de micro-organismo e tipo de processo fermentativo (BERTRAND et al., 2016). Nas indústrias brasileiras utiliza-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, especialmente linhagens selecionadas do próprio processo industrial, as chamadas leveduras selecionadas ou personalizadas. Durante o processo de produção de etanol os açúcares presentes no substrato são convertidos em etanol, energia, biomassa celular, CO₂, e outros subprodutos pelas leveduras (MONCEAUX, 2009). Dentre esses, encontram-se os ácidos orgânicos, outros álcoois e o glicerol. A geração dos subprodutos, bem como o próprio crescimento das células de levedura, inevitavelmente diminui a produção de etanol, reduzindo o rendimento fermentativo do processo (BAI et al., 2008).

No entanto, a geração dos subprodutos não é o único fator que reduz o rendimento fermentativo. Durante o processo de fermentação alcoólica o fermento sofre inúmeras reciclagens e interferências externas, tornando-se vulnerável à contaminação por outros micro-organismos principalmente por leveduras nativas (aquelas que não são colocadas no processo) e bactérias. Por este motivo, é

fundamental o constante monitoramento do processo fermentativo (OLIVEIRA; PAGNOCCA, 1988; CECCATO-ANTONINI; SILVA, 2000). Basso et al. (2014) estudaram os efeitos das bactérias *Lactobacillus fermentum* (heterofermentativa) e *Lactobacillus plantarum* (homofermentativa) sobre a fermentação alcoólica conduzida pela linhagem selecionada CAT-1 e verificaram que as linhagens apresentaram um comportamento diferente quanto ao consumo do substrato, sendo que *L. fermentum* consumiu mais rápido os açúcares em comparação à *L. plantarum*. Pode-se notar também que *L. fermentum* teve uma alta produção de manitol e uma baixa produção de ácido lático e ácido acético, enquanto *L. plantarum* produziu apenas uma alta quantidade de ácido lático.

As contaminações bacterianas podem chegar à taxas de 10^8 - 10^9 células/mL (BAYROCK; INGLEDEW, 2004; BURTNER et al., 2009). Amorim et al. (2009) estimaram que cerca de 20.000 litros de etanol são perdidos por dia em uma destilaria de médio porte quando a contaminação bacteriana aumenta de 10^7 para 10^8 células/mL.

O controle dos contaminantes bacterianos é essencial para a manutenção do rendimento fermentativo. Nas indústrias brasileiras, o tratamento ácido que é realizado ao final de cada ciclo fermentativo reduz a contaminação bacteriana e floculação do fermento, normalmente ocasionado por bactérias. Esse procedimento consiste em tratar o fermento, após a centrifugação do vinho fermentado, em uma cuba com uma solução de ácido sulfúrico em água (pH 2,0 a 2,5) por um período de 1 a 2 horas. Em seguida, a massa de células é encaminhada novamente para as dornas de fermentação para um novo ciclo fermentativo (WHEALS et al., 1999; BASSO et al., 2008). No entanto, dependendo do nível de contaminação e do tipo de bactéria contaminante, o tratamento ácido não é eficiente, demandando o abaixamento do pH da cuba de tratamento e conseqüentemente maior consumo de ácido sulfúrico, o que pode comprometer a viabilidade da levedura e aumentar os custos.

O uso de antibacterianos é uma prática bastante comum nas destilarias, quando somente o tratamento ácido não é suficiente para controlar a contaminação por bactérias. Quaternários de amônio e organosulfurados são comumente utilizados na moenda, enquanto os antibióticos monensina (Kamorán®) e virginiamicina e o biocida dióxido de cloro são empregados na fermentação (OLIVA-NETO et al., 2014). Há muitos problemas envolvendo o uso desses compostos na fermentação,

como a dosagem requerida para inibir a bactéria sendo prejudicial à levedura do processo, ou os resíduos que podem ser detectados na levedura seca que é comercializada no final da safra, requerendo o estudo de outras alternativas.

A adição de etanol ao tratamento ácido foi proposto inicialmente por Ceballos-Schiavone (2009), o qual realizou testes com diferentes valores de pH (2,5 e 6,0) e concentrações de etanol (15, 20, 25, 30 e 35%) com a finalidade de controlar sete espécies de *Lactobacillus*. Verificou-se que essas bactérias se mostraram sensíveis às concentrações superiores a 20% (v/v) de etanol, não sendo observados efeitos negativos sobre as células de leveduras quando utilizadas as concentrações de 20 a 25% (v/v). Em pH 2,5, concentração de 20% v/v de etanol e 90 minutos de tratamento, a contagem da bactéria foi próxima de zero (36 UFC/mL), chegando a zero em 120 minutos. Para o pH 6,0, os valores de contagem chegaram próximo de zero (0,77 UFC/mL) em concentração de 25% v/v no tempo de 90 minutos, também chegando a zero a 120 minutos.

Bassi et al. (2013), em trabalho sobre o efeito do pH e etanol sobre três linhagens de *Dekkera bruxellensis*, uma importante levedura contaminante do processo fermentativo, testaram um tratamento combinado pH 2,0 e 13% etanol no controle de *D. bruxellensis* e concluíram que o tratamento não afetava a levedura PE-2, mas significativamente inibia o desenvolvimento da levedura contaminante. Esse tratamento teve também efeito sobre a bactéria *L. fermentum*, com perda completa de viabilidade após 1 ciclo de tratamento, em co-cultura com *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* (BASSI, 2016).

Considerando o efeito que a bactéria *L. fermentum* causa no processo fermentativo em batelada alimentada, como demonstrado no capítulo anterior, o objetivo do presente trabalho foi inicialmente determinar a concentração mínima inibitória de etanol a ser adicionada à solução ácida (pH 2,0) para o controle do crescimento dessa bactéria e em seguida comparar a eficiência do processo fermentativo conduzido por *S. cerevisiae* e contaminado por *L. fermentum* na presença e ausência de etanol no tratamento ácido, a fim de avaliar a pertinência dessa proposta em um contexto mais próximo da situação industrial.

3 Material e Métodos

3.1 Micro-organismos

A linhagem de *L. fermentum* utilizada neste trabalho foi a CCT5852 (ATCC19255), foi utilizado somente a *L. fermentum* nesta segunda parte porque concluiu que esta foi a mais prejudicial. Foi utilizada a linhagem de levedura industrial selecionada *S. cerevisiae* PE-2 como levedura do processo fermentativo (BASSO et al., 2008). As culturas microbianas pertencem ao banco de culturas do LAMAM (Laboratório de Microbiologia Aplicada e Molecular) /CCA/UFSCar-Campus de Araras.

As bactérias estão sendo mantidas em meio MRS (10 g/L peptona, 8 g/L extrato de carne, 4 g/L extrato de levedura, 20 g/L glicose, 1 g/L Tween, 2 g/L fosfato de potássio, 3 g/L acetato de sódio anidro, 2 g/L citrato de amônia dibásico, 0,2 g/L sulfato de magnésio, 0,05 g/L sulfato de manganês, em água destilada; Himedia®) e a levedura em meio YPD (10 g/L extrato de levedura, 20 g/L glicose, 20 g/L peptona e 20 g/L Agar, em água destilada), a 4°C.

3.2 Preparação do inóculo bacteriano e de levedura

Para o preparo do inóculo da levedura, foram transferidas duas alçadas de leveduras recém-crescidas em placas de Petri com o meio YPD, para dez frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL do meio de crescimento (YPD líquido) estéril. Os frascos foram mantidos durante 24 horas a 30°C, a 160 rpm, sendo em seguida o meio centrifugado a 3400 rpm por 6 minutos. O sobrenadante foi descartado, a massa obtida ressuspensa e inoculada em caldo de cana 4°Brix, pH 5,5 por um período de 24 horas a 30°C, a 160 rpm em cinco Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de caldo 4°Brix, até a obtenção de cerca de 2×10^9 células/mL. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer utilizando-se a solução do corante azul de metileno-citrato de sódio para contagem de células viáveis (LEE et al., 1981).

Para o preparo do inóculo das bactérias, foram transferidas duas alçadas da cultura da bactéria para um tubo Falcon contendo 30 mL de MRS líquido estéril. O tubo foi mantido a 35°C por 24 horas. Em seguida, transferiu-se 1 mL da suspensão da bactéria para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio MRS líquido,

sendo os frascos mantidos durante 24 horas a 35°C. A seguir, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 8000 rpm, por 10 minutos, a 4°C, em centrífuga refrigerada Eppendorf®, e a massa celular transferida para frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de caldo de cana 4°Brix, até a obtenção de cerca de 2×10^8 UFC/mL. A padronização do número de bactérias foi feita após leitura da absorbância (a 540 nm) em espectrofotômetro ThermoBiomate®, com base em uma curva-padrão “Absorbância X número de UFC/mL”, de forma que um valor de absorbância (a 540 nm) de aproximadamente 0,5 era equivalente a aproximadamente 2×10^8 UFC/mL.

3.3 Determinação da concentração mínima de etanol inibitória à *L. fermentum* quando adicionado ao tratamento ácido

Um volume de 5 mL da massa celular da bactéria foi ressuspendido em solução ácida, pH 2,0 e acrescida ou não de etanol absoluto nas concentrações de 1%, 3%, 5%, 9% e 13% (v/v), em um volume final de 50 mL em Erlenmeyers de 125 mL. Os frascos (em triplicata) foram levados ao agitador a 30°C, 160 rpm por 2 horas. Em seguida as células foram separadas da solução ácida por centrifugação a 8000 rpm, por 10 minutos, a 5°C, em centrífuga refrigerada Eppendorf®, lavadas com água destilada estéril duas vezes e inoculadas em meio de caldo de cana 4°Brix, incubação a 30°C e 160 rpm por 9 horas.

Foram retiradas amostras da massa celular antes do tratamento, após o tratamento, e após a inoculação das células tratadas em meio de caldo de cana. As células foram lavadas em água destilada estéril e a análise da viabilidade celular foi realizada por plaqueamento das amostras em meio MRS Himedia®. As placas foram incubadas a 35 °C por 72 horas para contagem do número de UFC/mL.

A solução ácida foi preparada adicionando-se ácido sulfúrico à água destilada até obtenção de pH 2,0, monitorando-se os valores de pH em pH-metro digital. Em seguida, um volume de 45 mL da solução foi transferido para erlenmeyers de 125 mL, sendo a seguir os frascos esterilizados em autoclave, a 120°C, por 15 minutos, 1 atm.

3.4 Processo fermentativo com reciclo e tratamento celular

As suspensões de células da levedura e das bactérias foram padronizadas para a contagem desejada e ressuspendidas em meio de fermentação (caldo de cana 16°Brix, pH 4,5, adicionado de 1 mL/L de solução de sais). A solução de sais adicionada ao meio de fermentação consistiu de 50 g/L de sulfato de amônio, 20 g/L de fosfato monobásico de potássio, 10 g/L de sulfato de magnésio, 1 g/L de sulfato de zinco e 1 g/L de sulfato de manganês, dissolvidos em água destilada. Essa solução foi esterilizada em autoclave a 120°C, 1 atm, 15 minutos e a seguir armazenada a 4°C.

O caldo de cana utilizado para o preparo dos meios foi obtido na Usina São João, safra 2016/2017, e armazenado em garrafas plásticas em temperatura de freezer (-10°C) até o momento do uso. Os meios de caldo de cana foram esterilizados em autoclave, a 120°C por 15 minutos, 1 atm.

Foi utilizado o processo de batelada alimentada, onde o volume inicial foi de 25 mL de meio de fermentação, em Erlenmeyers de 500 mL, inoculados com 20 mL da suspensão das células microbianas (10 mL de levedura + 10 mL de bactéria, para as fermentações em co-culturas) para uma concentração final de cerca de 1×10^8 UFC/mL de leveduras e 1×10^7 UFC/mL de bactérias, sendo realizadas 5 alimentações com volume de 31 mL do meio de fermentação, em intervalos de 90 minutos. Após 7 horas e 30 minutos de fermentação, o volume de 200 mL foi completado e a fermentação prosseguiu por mais 1 hora e 30 minutos para a finalização do teste fermentativo (9 horas de fermentação). Os frascos foram mantidos em estufa sem agitação, a 30°C.

Após o término do período de fermentação, foi retirada uma amostra para análise microbiológica, sendo o restante centrifugado a 8000 rpm, por 10 minutos, a 5°C, em centrífuga refrigerada Eppendorf®. O sobrenadante foi armazenado a -10°C para análises. A massa celular obtida foi ressuspendida em frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de solução ácida preparada conforme descrição no item 3.3. Para o tratamento ácido com 5% de etanol, foi utilizada a solução ácida esterilizada (190 mL) para a qual foi transferido um volume de etanol absoluto equivalente a uma concentração final de 5% (v/v). Os frascos foram mantidos a 30°C, 160 rpm, por 2 horas. A massa celular foi centrifugada e lavada duas vezes com água destilada estéril e inoculada em meio de fermentação para um novo ciclo

fermentativo. Foram realizados 6 ciclos de fermentação de 9 horas, intercalados com o tratamento das células.

Foram realizadas 4 fermentações, em triplicata, a seguir:

- PE-2 com tratamento ácido;
- PE-2 com tratamento ácido + 5% etanol;
- PE-2 + *L. fermentum* com tratamento ácido;
- PE-2 + *L. fermentum* com tratamento ácido + 5% etanol.

Todos os materiais utilizados no processo foram esterilizados em autoclave, a 120°C por 15 minutos, 1 atm.

3.5 Análises

Foi retirado 1 mL de amostra do meio de fermentação no início do ciclo 1 (inicial) e ao final dos ciclos 1, 3 e 6, após 9 horas de fermentação, antes do tratamento celular, para as análises microbiológicas. Em seguida, ao final de cada ciclo fermentativo, as células foram retiradas do meio de fermentação por centrifugação, a 8000 rpm por 10 minutos, a 4°C, em centrífuga Eppendorf®, e o sobrenadante foi armazenado em tubos Falcon, a -10°C para as análises físico-químicas.

3.5.1 Análises microbiológicas

Para contagem das leveduras, a amostra retirada foi diluída em série e em seguida foi realizado o plaqueamento em placas de Petri contendo meio YPD com adição de cloranfenicol (concentração final de 50 mg/mL) e tetraciclina (concentração final de 50 mg/mL). Em seguida as placas foram incubadas e mantidas a 30°C por 3 dias, para contagem de UFC/mL. Foram plaqueadas 3 diluições (10^{-7} , 10^{-6} e 10^{-5}), em duplicata, para cada uma das repetições das fermentações.

Das fermentações onde houve inoculação das bactérias, a amostra retirada foi diluída em série e em seguida foi realizado o plaqueamento em placas de Petri contendo meio MRS com adição de actidione (concentração final de 5 mg/L). Em seguida, as placas foram incubadas e mantidas a 35°C por 3 dias, para contagem de UFC/mL. Foram plaqueadas 3 diluições (10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3}), em duplicata, para cada

uma das repetições das fermentações.

O número inicial de UFC/mL de bactérias e leveduras foi corrigido em função do volume inicial do meio de fermentação (45 mL), dividindo o valor obtido após a contagem por 4,4 (relação do volume final/volume inicial do meio de fermentação, ou seja, 200/45), pelo fato do volume final de fermentação ser 200 mL.

3.5.2 Análises físico-químicas

Após a centrifugação do meio fermentado e separação das células microbianas para o reciclo celular, o sobrenadante foi analisado quanto ao pH, utilizando pH-metro digital MS TecnoPON mPA210; etanol (em g/100 mL), por meio da destilação de 10 mL das amostras em microdestilador Tecnal TE-012 e determinação da densidade da solução hidroalcoólica em densímetro digital Anton-Paar®, conforme Amorim (1997); e açúcar redutor total (ART), pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (ADNS) conforme procedimento abaixo descrito (MILLER, 1959, modificado).

Foi transferido 1 mL de cada amostra para balões volumétricos de 100 mL, sendo em seguida, adicionados 30 mL de água destilada e 2,5 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado e homogeneizado. Os balões foram levados para banho-maria a 65°C por 15 minutos. As amostras foram resfriadas em água corrente e em seguida adicionados 2,8 mL de solução de NaOH 12 mols/L e completado o volume do balão até o menisco com água destilada. Foi retirado 1 mL de cada solução preparada transferindo-se para tubos de ensaio, onde foi adicionado 1 mL da solução estoque de ADNS e 1 mL de água destilada, tendo no total 3 mL. As amostras foram submetidas ao banho térmico (água fervente) por 5 minutos, e em seguida foram resfriadas em água corrente e receberam 5 mL de água destilada, perfazendo um total de 8 mL. Os tubos foram homogeneizados por 5 segundos em vórtex e foi realizada a leitura da absorbância a 540 nm em espectrofotômetro digital (ThermoBiomate® 3). O mesmo procedimento foi realizado utilizando-se água destilada ao invés da amostra para se obter o branco da reação, necessário para calibrar o aparelho. Para o cálculo do ART foi elaborada uma curva padrão utilizando-se solução de glicose em concentrações variando de 0,12 a 1,2 g/L ($R^2 = 0,9938$). A concentração de ART nas amostras foi calculada com base na equação:

$$ART \text{ (g/100mL)} = \left(\frac{\text{Absorbância da amostra} + 0,0545}{0,6863} \right) \times \text{diluição da amostra}$$

3.5.3 Análise estatística

Os resultados dos testes fermentativos foram analisados pelo teste de análise de variância utilizando o esquema fatorial (2 cultivos X 2 tratamentos do fermento X 6 ciclos fermentativos) utilizando-se o software *Assistat 7.7 Beta*.

3.6 Cálculo da eficiência fermentativa e de variação logarítmica

Para o cálculo da eficiência fermentativa, foi aplicada a fórmula baseada no cálculo estequiométrico teórico de Gay-Lussac (0,511 g de etanol/g de glicose), a seguir:

$$\text{Eficiência Fermentativa} = \frac{\left[\left(\frac{\text{Etanol}}{\text{ART Inicial} - \text{ART Final}} \right) \times 100 \right]}{0,511}$$

O cálculo foi aplicado para os dados de etanol, ART inicial e ART final, em g/100 mL, para cada ciclo de cada fermentação (9 horas).

Foi calculada a variação logarítmica do crescimento, considerando-se os valores de UFC/mL inicial e ao final do sexto ciclo fermentativo. Foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Variação logarítmica do crescimento} = (\log n^{\circ} \text{ UFC/mL final} - \log n^{\circ} \text{ UFC/mL inicial})$$

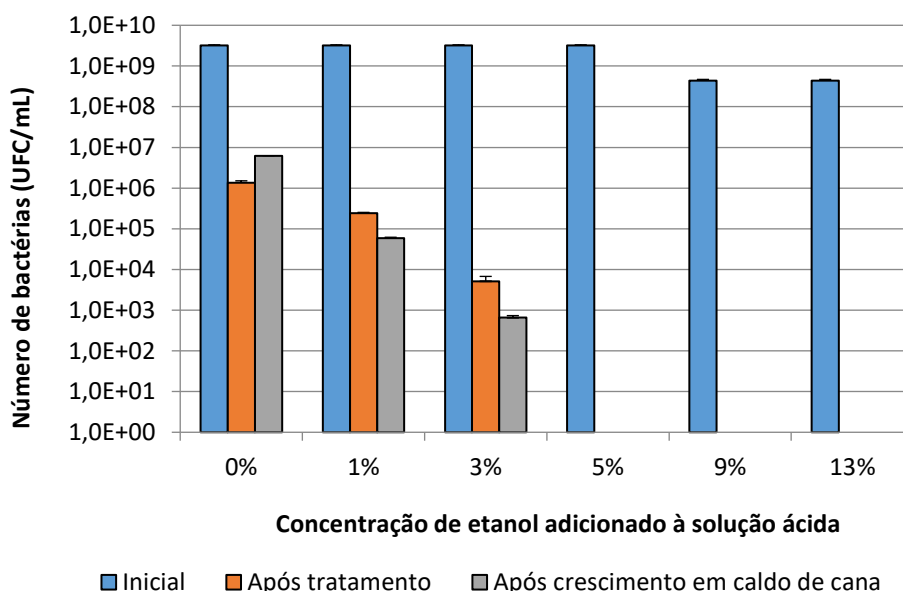
4 Resultados e Discussão

4.1 Determinação da concentração mínima de etanol inibitória à *L. fermentum* quando adicionado ao tratamento ácido

O objetivo inicial foi determinar a concentração mínima de etanol a ser adicionada ao tratamento ácido para causar inibição do crescimento de *L. fermentum*. O experimento foi baseado em trabalhos anteriores (BASSI, 2016; REIS, 2016) que mostraram morte das células de *L. fermentum* na concentração de 13% de etanol adicionado ao tratamento ácido logo no primeiro ciclo de tratamento, quando em co-cultura com *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* ou *S. cerevisiae* nativa. No

entanto, nos trabalhos acima citados o objetivo principal era otimizar a concentração de etanol para causar efeito inibitório sobre as leveduras contaminantes e não sobre a bactéria. Desta forma, procurou-se aqui determinar a concentração mínima inibitória de etanol quando adicionado ao tratamento ácido sobre o crescimento de *L. fermentum*, em cultivo puro, testando-se concentrações inferiores a 13%. Os resultados estão expressos na Figura 1.

Figura 1. Número de *L. fermentum* (UFC/mL) determinado antes do tratamento (Inicial), após o tratamento e após o crescimento em caldo de cana da massa celular tratada em solução ácida (pH 2,0) com e sem adição de etanol, a 30°C, 160 rpm, por 2 horas.



Comparando-se com os resultados obtidos no tratamento ácido sem adição de etanol, houve uma redução de 82,1% e 99,6% no número de UFC/mL com a adição de 1% e 3% de etanol, respectivamente (avaliando-se as contagens obtidas após o tratamento em cada uma das concentrações de etanol, 0; 1; e 3%), figura 1. A concentração de 5% de etanol adicionado ao tratamento ácido foi a menor concentração que causou perda total de viabilidade da bactéria.

Sem a adição de etanol, o número de UFC/mL aumentou após a inoculação das células tratadas somente na solução ácida em caldo de cana, o que não ocorreu nas concentrações de 1 e 3% de etanol adicionado à solução ácida (Figura 1). Os

resultados mostraram que uma concentração de etanol bem inferior àquela otimizada por Bassi et al. (2013) para o controle da levedura contaminante *D. bruxellensis* poderia ser utilizada para o controle de *L. fermentum*. A próxima etapa é testar esse tratamento ácido + 5% de etanol em uma fermentação em batelada alimentada com reciclo celular para verificar os efeitos sobre os parâmetros fermentativos e sobre a levedura do processo.

4.2 Processo fermentativo com reciclo e tratamento celular

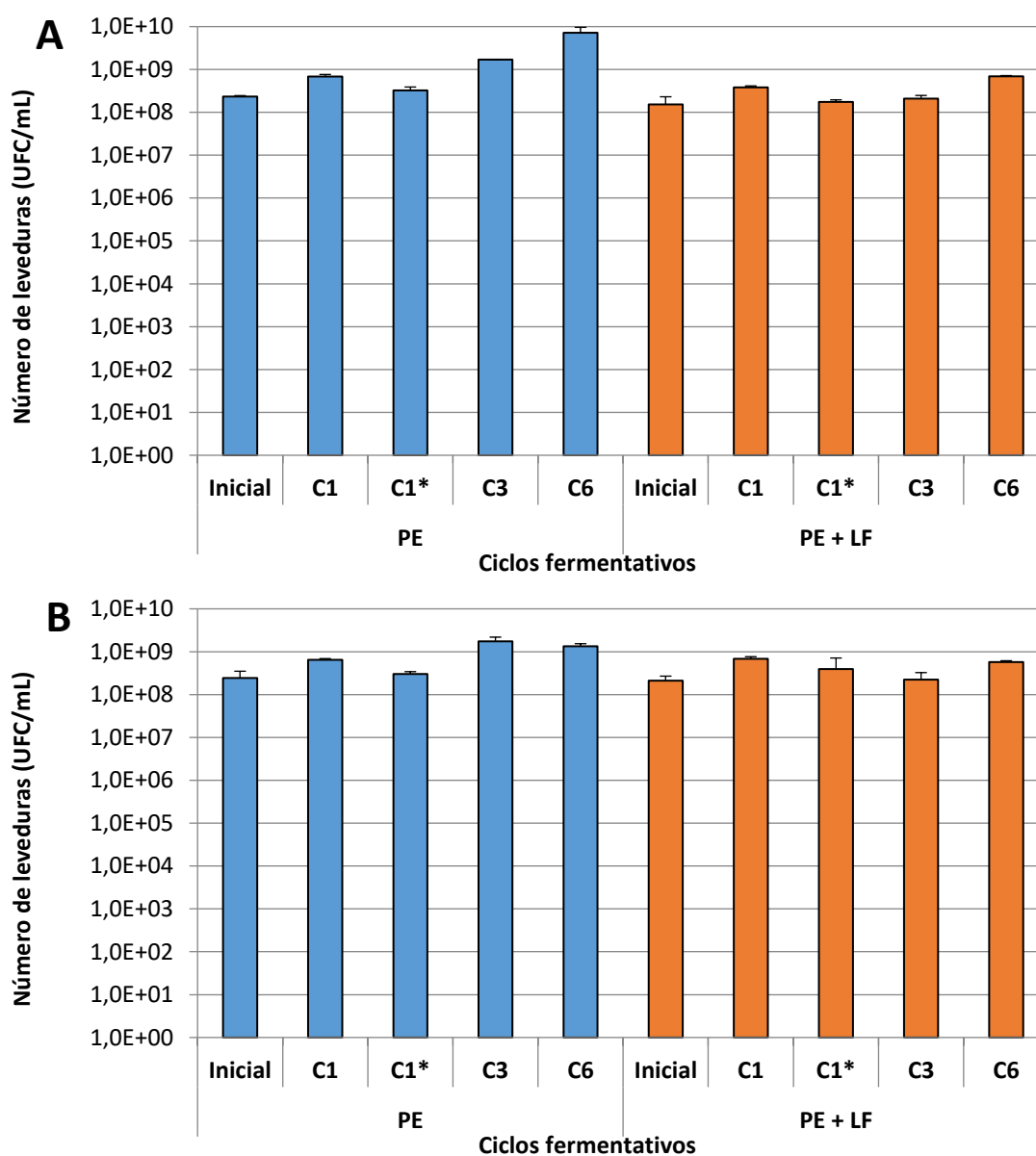
4.2.1 Análises microbiológicas

Os resultados apresentados na Figura 2A e 2B e Tabela 1 mostraram que na fermentação conduzida somente com a levedura PE-2, houve crescimento da levedura no decorrer dos ciclos fermentativos, em ambas as situações – com adição de etanol ($1,39 \times 10^9$ UFC/mL) e sem adição de etanol ao tratamento ácido ($6,13 \times 10^9$ UFC/mL), nota-se que houve um efeito do etanol sobre o crescimento das leveduras.

Verificou-se que ao final do primeiro ciclo de fermentação, após o tratamento, houve uma diminuição no número de UFC da levedura, no tratamento sem adição de etanol houve uma queda do final do primeiro ciclo fermentativo ($6,87 \times 10^8$ UFC/mL) para $3,25 \times 10^8$ UFC/mL após o primeiro tratamento. No tratamento com adição de etanol as leveduras também apresentaram os mesmos comportamentos, sendo que ao final do primeiro ciclo fermentativo a levedura apresentou um crescimento de $6,43 \times 10^8$ UFC/mL tendo uma queda para $3,03 \times 10^8$ UFC/mL ao final do primeiro tratamento.

Nas fermentações contaminadas com a bactéria *L. fermentum*, a evolução do crescimento da levedura foi menor que nas fermentações sem a bactéria, independentemente da adição de etanol ($5,73 \times 10^8$ UFC/mL) ao tratamento ácido ($6,29 \times 10^8$ UFC/mL). Houve um efeito da adição de etanol sobre o crescimento da levedura, porém o efeito foi menor na fermentação contaminada.

Figura 2. Número de leveduras (UFC/mL) nas fermentações desenvolvidas em caldo de cana, com a cultura pura de *S. cerevisiae* (PE) e contaminada com *L. fermentum* (PE+LF), ao longo de seis ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, em sistema de batelada alimentada com reciclo celular e tratamento ácido sem adição de etanol (A) e com adição de 5% de etanol (B). Legenda: 'Inicial'= início do 1º. ciclo fermentativo; '*'= após o tratamento das células; nos demais, as contagens se referem ao final do ciclo fermentativo, antes do tratamento das células.



Para melhor avaliar o efeito do tratamento ácido sobre a linhagem industrial PE-2, os resultados expressos na Tabela 1 devem ser comparados com os resultados do crescimento da levedura em fermentação com reciclo celular sem tratamento ácido (Tabela 1, Capítulo 1). Houve uma variação logarítmica de 1,15 do crescimento da levedura sem o emprego do tratamento ácido, enquanto essa

variação foi de 1,47 na presença do tratamento ácido. Portanto, não há influência negativa do tratamento ácido sobre a viabilidade da linhagem PE-2. Silva et al. (2015) avaliaram os efeitos fisiológicos da ação de diferentes tipos de ácidos utilizados nos tratamentos do fermento (ácido sulfúrico, nítrico e clorídrico) em pH 2,0, por um período de duas horas e com três ciclos celulares utilizando a linhagem industrial CAT-1. Os autores mostraram que o tratamento com ácido sulfúrico apresentou uma maior produção de biomassa, se mantendo pelos três ciclos fermentativos.

Reis (2016) analisou os efeitos de tratamentos das células com ácido sulfúrico em pH 1,0, 1,5 e 2,0, em sistema com ciclo celular utilizando a levedura industrial PE-2. Os dados mostraram que o tratamento ácido com pH 2,0 não afetou o crescimento celular das leveduras industriais, tendo até um aumento significativo no número de UFC ao final dos ciclos fermentativos.

Tabela 1. Variação logarítmica (média e desvio-padrão) do crescimento de *S. cerevisiae* (PE) em fermentação não contaminada e contaminada com *L. fermentum* (PE + LF) em sistema de batelada alimentada com ciclo celular e tratamento ácido com e sem adição de 5% de etanol.

Cultivo	Tratamento ácido	
	Sem adição de etanol	Com adição de 5% etanol
PE	1,47 ± 0,15	0,76 ± 0,17
PE + LF	0,69 ± 0,22	0,44 ± 0,15

¹Considerou-se a variação do número de UFC/mL ao final do 6º. ciclo em relação ao inicial

Em relação ao efeito do etanol sobre o crescimento das leveduras quando adicionado ao tratamento ácido, pode-se relacionar ao estresse etanólico das células de leveduras. O etanol causa a inibição do crescimento e viabilidade celular por atuar negativamente sobre os sistemas de transportes (incluindo permease de aminoácidos), sobre a sinalização celular da glicose e a atividade de enzimas chaves da via glicolítica (ALEXANDRE; CHARPENTIER, 1998). O etanol atua também na membrana citoplasmática das células de levedura alterando o grau de polaridade da membrana, prejudicando o crescimento das leveduras (LYND et al.,

1991; LLOYD et al., 1993; BASSO et al., 2011). Além de afetar o crescimento, o etanol pode afetar o metabolismo fermentativo uma vez que é capaz de inativar enzimas relacionadas à produção de etanol (BASSO et al., 2011).

Em relação ao crescimento de *L. fermentum*, os dados apresentados nas Figuras 3A e 3B e Tabela 2 mostraram que a adição de etanol ao tratamento ácido resultou numa redução maior no número de UFC da bactéria. Só com o tratamento ácido, a população bacteriana reduziu quase 3 ciclos log ao final do sexto ciclo fermentativo ($3,12 \times 10^7$ UFC/mL no início da fermentação reduzindo para $3,75 \times 10^4$ UFC/mL ao final do sexto ciclo), no entanto, quando se adicionou 5% de etanol à solução ácida, a bactéria perdeu completamente a viabilidade celular já ao final do primeiro ciclo fermentativo com o tratamento (Figura 3B).

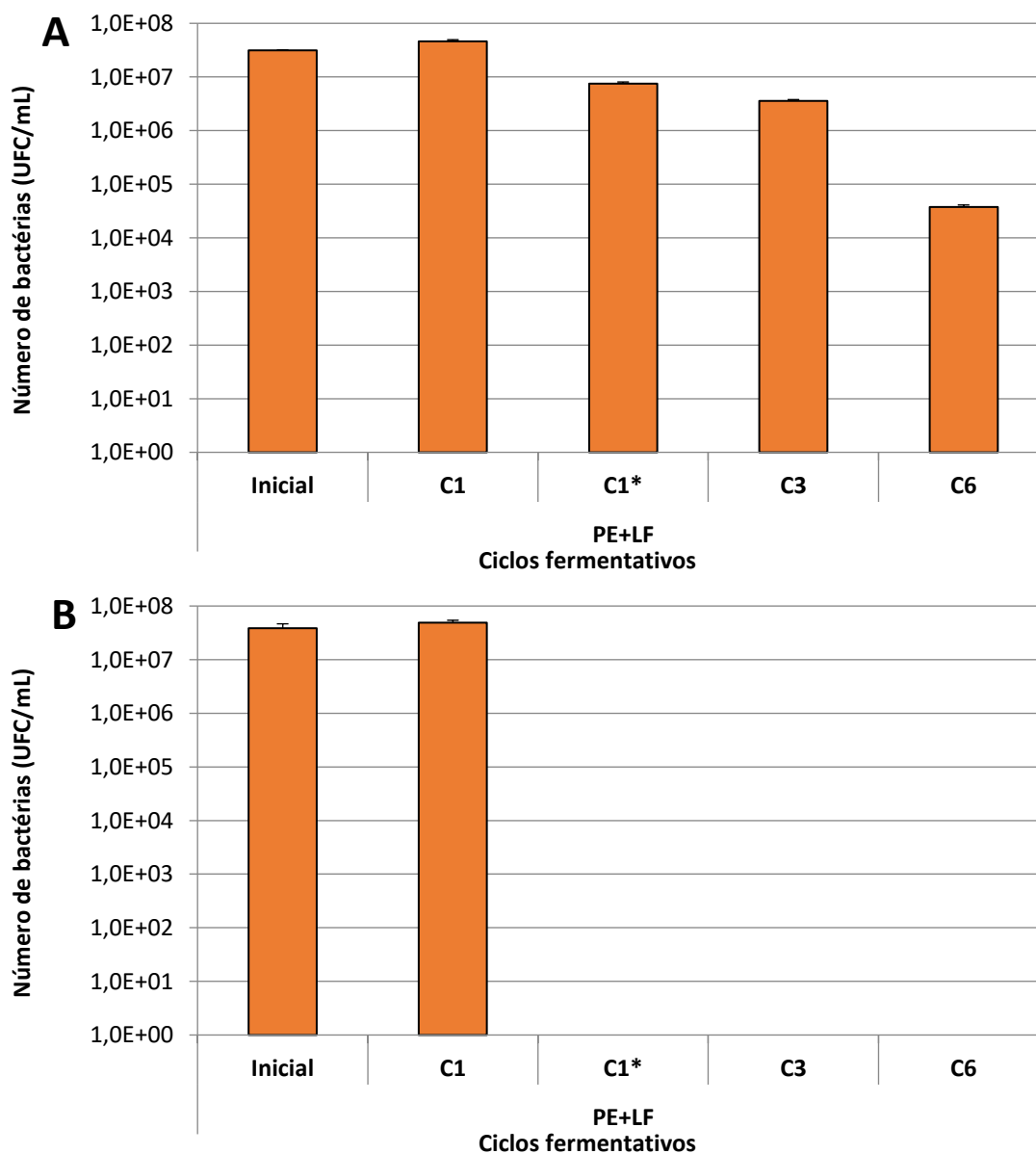
A perda completa da viabilidade de *L. fermentum* foi verificada anteriormente por Reis (2016) e Bassi (2016), ao analisar o efeito da adição de 13% de etanol ao tratamento ácido para o controle de leveduras contaminantes, em co-cultivo de *S. cerevisiae*, levedura contaminante (*S. cerevisiae* nativa ou *Dekkera bruxellensis*) e *L. fermentum*. No presente experimento, verificou-se que uma concentração muito menor de etanol causou o mesmo efeito.

Tabela 2. Variação logarítmica (média e desvio-padrão) do crescimento de *L. fermentum* (LF) em fermentação conduzida por *S. cerevisiae* em sistema de batelada alimentada com reciclo celular e tratamento ácido com e sem adição de 5% de etanol^{1,2}.

Cultivo	Tratamento ácido	
	Sem adição de etanol	Com adição de 5% etanol
PE + LF	-2,92 ± 0,04	-7,58 ± 0,09

¹Considerou-se a variação do número de UFC/mL ao final do 6º. ciclo em relação ao inicial; ² Valor negativo refere-se à diminuição no número de UFC

Figura 3. Número de bactérias (UFC/mL) nas fermentações desenvolvidas em caldo de cana com *S. cerevisiae* ao longo de seis ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, em sistema de batelada alimentada com reciclo celular e tratamento ácido sem adição de etanol (A) e com adição de 5% de etanol (B). Legenda: 'Inicial'= início do 1º. ciclo fermentativo; '*'= após o tratamento das células; nos demais, as contagens se referem ao final do ciclo fermentativo, antes do tratamento das células.



Ceballos-Schiavone (2009) verificou que em pH 2,5, concentração de 20% v/v de etanol e 90 minutos de tratamento, a contagem de *Lactobacillus* foi próxima de zero (36 UFC/mL), chegando a zero em 120 minutos de tratamento. Nos experimentos aqui realizados, a contagem chegou a zero com 5% de etanol em

solução ácida pH 2,0, em 120 minutos de tratamento, ou seja, uma concentração 4 vezes inferior àquela utilizada por Ceballos-Schiavone (2009), com o mesmo efeito.

A fim de avaliar o efeito individual do tratamento ácido sobre o crescimento de *L. fermentum*, pode-se comparar a variação logarítmica de crescimento da bactéria em fermentação em batelada alimentada com reciclo celular sem tratamento ácido (Capítulo 1, Tabela 2) com os resultados aqui obtidos. Sem tratamento ácido, *L. fermentum* teve uma variação logarítmica de crescimento da ordem de 1,07, enquanto nos tratamentos ácidos sem e com adição de 5% de etanol, a bactéria teve redução no número de UFC (de 2,92 a 7,58 ciclos log), chegando à perda total da viabilidade com a adição de 5% de etanol. Esse resultado demonstra a importância do tratamento ácido para o controle da contaminação bacteriana sem afetar o desenvolvimento da levedura industrial do processo, uma vez que não houve redução do número de UFC da linhagem PE-2 em quaisquer dos tratamentos utilizados.

4.2 Análises físico-químicas

A análise de variância dos valores de pH do caldo de cana após cada ciclo de fermentação mostrou que houve diferença significativa entre os cultivos, entre os tratamentos celulares e entre os ciclos fermentativos, isoladamente. Houve interação entre esses parâmetros de forma que dependendo do tipo de cultivo (contaminado ou não com bactéria), do tipo de tratamento ácido (sem ou com 5% de etanol) e dos ciclos fermentativos, houve uma resposta diferente quanto ao pH da fermentação (Tabela 3). No entanto, não houve interação tripla significativa, entre os três parâmetros (Cultivo x Tratamento Celular x Ciclos fermentativos).

Tabela 3. Análise de variância dos valores de pH nas fermentações desenvolvidas em caldo de cana, com a cultura pura de *S. cerevisiae* e contaminada com *L. fermentum*, ao longo de seis ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, em sistema de batelada alimentada com reciclo celular e tratamento ácido sem adição de etanol e com adição de 5% de etanol.

Causa de variação	SQ	GL	QM	F
Cultivo	0,79380	1	0,79380	210,9767 **
Tratamento Celular	0,15309	1	0,15309	40,6881 **
Ciclos Fermentativos	0,67657	5	0,13531	35,9637 **
Cultivo X Trat. Celular	0,09534	1	0,09534	25,3392 **
Cultivo X Ciclos	0,08488	5	0,01698	4,5121 **
Trat. Celular X Ciclos	0,13926	5	0,02785	7,4026 **
Cultivo X Trat. Celular X Ciclos	0,02741	5	0,00548	1,4571 ns
Tratamentos	1,97035	23	0,08567	22,7687 **
Resíduo	0,18060	48	0,00376	
Total	2,15095	71		

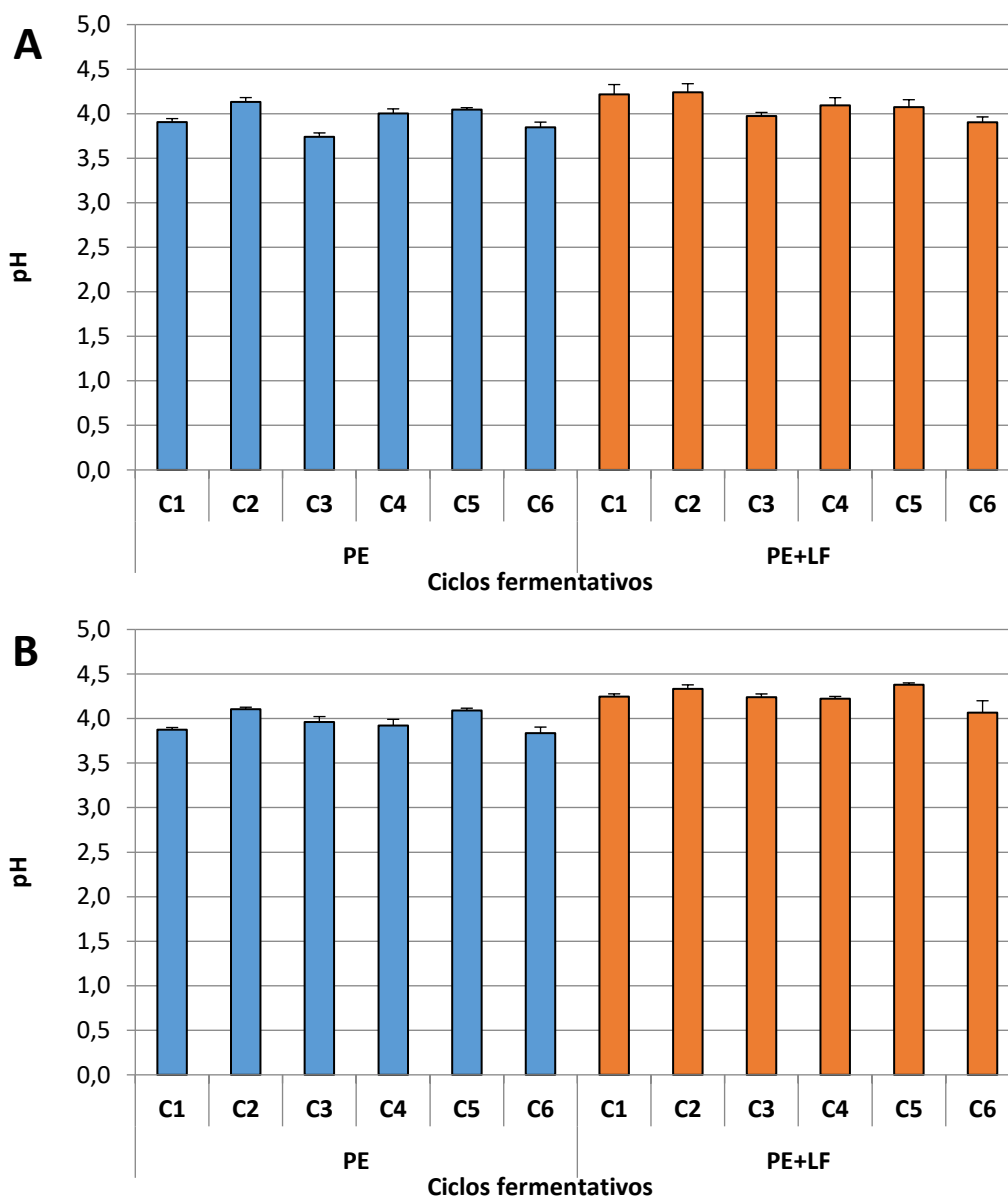
** = significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

* = significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$)

ns= não significativo ($p \geq 0,05$)

Em relação ao pH da fermentação, verificou-se que a fermentação que continha somente a levedura PE-2 apresentou menores valores de pH (3,74 no terceiro ciclo no tratamento sem etanol; 3,83 no sexto ciclo no tratamento com adição de etanol), independentemente do tipo de tratamento celular realizado no sexto ciclo fermentativo (Figura 4A e 4B).

Figura 4. Valor de pH do caldo de cana nas fermentações desenvolvidas com *S. cerevisiae* (PE) e *L. fermentum* (PE+LF) ao longo de seis ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, pH inicial 4,5, em sistema de batelada alimentada com reciclo celular e tratamento ácido sem adição de etanol (A) e com adição de 5% de etanol (B).



Os resultados de análise da variância (Tabela 4) mostram a influência dos fatores isoladamente e a interação entre eles sobre a produção de etanol nas fermentações, de forma que para cada tipo de tratamento, há uma resposta quanto à produção de etanol, que está na dependência do tipo de cultivo (contaminado ou não com *L. fermentum*), dos ciclos fermentativos e do tipo de tratamento celular.

Tabela 4. Análise de variância da produção de etanol nas fermentações desenvolvidas em caldo de cana, com a cultura pura de *S. cerevisiae* e contaminada com *L. fermentum*, ao longo de seis ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, em sistema de batelada alimentada com reciclo celular e tratamento ácido sem adição de etanol e com adição de 5% de etanol.

Causa de variação	SQ	GL	QM	F
Cultivo	2,17361	1	2,17361	75,2187 **
Tratamento Celular	7,39201	1	7,39201	255.8036 **
Ciclos Fermentativos	49,29188	5	9,85838	341,1531 **
Cultivo X Trat. Celular	1,42523	1	1,42523	49,3208 **
Cultivo X Ciclos	3,03561	5	0,60712	21,0097 **
Trat. Celular X Ciclos	2,53135	5	0,50627	17,5196 **
Cultivo X Trat. Celular X Ciclos	1,20412	5	0,24082	8,3338 **
Tratamentos	67,05382	23	2,91538	100,8880 **
Resíduo	1,38707	48	0,02890	
Total	68,44089	71		

** = significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

* = significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$)

ns= não significativo ($p \geq 0,05$)

Em relação à produção de etanol, não houve alteração nos valores observados na fermentação contaminada com *L. fermentum*, comparando-se os tratamentos celulares com adição de etanol e sem adição de etanol, conforme apresentado na figura 5. Na fermentação não contaminada, a produção de etanol foi menor quando se utilizou o tratamento ácido adicionado de 5% de etanol (3,46 g/100mL) quando comparado ao tratamento sem adição de etanol (4,93 g/100mL) no sexto ciclo fermentativo, o que leva a suposição que deve haver um comprometimento do metabolismo fermentativo da linhagem PE-2 devido à adição de etanol no tratamento ácido, porém isso foi aliviado/minimizado na fermentação contaminada visto que no tratamento com adição de etanol a produção de etanol foi de 4,48 g/100mL, enquanto que no tratamento que não houve adição de etanol a produção foi de 4,37 g/100mL, em que a bactéria foi morta pelo tratamento ácido + etanol. Se esse efeito não tivesse ocorrido, se esperaria uma diminuição na

produção de etanol na fermentação contaminada onde se utilizou o tratamento ácido + etanol, o que não aconteceu.

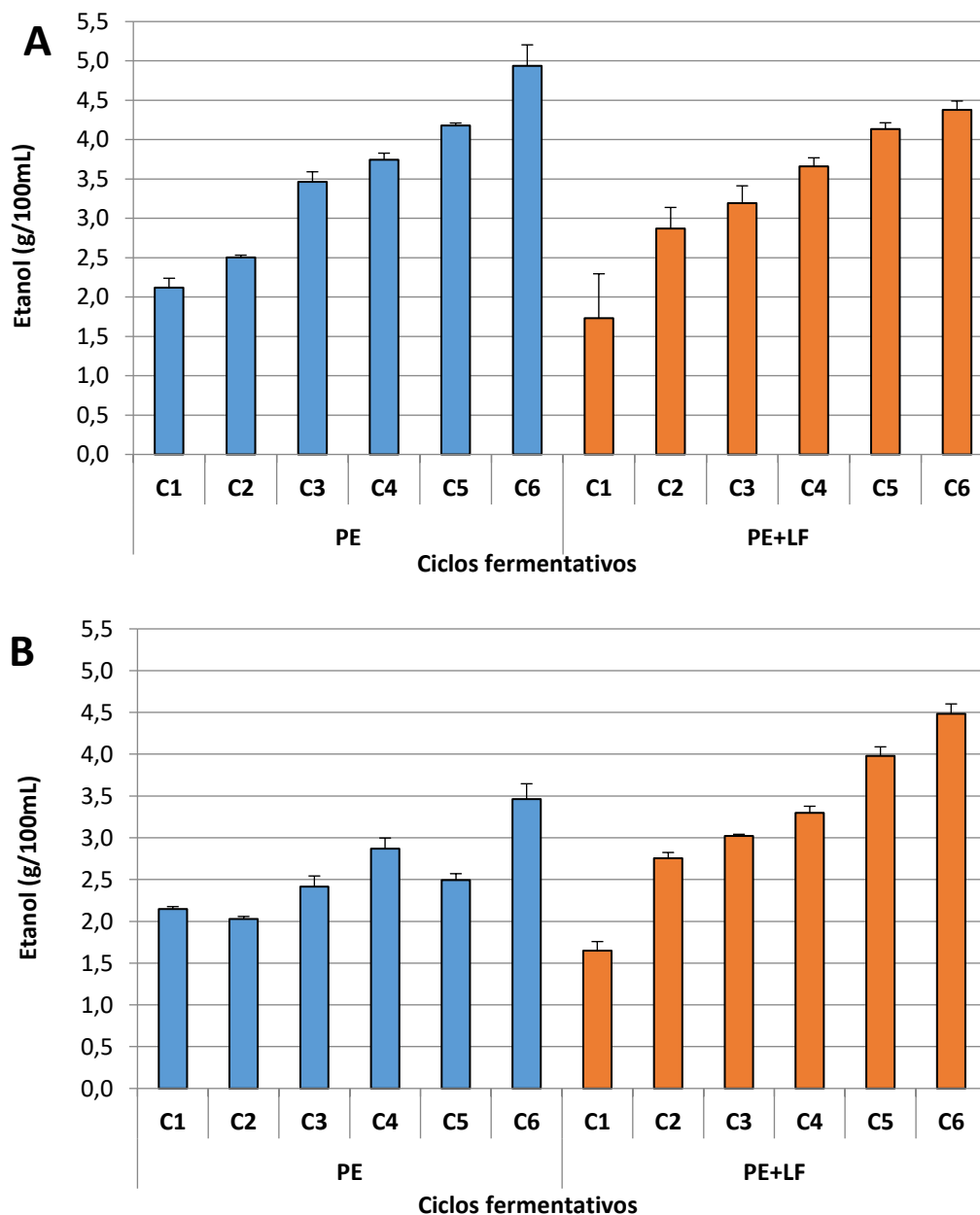
Mesmo utilizando os tratamentos celulares, a produção de etanol nas fermentações contaminadas foi menor que a observada na fermentação não contaminada, a qual foi de 4,9 g/100 mL ao final do sexto ciclo fermentativo, tanto na ausência quanto na presença do tratamento ácido (Figura 5; Capítulo 1, Figura 4).

Em relação aos valores obtidos na fermentação em batelada alimentada com reciclo celular e sem tratamento celular (Capítulo 1, Figura 4), também não houve diferença quanto aos valores de etanol (variou de 1,15 a 4,40) na fermentação contaminada. Assim, pode-se concluir que o número de UFC/mL de *L. fermentum* variando de 10^7 a 10^8 (sem tratamento celular), ou a redução no número de UFC/mL de cerca de 3 ciclos log (tratamento ácido sem a adição de etanol) ou a perda total de viabilidade da bactéria (tratamento ácido com a adição de etanol) tiveram o mesmo efeito sobre a produção de etanol na fermentação conduzida pela linhagem industrial PE-2 e contaminada com essa bactéria. Ou seja, o metabolismo fermentativo da linhagem PE-2 não foi afetado por nenhum dos tratamentos ou pela ausência deles em uma situação de contaminação com *L. fermentum* na concentração inicial de 10^7 UFC/mL. Há de se ressaltar que a bactéria *L. fermentum* não produziu etanol em um sistema de batelada simples com reciclo celular e sem tratamento celular, em cultivo puro (dados não publicados).

A adição de 13% de etanol no tratamento ácido teve efeito sobre a produção de etanol na fermentação com a linhagem PE-2 contaminada com uma levedura nativa *S. cerevisiae* e *L. fermentum* e mesmo na fermentação não contaminada (REIS, 2016). Embora a concentração de etanol no tratamento ácido tenha sido diminuída para 5%, ainda assim observou-se efeito sobre a capacidade fermentativa da linhagem PE-2, embora isso não tenha acontecido na fermentação contaminada por motivo a ser melhor investigado.

Quanto ao ART residual, foi verificado que não há interação entre o tipo de tratamento celular (ácido + etanol ou somente ácido) e o tipo de cultivo utilizado, porém quando analisados os três fatores em conjunto (tratamento celular, cultivos e ciclos fermentativos), a Tabela 5 mostra que há interação significativa mostrando que para cada tipo de tratamento celular utilizado há uma resposta quanto à quantidade de açúcar redutor total residual, que está na dependência do tipo de cultivo (contaminado ou não com bactérias) e dos ciclos fermentativos (Tabela 5).

Figura 5. Produção de etanol nas fermentações desenvolvidas com *S. cerevisiae* (PE) e *L. fermentum* (PE+LF) ao longo de seis ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, pH inicial 4,5, em sistema de batelada alimentada com reciclo celular e tratamento ácido sem adição de etanol (A) e com adição de 5% de etanol (B).



Observou-se um aumento na concentração de ART residual na fermentação não contaminada com a adição de 5% de etanol (5,58 g/100mL) ao tratamento ácido (4,0 g/100mL), enquanto que na fermentação contaminada com a bactéria houve uma diminuição nos valores para o tratamento com adição de etanol (4,11 g/100mL), comparado ao tratamento que não houve etanol (4,73 g/100mL), conforme

apresentado na Figura 6. Comparando-se com os valores obtidos na fermentação sem tratamento celular (Capítulo 1, Figura 5), o uso do tratamento ácido (com ou sem etanol) resultou em maior consumo de ART, ou seja, menor concentração de ART residual no meio de fermentação na situação de contaminação por *L. fermentum*. Para a fermentação não contaminada, houve um aumento na concentração de ART residual com o uso dos tratamentos celulares.

Tabela 5. Análise de variância dos valores de ART residual nas fermentações desenvolvidas em caldo de cana nas fermentações desenvolvidas com *S. cerevisiae* (PE) e *L. fermentum* (PE+LF) ao longo de seis ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, pH inicial 4,5, em sistema de batelada alimentada com reciclo celular e tratamento ácido sem adição de etanol e com adição de 5% de etanol.

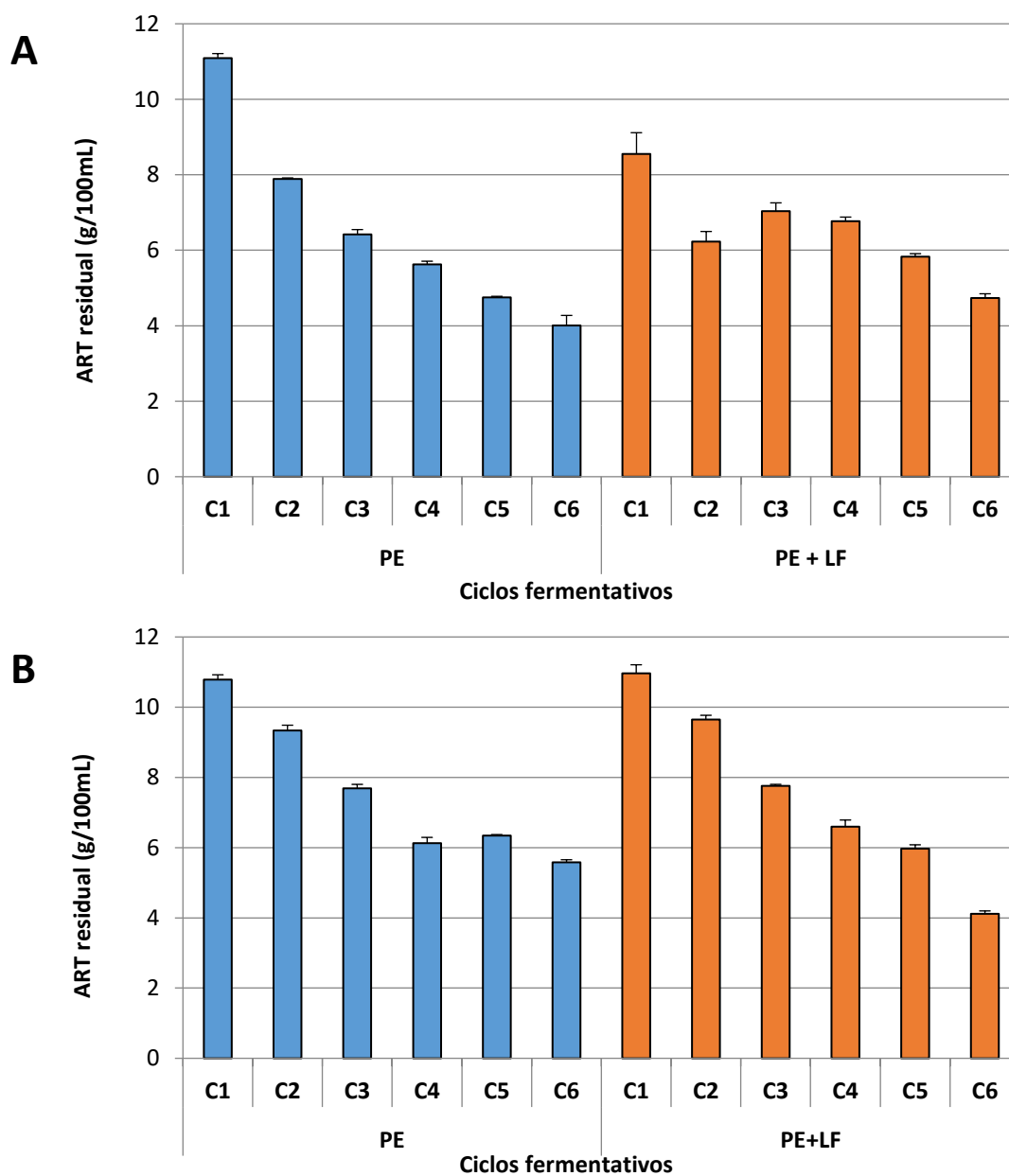
Causa de variação	SQ	GL	QM	F
Cultivo	25,54933	1	25,54933	13,1652 **
Tratamento Celular	1794,90361	1	1794,90361	924,8882 **
Ciclos Fermentativos	24858,13802	5	4971,62760	2561,8088 **
Cultivo X Trat. Celular	0,37411	1	0,37411	0,1928 ns
Cultivo X Ciclos	837,61999	5	167,52400	86,3227 **
Trat. Celular X Ciclos	916,60101	5	183,32020	94,4623 **
Cultivo X Trat. Celular X Ciclos	1419,87969	5	283,97594	146,3287 **
Tratamentos	29853,06577	23	1297,95938	668,8200 **
Resíduo	93,15220	48	1,94067	
Total	29946,21797	71		

** = significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

* = significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$)

ns= não significativo ($p \geq 0,05$)

Figura 6. ART residual nas fermentações desenvolvidas em caldo de cana, com a cultura pura de *S. cerevisiae* (PE) e contaminadas com *L. fermentum* (PE+LF), ao longo de seis ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, pH inicial 4,5, em sistema de batelada alimentada com tratamento celular com solução ácida (A) e solução ácida com 5% de etanol (B). ART inicial= 17,7 g/100 mL.

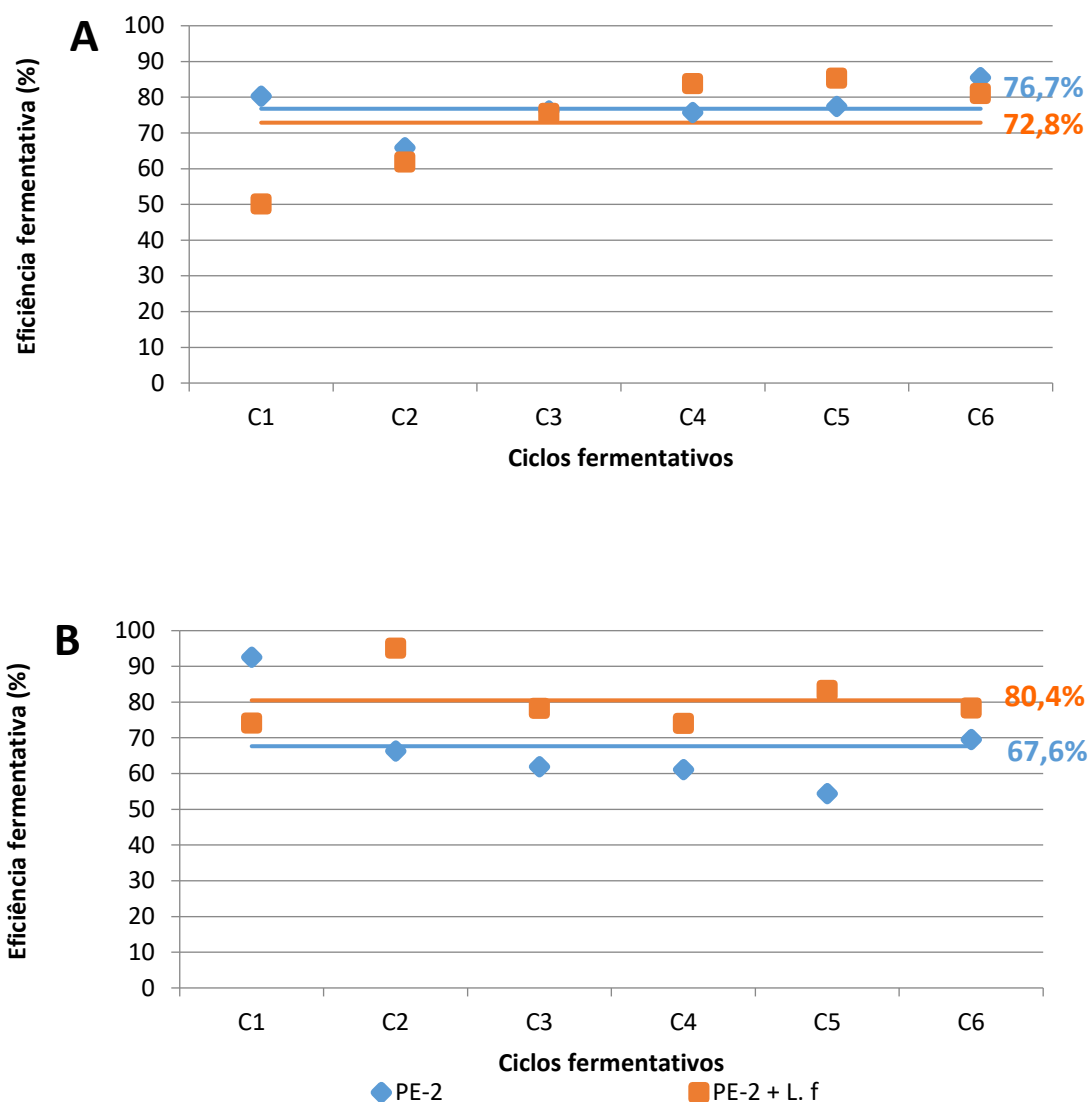


Avaliando-se os resultados de eficiência fermentativa, ou seja, a capacidade de conversão de açúcares em etanol em relação ao rendimento teórico (0,51g etanol/g de açúcar), observou-se que a fermentação contaminada com a bactéria no tratamento com adição de etanol apresentou a maior média da eficiência fermentativa (80,4%), seguido pela fermentação somente com a levedura no

tratamento sem adição de etanol (76,7%). A fermentação que houve a menor eficiência fermentativa foi a fermentação somente com a levedura no tratamento com adição de etanol. Embora a fermentação somente com a levedura no tratamento com adição de etanol tenha apresentado uma menor eficiência fermentativa (67,6%), esta fermentação ainda foi superior quando comparado a fermentação na qual não tinha nenhum tipo de tratamento no sistema de batelada alimentada na qual apresentou uma eficiência fermentativa de 63,9%. Quando analisado a fermentação contaminada com a bactéria a eficiência fermentativa foi muito superior utilizando o tratamento ácido + 5% de etanol (80,4%), em relação ao tratamento sem adição de etanol (72,8%) e especialmente em relação à fermentação realizada sem tratamento celular na qual apresentou uma eficiência fermentativa de 57% (Capítulo 1, Figura 6).

O valor de eficiência (80%) na fermentação contaminada com *L. fermentum* foi similar ao obtido na fermentação não contaminada e submetida ao tratamento ácido sem adição de etanol (77%). Esse resultado mostra que o tratamento ácido + 5% de etanol é capaz de reduzir a população das bactérias *L. fermentum* sem causar impacto à eficiência fermentativa, e com uma concentração de ART residual baixa (cerca de 4 g/100 mL), ao final de 6 ciclos fermentativos de 9 horas, em sistema de batelada alimentada. Houve um aumento de 7 pontos percentuais na eficiência ao se comparar com a fermentação com tratamento ácido sem etanol, o que é significativo considerando-se o volume e teor alcoólico do mosto. Uma diferença de 3,1 pontos percentuais na eficiência fermentativa pode significar uma variação de 2,1 milhões de litros de etanol por safra em uma destilaria de média capacidade (BASSO et al., 2008).

Figura 7. Eficiência fermentativa (%) das fermentações desenvolvidas em caldo de cana, com a cultura pura de *S. cerevisiae* (PE) e contaminada com *L. fermentum* (PE+LF), ao longo de seis ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, pH inicial 4,5, em sistema de batelada alimentada com tratamento celular com solução ácida (A) e solução ácida com 5% de etanol (B). As linhas horizontais e os números em porcentagem indicam o valor médio de eficiência de cada fermentação.



Os experimentos foram realizados empregando-se o tratamento ácido + 5% de etanol ao final de todos os ciclos fermentativos, ainda que a bactéria *L. fermentum* tenha perdido totalmente a viabilidade após o primeiro ciclo de tratamento. Esse tratamento seria desnecessário após o segundo ciclo de fermentação, uma vez que a fermentação não tinha mais células vivas de *L. fermentum* e assim, os parâmetros fermentativos e a viabilidade da levedura industrial poderiam ser melhorados, uma vez que o etanol mesmo na concentração de 5% acaba por acarretar certo prejuízo ao metabolismo da levedura. Desta forma, acredita-se que um ciclo somente de tratamento ácido + 5% de etanol seria necessário para o controle da contaminação por *L. fermentum*, sendo os demais ciclos fermentativos à base somente de ácido sulfúrico, cujo tratamento foi bem benéfico para a linhagem PE-2 em todos os aspectos.

5 Conclusões

O sistema de fermentação – batelada simples ou batelada alimentada – afetou os parâmetros fermentativos nas fermentações contaminadas com as bactérias *Lactobacillus*.

Em sistema de batelada alimentada, verificou-se maior produção de etanol, maior eficiência fermentativa e maior variação logarítmica de crescimento da levedura. A bactéria *L. fermentum* foi mais prejudicial à fermentação do que *L. plantarum*, resultando em maior sobra de açúcar no meio fermentado e menor eficiência fermentativa, nos dois sistemas.

O efeito das contaminações no sistema de batelada simples foi maior do que no sistema de batelada com alimentação especialmente pelo fato de a alimentação permitir um maior desenvolvimento da levedura, que pode assim competir em melhor condição com a bactéria contaminante.

6 Literatura Citada

ALEXANDRE, H.; CHARPENTIER, C. Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 20-27, 1998.

- AMORIM, H. V. **Introdução à bioquímica da fermentação alcoólica**. Araras: IAA/Cordenadoria Regional Sul, 1997.
- AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; LOPES, M. L. Sugar cane juice and molasses, beet molasses and sweet sorghum: composition and usage. In: INGLEDEW, W. M.; KELSALL, A. G. D.; KLUHSPIES, C. (Ed.). **The alcohol textbook**. 5th ed. Nottingham: Nottingham University Press, p. 39-46, 2009.
- 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.
- BASSI, A. P. G. **Avaliação da contaminação conjunta de *Dekkera bruxellensis* e *Lactobacillus fermentum* sobre a fermentação alcoólica: efeito do substrato e formas de controle**. 2016. 117 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, Brasil, 2016.
- BASSI, A. P. G.; SILVA, J. C. G.; REIS, V. R.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Effects of single and combined cell treatments based on low pH and high concentrations of ethanol on the growth and fermentation of *Dekkera bruxellensis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 1661-1676, 2013.
- BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1155–1163, 2008.
- BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: BERNARDES, M. A. S. (Ed). **Biofuel production-recent developments and prospects**. Rijeka: InTech, 2011, p. 85-100.

- BAYROCK, D. P.; INGLEDEW, W. M. Inhibition of yeast by lactic acid bacteria in continuous culture: nutrient depletion and or acid toxicity? **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 362–368, 2004.
- BERTRAND, E.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R.; SIGOILLOT, J. C.; FAULDS, C. First generation bioethanol. In: SOCCOL, C. R.; BRAR, S. K.; FAULDS, C.; RAMOS, L.P. (Ed) **Green fuels technology**. Switzerland: Springer International Publishing, p. 175–212, 2016.
- BURTNER, C.; MURAKAMI, C. J.; KENNEDY, B. K.; KAEBERLEIN, M. A. A molecular mechanism of chronological aging in yeast. **Cell Cycle**, v. 8, n. 8, p. 1256-1270, 2009.
- CEBALLOS-SCHIAVONE, C. H. M. **Tratamento térmico do caldo de cana-de-açúcar visando a redução de contaminantes bacterianos - *Lactobacillus* na produção de etanol e eficiência de tratamento do fermento por etanol**. 2009. 177 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, Brasil, 2009.
- CECCATO-ANTONINI, S. R.; SILVA, D. F. Eficiência de meios diferenciais no isolamento de cepas de leveduras de processos industriais de fermentação alcoólica. **STAB**, v. 18, n. 4, p. 40-46, 2000.
- LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y.; Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 11, p. 641-649, 1981.
- LYND, L. R.; AHN, H. J.; ANDERSON, G.; HILL, P.; KERSEY, D. S.; KLAPATCH, T. Thermophilic ethanol production - investigation of ethanol yield and tolerance in continuous culture. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 28, n. 29, p. 549-569, 1991.

- LLOYD, D.; MORELL, S.; CARLSEN, H. N.; DEGN, H.; JAMES, P. E.; TOWLANDS, C. C. Effects of growth with ethanol on fermentation and membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 9, n. 8, p. 825-833, 1993.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n.3, p. 426–428, 1959.
- MONCEAUX, D. A. Alternative feedstocks for fuel ethanol production. In: INGLEDEW, W. M.; KELSALL, D. R.; AUSTIN, G. D.; KLUHSPIES, C. (Ed) **The alcohol textbook. A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries**. 5th ed. Nottingham: Nottingham University Press, p. 47–57, 2009.
- OLIVA-NETO, P.; LIMA, F. A.; SILVA, K. C.; SILVA, D. F.; CARVALHO, A. F. A.; SANTOS, C. Chemical inhibition of the contaminant *Lactobacillus fermentum* from distilleries producing fuel bioethanol. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 3, p. 441-447, 2014.
- OLIVEIRA, M. C. F. L.; PAGNOCCA, F. C. Aplicabilidade de meios seletivos empregados na indústria cervejeira para a detecção de leveduras selvagens em unidades sucroalcooleiras. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 8., São Lourenço, 1988. **Anais**. São Lourenço: SINAFERM, p. 78-81, 1988.
- REIS, V. R. **Efeito do substrato e das condições de tratamento do fermento sobre a fermentação etanólica contaminada com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* selvagens e *Lactobacillus fermentum***. 2016. 141 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, Brasil, 2016.
- SILVA, R. S. S.; OLIVEIRA, P. A.; SILVA, E. R. S.; CARDOSO, C. A. L.; ERNANDES, J. R.; BATISTOTE, M. Effect of acid treatment in alcoholic fermentation. **Ciência e Natura**, v. 37, n. 1, p. 52-56, 2015.

WHEALS, A. E.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G.; AMORIM, H. V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Biotechnology**, v. 17, p. 482–487, 1999.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho permitiu concluir que o tipo de sistema de fermentação – batelada alimentada ou batelada simples – influenciou diretamente nos parâmetros fermentativos analisados. O sistema de fermentação também teve influência no desenvolvimento das bactérias analisadas, sendo que no sistema de batelada alimentada as bactérias *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus plantarum*, tiveram uma viabilidade celular menor do que no sistema de batelada simples. Isso se deve ao fato de que a alimentação do mosto favorece a levedura na competição pelo substrato presente no mosto. Das duas espécies analisadas, *Lactobacillus fermentum* foi mais prejudicial para a fermentação, sendo que houve uma menor produção de etanol, maior sobra de açúcar, menor eficiência fermentativa e foi mais prejudicial para o crescimento das leveduras.

Em relação ao tratamento celular no sistema de batelada alimentada, a solução ácida mostrou-se eficiente no controle da contaminação bacteriana, com uma queda de quase 3 ciclos log na viabilidade das bactérias, porém, com o tratamento proposto com adição de 5% de etanol ao tratamento ácido, a bactéria *L. fermentum* perdeu completamente a viabilidade celular já ao final do primeiro ciclo fermentativo. Outro ponto positivo do tratamento com a adição de 5% de etanol, foi que o tratamento não teve impacto à eficiência fermentativa.

Os resultados do presente trabalho mostraram que o sistema de fermentação tem efeito sobre o desenvolvimento das contaminações por *Lactobacillus* e sobre a

levedura do processo, de forma que no sistema em batelada alimentada, o efeito da contaminação é diminuído. No caso de uma contaminação com *L. fermentum*, que se mostrou mais prejudicial que *L. plantarum*, a adição de 5% de etanol ao tratamento ácido em um ciclo de tratamento é capaz de matar todas as bactérias sem causar efeito à eficiência fermentativa, o que sem dúvida, é uma forma de controle bem interessante, uma vez que o etanol é um produto da indústria, e, portanto facilmente disponível e sem efeito residual sobre a biomassa de levedura ou problema ambiental, como é o caso de antibióticos e outros biocidas. Essa estratégia de adição de etanol ao tratamento ácido para o controle de crescimento de *L. fermentum* é uma proposta viável a ser apresentada à indústria.