



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

EMPREGO DO ETANOL COMO SUBSTITUTO OU ADJUVANTE DO ÁCIDO  
SULFÚRICO NO TRATAMENTO DAS CÉLULAS EM FERMENTAÇÃO  
ALCOÓLICA CONTAMINADA POR *Lactobacillus fermentum*

JOSÉ MACHADO DA SILVA NETO

Araras  
2019



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

**EMPREGO DO ETANOL COMO SUBSTITUTO OU ADJUVANTE DO ÁCIDO  
SULFÚRICO NO TRATAMENTO DAS CÉLULAS EM FERMENTAÇÃO  
ALCOÓLICA CONTAMINADA POR *Lactobacillus fermentum***

**JOSÉ MACHADO DA SILVA NETO**

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

2019

MACHADO DA SILVA NETO , JOSÉ

EMPREGO DO ETANOL COMO SUBSTITUTO OU ADJUVANTE DO  
ÁCIDO SULFÚRICO NO TRATAMENTO DAS CÉLULAS EM  
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA CONTAMINADA POR *Lactobacillus*  
*fermentum* / JOSÉ MACHADO DA SILVA NETO . -- 2019.

78 f. : 30 cm.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação)-Universidade Federal de São  
Carlos, campus Araras, Araras

Orientador: Profª. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini

Banca examinadora: Profª. Dra. Sabrina Gabardo, Profª. Dra. Sandra  
Helena da Cruz

Bibliografia

1. contaminação bacteriana. 2. *Lactobacillus fermentum*. 3. tratamento  
ácido. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Maria Helena Sachi do Amaral – CRB/8 7083



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

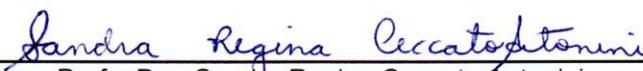
Centro de Ciências Agrárias  
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

---

### Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato José Machado da Silva Neto, realizada em 31/05/2019:



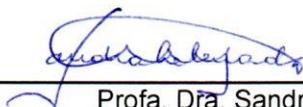
---

Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini  
UFSCar



---

Profa. Dra. Sabrina Gabardo  
UFSCar



---

Profa. Dra. Sandra Helena da Cruz  
ESALQ/USP

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus.

Ao pai Mauricio de Oliveira e mãe Lindinalva Machado, vocês são o motivo, e sem vocês o sonho não seria possível. À vocês dedico esse trabalho.

Ao Amauri Oliveira e Ana Paula Barros, Mauricio Junior e Valéria Menezes, irmãos e cunhadas, e irmã Vanessa Machado, obrigado pelo apoio. Aos meus sobrinhos, Geovana Karoline, Pedro Augusto, Antônio Carlos, João Lucas, Mauricio Neto, Davi Lucas, João Augusto, Maria Alice e ao (à) sobrinho (a) que está por vir, dedico esse trabalho, vocês foram minha maior saudade durante a estadia em Araras, os amo.

Aos meus amigos Carlos Eduardo, Carla Priscila e Amanda Aureliano, que nos momentos difíceis, mesmo de longe, foram presentes.

À Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini, minha professora, minha orientadora e inspiração diária na área acadêmica e na vida, sem a sua mentoria e apoio seria impossível a realização desse trabalho, meu muito obrigado.

À equipe do LAMAM, às professoras Dra. Silvana Perissatto Meneghin, Dra. Márcia Maria Rosa Magri e de maneira muito especial à técnica Lúcia Terezinha Picollo Silva, meu muito obrigado pela vivência, pelo bate-papo e carinho. A todos os colegas de laboratório, Aline Récco, Beatriz Rosa, Bianca Novaes, Ana Carolina Garcia e Caroline Ravagnani, meu muito obrigado pelo apoio e pelas risadas durante os dias de laboratório.

A todos os amigos da pós-graduação, em especial Ariane Bosqueiro, Elizabete Covre, Isabela Tanganini e Ligianne Din Shirahigue, pelas risadas e todos os conhecimentos compartilhados durante esses dois anos.

Agradeço à vida por ter me apresentado a Danessa Rafaella e a Nara Nobre, que por muitos dias foram apoio.

Meu muito obrigado ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados, aos docentes do programa e à UFSCar-CCA por todos os aprendizados e estrutura.

A todos que sempre acreditaram, sonharam e me deram forças para seguir em frente, agradeço.

**GRATIDÃO!**

## SUMÁRIO

	Página
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	i
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	ii
<b>RESUMO</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>OBJETIVOS</b> .....	04
<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	05
1 Fermentação alcoólica.....	05
2 Contaminação do processo fermentativo.....	07
3 Formas de controle do crescimento bacteriano.....	09
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	13
<b>CAPÍTULO 1. SUBSTITUIÇÃO PARCIAL E TOTAL DO ÁCIDO SULFÚRICO POR ETANOL NO TRATAMENTO DAS CÉLULAS EM FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA CONTAMINADA POR <i>Lactobacillus fermentum</i></b> .....	18
1 Resumo.....	18
2 Introdução.....	19
3 Materiais e Métodos.....	22
3.1 Micro-organismos .....	22
3.2 Preparação do inóculo bacteriano e de levedura.....	22
3.3 Efeito do etanol sobre o crescimento de <i>L. fermentum</i> .....	23
3.4 Otimização do valor de pH da solução ácida acrescida de 5% de etanol para controle de crescimento de <i>L. fermentum</i> .....	24
3.5 Otimização da concentração de etanol adicionado à solução ácida pH 3,0 para controle de crescimento de <i>L. fermentum</i> .....	25
3.6 Avaliação da substituição total do ácido sulfúrico por etanol para controle do crescimento de <i>L. fermentum</i> .....	25
3.7 Avaliação do tratamento celular selecionado sobre a fermentação em sistema de batelada com ciclo único.....	26
4 Resultados e Discussão.....	28

4.1	Efeito do etanol sobre o crescimento de <i>L. fermentum</i> .....	28
4.2	Otimização do valor de pH da solução ácida acrescida de 5% etanol para controle de crescimento de <i>L. fermentum</i> .....	31
4.3	Otimização da concentração de etanol adicionado à solução ácida pH 3,0 para controle de crescimento de <i>L. fermentum</i> .....	34
4.4	Avaliação da substituição total do ácido sulfúrico por etanol para controle do crescimento de <i>L. fermentum</i> .....	34
4.5	Avaliação do tratamento celular selecionado sobre a fermentação em sistema de batelada com ciclo único.....	38
5	Conclusões.....	40
6	Literatura citada.....	41
<b>CAPÍTULO 2. EFEITO DA ADIÇÃO DE ETANOL AO TRATAMENTO ÁCIDO PARA CONTROLE DO CRESCIMENTO DE <i>Lactobacillus fermentum</i> EM MOSTO NÃO ESTÉRIL</b> .....		45
1	Resumo.....	45
2	Introdução.....	46
3	Materiais e Métodos.....	48
3.1	Micro-organismos .....	48
3.2	Preparação do inóculo bacteriano e de levedura.....	48
3.3	Fermentação em batelada com caldo não estéril, reciclo celular e tratamento das células.....	49
3.4	Análises.....	50
3.4.1	Análises microbiológicas .....	51
3.4.2	Análises físico-químicas .....	51
3.4.3	Análise estatística.....	52
4	Resultados e Discussão.....	52
5	Conclusões.....	59
6	Literatura citada.....	59
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....		62
<b>APÊNDICE</b> .....		64

## ÍNDICE DE TABELAS

Página

### Capítulo 1

Tabela 1. Velocidade específica de crescimento máxima ( $h^{-1}$ ), duração da fase lag (h) e duração da fase exponencial (h) da bactéria *L. fermentum* em meio MRS acrescido de etanol em diferentes concentrações, utilizando-se a leitora de microplacas Tecan Infinite® M200, a 35°C, 160 rpm..... 30

Tabela 2. Volume de ácido sulfúrico concentrado adicionado a um litro de água destilada para o preparo da solução ácida nos valores de pH dos experimentos..... 32

### Capítulo 2

Tabela 1. Comparação entre médias de pH, teor alcoólico e de açúcar redutor total (ART) ao final do terceiro ciclo fermentativo nos diferentes tratamentos celulares utilizando o teste de Tukey ao nível de 5% de significância<sup>1</sup>..... 37

### APÊNDICE

Tabela 1. Análise de variância dos valores de pH do meio de fermentação ao final do 3º ciclo nas fermentações desenvolvidas com *S. cerevisiae* ao longo de três ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, pH inicial 5,7, em caldo de cana não estéril inoculado com *L. fermentum*, utilizando diferentes tratamentos das células ao final de cada ciclo de fermentação<sup>1</sup>..... 65

Tabela 2. Análise de variância dos valores de teor alcoólico (g/100 mL) do meio de fermentação ao final do 3º ciclo nas fermentações desenvolvidas com *S. cerevisiae* ao longo de três ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, pH inicial 5,7, em caldo de cana não estéril inoculado com *L. fermentum*, utilizando diferentes tratamentos das células ao final de cada ciclo de fermentação<sup>1</sup>..... 65

Tabela 3. Análise de variância dos valores de ART (g/100 mL) do meio de fermentação ao final do 3º ciclo nas fermentações desenvolvidas com *S. cerevisiae* ao longo de três ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, pH inicial 5,7, em caldo de cana não estéril inoculado com *L. fermentum*, utilizando diferentes tratamentos das células ao final de cada ciclo de fermentação<sup>1</sup>..... 66

## ÍNDICE DE FIGURAS

Página

### Revisão da Literatura

Figura 1. Esquema representativo das etapas de conversão de açúcares a etanol que ocorrem no citosol das células de leveduras.....	07
--	----

### Capítulo 1

Figura 1. Curvas de crescimento (ln absorbância x tempo) de <i>L. fermentum</i> em meio MRS acrescido de etanol em concentrações variando de 0 a 14% (v/v) obtidas a partir das leituras de absorbância a 540 nm utilizando-se a leitora de microplacas Tecan Infinite® M200, a 35°C, 160 rpm. O gráfico é a representação de uma das triplicatas.....	29
Figura 2. Número de <i>L. fermentum</i> (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 com pH 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 com adição de 5% etanol; com pH 2,0 e 3,0 sem adição de etanol; e com Kamoran® em pH 2,0.....	31
Figura 3. Redução logarítmica do número de UFC/mL de <i>L. fermentum</i> considerando-se o número inicial em relação ao número após o tratamento das células em solução ácida com pH 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 com adição de 5% etanol, e com pH 2,0, 3,0 sem adição de etanol e com Kamoran®.....	32
Figura 4. Número de <i>L. fermentum</i> (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 com pH 3,0 com a adição de 0, 5, 7, 9, 11, 15, 17, 20 e 22% de etanol.....	35
Figura 5. Redução logarítmica do número de UFC/mL de <i>L. fermentum</i> considerando-se o número inicial em relação ao número após o tratamento das células em solução ácida com pH 3,0 com a adição de 0, 5, 7, 9, 11, 15, 17, 20 e 22% de etanol.....	35
Figura 6. Número de <i>L. fermentum</i> (UFC/mL) determinado antes do tratamento (Inicial), após o tratamento e após o crescimento em caldo de cana da massa celular tratada com água sem e com adição de etanol, a 30°C, 160 rpm, por 2 horas.....	36
Figura 7. Redução logarítmica do número de UFC/mL de <i>L. fermentum</i> considerando-se o número inicial em relação ao número após o tratamento das células em água com e sem adição de etanol.....	37
Figura 8. Efeito do tratamento das células sobre o pH (A), açúcar redutor total residual – ART residual - e etanol (B) nas fermentações desenvolvidas em caldo de cana com cultura pura de <i>S. cerevisiae</i> e co-cultura de <i>S. cerevisiae</i>	

e *L. fermentum* em ciclo único de 9 horas, a 30°C, pH 5,5, 14,5 g ART inicial/100 mL, sem agitação. Tratamento das células: pH 2,0 (para a cultura pura de *S. cerevisiae* e co-cultura *S. cerevisiae* + *L. fermentum*); água e 22% etanol (para a co-cultura)..... 38

Figura 9. Efeito do tratamento das células no número de leveduras (A) e número de bactérias (B) nas fermentações desenvolvidas em caldo de cana com cultura pura de *S. cerevisiae* e co-cultura de *S. cerevisiae* e *L. fermentum* em ciclo único de 9 horas, a 30°C, pH 5,5, 14,5 g ART inicial/100 mL, sem agitação. Tratamento das células: pH 2,0 (para a cultura pura de *S. cerevisiae* e co-cultura *S. cerevisiae* + *L. fermentum*); água e 22% etanol (para a co-cultura)..... 39

## Capítulo 2

Figura 1. Número de leveduras (UFC/mL) nas fermentações desenvolvidas com *S. cerevisiae* ao longo de três ciclos fermentativos (C1 a C3) de 9 horas, a 30°C, pH inicial 5,7, em caldo de cana (13,1 g ART/100 mL) não estéril inoculado com *L. fermentum*, utilizando diferentes tratamentos das células ao final de cada ciclo de fermentação<sup>1</sup>. Concentração inicial de leveduras:  $1,1 \times 10^8$  UFC/mL..... 53

Figura 2. Número de bactérias (UFC/mL) nas fermentações desenvolvidas com *S. cerevisiae* ao longo de três ciclos fermentativos (C1 a C3) de 9 horas, a 30°C, pH inicial 5,7, em caldo de cana (13,1 g ART/100 mL) não estéril inoculado com *L. fermentum*, utilizando diferentes tratamentos das células ao final de cada ciclo de fermentação<sup>1</sup>. Concentração inicial de bactérias:  $7,0 \times 10^7$  UFC/mL..... 54

Figura 3. pH do caldo de cana nas fermentações desenvolvidas com *S. cerevisiae* ao longo de três ciclos fermentativos (C1 a C3) de 9 horas, a 30°C, pH inicial 5,7, em caldo de cana (13,1 g ART/100 mL) não estéril inoculado com *L. fermentum*, utilizando diferentes tratamentos das células ao final de cada ciclo de fermentação<sup>1</sup>..... 55

Figura 4. Açúcar redutor total – ART – e teor alcóolico (g/100 mL) nas fermentações desenvolvidas com *S. cerevisiae* ao longo de três ciclos fermentativos (C1 a C3) de 9 horas, a 30°C, pH inicial 5,7, em caldo de cana (13,1 g ART/100 mL) não estéril inoculado com *L. fermentum*, utilizando diferentes tratamentos das células ao final de cada ciclo de fermentação<sup>1</sup>..... 56

# EMPREGO DO ETANOL COMO SUBSTITUTO OU ADJUVANTE DO ÁCIDO SULFÚRICO NO TRATAMENTO DAS CÉLULAS EM FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA CONTAMINADA POR *Lactobacillus fermentum*

**Autor:** JOSÉ MACHADO DA SILVA NETO

**Orientador:** Profa. Dra. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI

## RESUMO

A contaminação bacteriana é um dos principais fatores que causa queda na eficiência fermentativa no processo de produção do bioetanol. Para o controle de contaminantes bacterianos, as indústrias brasileiras utilizam o tratamento ácido (solução de ácido sulfúrico pH 2,0) entre os ciclos fermentativos. Quando o tratamento ácido não é eficiente, são adicionados biocidas e antibióticos, o que resulta em aumento de custos e problemas relacionados à resistência aos antibióticos. Nesse contexto, o presente trabalho teve o objetivo inicialmente de avaliar o efeito do etanol sobre o crescimento da bactéria *Lactobacillus fermentum* em meio Man-Rogosa-Sharpe (MRS) e em seguida, avaliar o emprego do etanol como substituto ou adjuvante (que reforça a ação) do ácido sulfúrico no tratamento das células realizado na fermentação etanólica no controle do crescimento dessa bactéria. Foi também verificado o efeito do tratamento pH 2,0 + 5% etanol em alternância com o tratamento pH 2,0 em fermentação em batelada com ciclo celular conduzida em caldo não estéril com uma linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2) e contaminado com *L. fermentum*, avaliando o efeito sobre os micro-organismos e os parâmetros fermentativos. Houve diminuição da velocidade específica de crescimento máxima e aumento da fase lag de *L. fermentum* em meio de cultura com etanol em concentração de até 14% v/v. Em relação aos tratamentos celulares, houve perda total da viabilidade celular de *L. fermentum* nos tratamentos pH 2,0 + 5% etanol, pH 3,0 + 20% etanol e solução hidroalcoólica com 22% etanol. Houve inibição da produção de etanol, queda de dois ciclos log no número de *S. cerevisiae* e perda total de viabilidade de *L. fermentum* quando o tratamento celular foi realizado em solução hidroalcoólica com 22% etanol, o que torna esse tratamento inviável para emprego na indústria. A variação logarítmica do número de UFC/mL foi muito abaixo de 1 ciclo log até 15% de etanol assim como para os tratamentos com pH superior a 2,0 com e sem adição de etanol. A alternância dos tratamentos celulares pH 2,0 + 5% etanol e pH 2,0 sem adição de etanol durante os ciclos de fermentação foi eficiente quando não havia alta contaminação do mosto não estéril com *L. fermentum*, pois a perda da viabilidade dessa bactéria só foi possível com o tratamento pH 2,0 + 5% etanol. A levedura *S. cerevisiae* não foi afetada pelo emprego do tratamento pH 2,0 + 5% etanol e os maiores teores alcoólicos foram obtidos quando se adicionou o etanol no tratamento ácido. Conclui-se que o etanol é um adjuvante e não um substituto do ácido sulfúrico para o controle do crescimento da bactéria *L. fermentum*, apontando o tratamento pH 2,0 + 5% etanol como o mais econômico e eficiente.

**Palavras-chave:** contaminação bacteriana, *Lactobacillus fermentum*, mosto não estéril, tratamento ácido.

## UTILIZATION OF ETHANOL AS SUBSTITUTE OR ADJUVANT OF THE SULFURIC ACID IN THE CELL TREATMENT DURING ALCOHOLIC FERMENTATION CONTAMINATED BY *Lactobacillus fermentum*

**Author:** JOSÉ MACHADO DA SILVA NETO

**Adviser:** Prof Dr SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI

### ABSTRACT

Bacterial contamination is one of the major factors to cause decrease in the fermentative efficiency in the process of bioethanol production. To control the growth of bacterial contaminants, Brazilian industries utilize the acid treatment (sulfuric acid solution at pH 2.0) between the fermentative cycles. When the acid treatment is not effective, biocides and antibiotics are added which result in cost and antibiotic resistance in bacteria. In this context, this work aimed initially to evaluate the effect of ethanol on the growth of the bacterium *Lactobacillus fermentum* in Man-Rogosa-Sharpe (MRS) medium, following the evaluation of using ethanol as substitute or adjuvant (which enhances the action) of the sulfuric acid in the cell treatment during the alcoholic fermentation to control the growth of this bacterium. The effect of the treatment pH 2.0 + 5% ethanol switching with the treatment pH 2.0 in cell-recycled batch fermentation carried out in non-sterile must with an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2) and contaminated with *L. fermentum* was also verified. Fermentative parameters and the microorganism growth were determined. A decrease in the maximal specific growth rate and an increase in the lag phase of *L. fermentum* were observed in culture medium with ethanol up to the concentration of 14% v/v. Concerning the cell treatments, there was total loss of cell viability of *L. fermentum* in the treatments pH 2.0 + 5% ethanol, pH 3.0 + 20% ethanol and hydroalcoholic solution with 22% ethanol. Inhibition of ethanol production, decrease of two log cycles in the number of *S. cerevisiae* and total loss of cell viability of *L. fermentum* were observed when the cell treatment was carried out in the hydroalcoholic solution with 22% ethanol, then a non-viable treatment to be utilized in the industry. The logarithmic variation in the number of CFU/mL was much lower than 1 log cycle up to 15% ethanol as well as for the treatments with pH higher than 2.0 with or without ethanol. The switching of cell treatments pH 2.0 + 5% ethanol and pH 2.0 without addition of ethanol during the fermentative cycles was effective when the contamination of the non-sterile must with *L. fermentum* was not high, because the loss of cell viability of this bacterium was only possible with the treatment pH 2.0 + 5% ethanol. The yeast *S. cerevisiae* was not affected by the use of the treatment pH 2.0 + 5% ethanol and the highest alcoholic concentrations in the must were obtained when ethanol was added to the acid treatment. We conclude that the ethanol is an adjuvant and not a substitute of the sulfuric acid for the growth control of *L. fermentum*, standing out the cell treatment pH 2.0 + 5% ethanol as the most economic and effective.

**Key-words:** bacterial contamination, *Lactobacillus fermentum*, non-sterile must, acid treatment.

## INTRODUÇÃO

Com a instabilidade de preço, a disponibilidade dos compostos oriundos do petróleo e a sua associação às mudanças climáticas, o mundo tem se voltado para a adoção de políticas que reforcem o uso de fontes de energia de origem renovável. O etanol de cana-de-açúcar, com o avanço das tecnologias, tem se destacado como biocombustível de referência na matriz energética mundial.

O Brasil e os Estados Unidos são os principais produtores de etanol do mundo, embora os seus sistemas de produção difiram em muitos aspectos. Na América do Norte, o bioetanol é produzido principalmente a partir da hidrólise enzimática do amido do milho, enquanto o Brasil é o principal produtor de etanol a partir de cana-de-açúcar.

O setor sucroenergético possui um sistema complexo que utiliza como matéria prima a cana-de-açúcar, uma gramínea tropical que acumula sacarose, a qual é convertida em etanol sem pré-tratamento enzimático pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* diretamente. A transformação de carboidratos em etanol é denominada fermentação etanólica e as leveduras têm o papel mais importante nesse processo bioquímico. Durante o processo fermentativo ocorre a sucessão das leveduras *starters* por leveduras selvagens (ou nativas) e essas cepas tendem a ser mais adaptadas ao processo. Essas são isoladas e utilizadas como inóculo para as próximas safras, constituindo as chamadas leveduras personalizadas. Essas

leveduras são capazes de resistir às altas condições de estresse, como alta pressão osmótica, alta concentração de etanol e altas temperaturas. Dentre essas estão, a PE-2 e CAT-1, leveduras do mercado, responsáveis pela maior parte da produção de etanol brasileiro.

O mosto para a fermentação no Brasil também se caracteriza por ser não estéril e sofrer grandes perdas por contaminação bacteriana no processo. Essas bactérias consomem os açúcares e produzem subprodutos que não são de interesse para a indústria, causando assim perdas na produção de etanol pelo efeito inibitório sobre as leveduras, além de floculação e redução da eficiência fermentativa, ocasionando prejuízo financeiro as destilarias.

A contaminação bacteriana do mosto pode ter origem no campo, na cana-de-açúcar, na diluição do mosto e nos equipamentos do processo. As condições do processo, a maneira pela qual é conduzido e os grandes volumes de substratos que são processados dificultam a assepsia. Os gêneros mais abundantes são na maioria *Lactobacillus* e *Bacillus*, os quais entram no processo junto com a cana-de-açúcar, pois se desenvolvem principalmente sobre a superfície da planta. O gênero *Lactobacillus* é o mais encontrado na fermentação, e a espécie *Lactobacillus fermentum* (heterofermentativa) é uma das mais prejudiciais para o processo, pois consome rapidamente o substrato.

Para o controle e diminuição dos problemas causados pelas bactérias, as destilarias utilizam o tratamento ácido do fermento, em que após cada ciclo de fermentação, a massa celular centrifugada é ressuspensa em solução de ácido sulfúrico pH 2,0 a 2,5 por um tempo de 2 horas em média. No entanto, esse tratamento ácido pode não ser suficiente para diminuir a contaminação a níveis que não prejudique o processo, o que leva a destilaria a procurar alternativas de controle, como o uso de antibióticos.

Os antibióticos são uma alternativa para o controle bacteriano nas destilarias, no entanto, além dos custos acarretados para as destilarias, há efeito residual nos subprodutos, o que gera maior impacto ao ambiente. A vinhaça, subproduto da fermentação, é utilizada na fertirrigação como adubo, levando resíduo de antibiótico para o campo e fazendo com que as bactérias sejam selecionadas ou resistentes a determinados antibióticos. Assim, quando ocorre a contaminação das dornas novamente será necessário o uso de maior quantidade ou substituição do antibiótico.

Considerando que o uso de antibióticos deva ser minimizado devido ao efeito residual na biomassa de levedura e vinhaça; que o emprego de ácido sulfúrico também deva ser minimizado por questão de segurança e custo; e que o etanol é um produto gerado pela própria indústria, o que não acarretaria em gastos adicionais para a mesma, procurou-se avaliar nesse trabalho o emprego do etanol como substituto ou adjuvante (que reforça a ação) do ácido sulfúrico no tratamento das células realizado na fermentação etanólica quando contaminada com *L. fermentum*.

## OBJETIVOS

### Geral:

Avaliar o emprego do etanol como substituto ou adjuvante (que reforça a ação) do ácido sulfúrico no tratamento das células realizado na fermentação etanólica quando contaminada com *L. fermentum*.

### Específicos:

- Avaliar o efeito do etanol sobre o crescimento de *L. fermentum* em condições proliferativas;
- Avaliar o efeito da adição de etanol à solução ácida com pH superior a 2,0 (substituição parcial do ácido sulfúrico) no controle de crescimento de *L. fermentum*;
- Avaliar a substituição total do ácido sulfúrico por etanol no controle de crescimento de *L. fermentum*;
- Avaliar o efeito da adição de etanol à solução ácida com pH 2,0 em alternância com tratamento pH 2,0 em fermentação em batelada com reciclo celular conduzida em caldo não estéril e contaminado com *L. fermentum* sobre os micro-organismos e os parâmetros fermentativos.

## REVISÃO DA LITERATURA

### 1. Fermentação alcoólica

O Brasil utiliza a sacarose proveniente da cana-de-açúcar como substrato para a fermentação, na forma de melaço e caldo (BATISTOTE et al., 2010). 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 5,0 a 6,0 (LIMA et al., 2001).

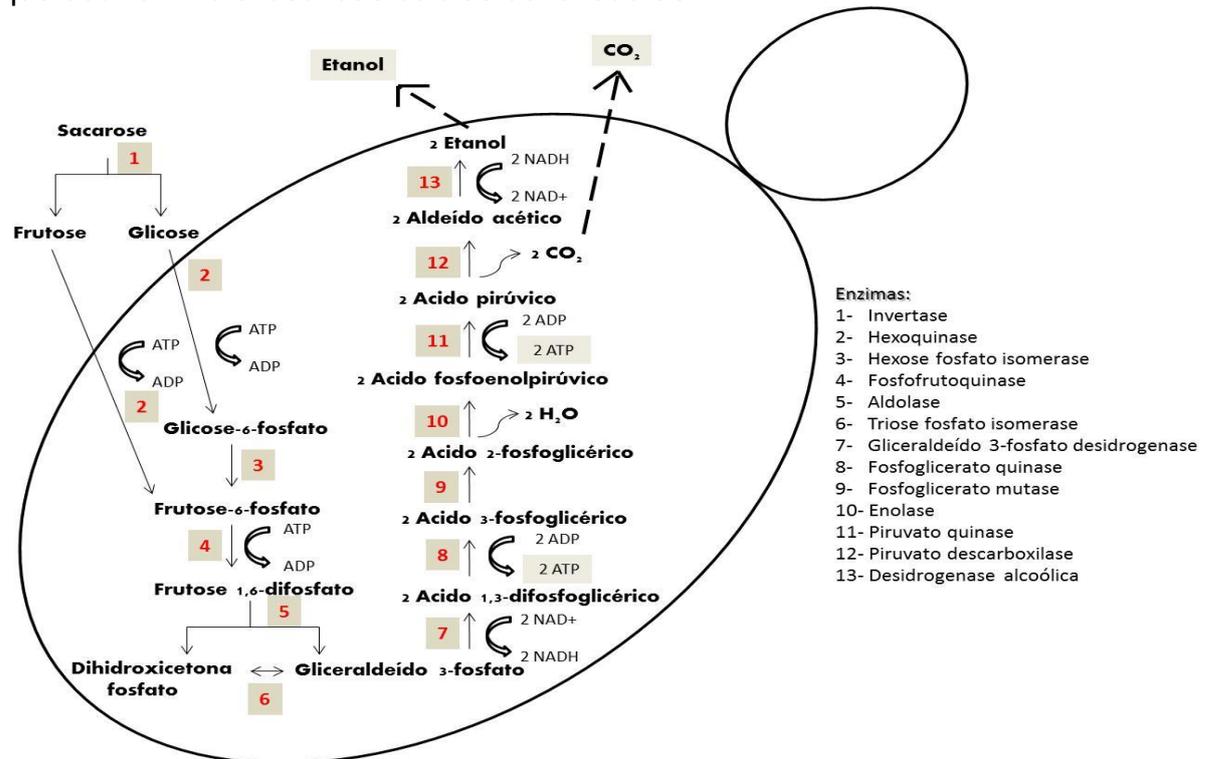
A fermentação ocorre pela ação de células de *S. cerevisiae* onde os açúcares contidos no caldo são convertidos em etanol diretamente, sem pré-tratamento enzimático (GOLDEMBERG, 2007; BATISTOTE et al., 2010). *S. cerevisiae* é caracterizada pela sua elevada produção de etanol a partir de hexoses e alta tolerância a esse composto e segundo Pasha et al. (2007), as propriedades desejadas para os micro-organismos fermentadores são: eficiência na utilização de hexoses e pentoses, taxas de fermentação rápidas, alta produção de etanol, alta tolerância ao etanol, fermentação em valores baixos de pH e a altas temperaturas, alta viabilidade e rentabilidade, baixa floculação e utilização de uma ampla gama de substratos. No entanto, nenhum micro-organismo capaz de satisfazer todas essas características foi encontrado ou desenvolvido até o momento.

Há várias maneiras de se conduzir a fermentação em reator biológico e, no Brasil, a maior parte da produção industrial de álcool em grande escala ocorre em processos fermentativos em batelada e contínuo, sendo mais comum a batelada com alimentação do substrato, denominada batelada alimentada. Utiliza-se também no Brasil a fermentação com reciclo celular, também chamada de Mèlle-Boinot (PACHECO, 2010).

A fermentação alcoólica consiste na transformação dos açúcares do mosto a base de caldo de cana em etanol nas dornas de fermentação pela levedura do processo para a produção de álcool, ocorrendo em três etapas distintas: pré-fermentação, fermentação principal e pós-fermentação. A pré-fermentação se inicia quando o fermento (leveduras) é adicionado ao mosto devidamente preparado e ocorre elevação lenta e gradual da temperatura do meio. A fermentação principal, que é reconhecida pela elevação rápida da temperatura, queda da densidade do mosto por causa do metabolismo dos açúcares e da formação equivalente do álcool. A acidez eleva-se abaixando o pH. Essa fase termina quando as espumas desaparecem. A pós-fermentação é caracterizada pela diminuição lenta e gradual da temperatura do mosto, diminuição do desprendimento do gás carbônico e não se formam mais espumas. O mosto totalmente fermentado é denominado vinho (CECCATO-ANTONINI, 2010).

O processo de transformação de açúcar em etanol,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  e ATP envolve muitas reações em sequência ordenada, em que cada reação é acelerada por uma enzima específica (Figura 1). Essas enzimas glicolíticas sofrem ações que podem estimular ou reprimir o seu desempenho, podendo assim afetar a condução do processo fermentativo por leveduras. Cabe ressaltar que a levedura *S. cerevisiae*, agente do processo, é um micro-organismo aeróbio facultativo, ou seja, consegue se desenvolver em ambientes aeróbios e anaeróbios, sendo assim os produtos finais dependem do ambiente em que a levedura se encontra. Na presença de oxigênio, o açúcar consumido pela levedura é transformado em  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  e ATP, e em ambiente anaeróbio, em etanol,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  e ATP, por meio da fermentação etanólica (LIMA et al., 2001).

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



Fonte: COSTA (2017).

## 2. Contaminação do processo fermentativo

Para que haja viabilidade no processo de produção de etanol, alguns cuidados devem ser tomados em relação a cada etapa de produção antecedente ao processo fermentativo. Desde a colheita da cana-de-açúcar até a formação final do mosto, precauções devem ser tomadas para preservar o mosto quanto às suas características químicas, físicas e microbiológicas, para assim favorecer as leveduras e garantir resultados elevados em conversão (VANZELLA et al., 2014). As leveduras sofrem inúmeros estresses fermentativos durante o processo, tais como altas temperaturas, pressão osmótica, baixo pH e contaminação bacteriana (BAI et al. 2008; BASSO et al. 2011). Dentre esses estresses, a contaminação bacteriana é um dos mais importantes, pois é maximizada pelo emprego da prática de reciclo das células.

A origem das contaminações pode ser proveniente do campo, da cana-de-açúcar, dos equipamentos do processo e da água de diluição do mosto de melaço. Os micro-organismos presentes no caldo de cana são em sua maioria *Lactobacillus*

e *Bacillus*, os quais se desenvolvem sobre as superfícies das folhas da cana. A contaminação também pode ocorrer pelas condições do processo, pois grandes volumes de substratos são processados de maneira não asséptica. A contaminação é considerada um fator preocupante para a fermentação devido à perda no rendimento fermentativo, floculação e baixa viabilidade das células de levedura pelo efeito inibitório promovido por substâncias liberadas pelas bactérias (OLIVA-NETO; YOKOYA, 1994; CEBALLOS-SCHIAVONE, 2009).

As contaminações bacterianas podem chegar às concentrações de  $10^5 - 10^8$  células/mL e são muitas vezes caracterizadas pelo acúmulo de subprodutos como ácido láctico e ácido acético e por resistirem a altas porcentagens de etanol no processo. Estes ácidos orgânicos podem inibir o crescimento das leveduras no processo fermentativo. A maioria dos contaminantes bacterianos durante a fermentação alcoólica é constituída de bactérias produtoras de ácido láctico (GALLO, 1990; 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)

Um levantamento sobre a população microbiológica das dornas de fermentação etanólica por Gallo (1990) mostrou que 98,52% da população de bactérias contaminantes isoladas são Gram positivas e na maioria são do gênero *Lactobacillus* (59,75%) e *Bacillus* (26,58%), sendo que dentre as bactérias lácticas quantificadas, 15,04% eram da espécie *L. fermentum*. Lucena et al. (2010), estudando 489 isolados de quatro destilarias durante os anos de 2007 e 2008, mostraram que em dornas de fermentação as bactérias lácticas podem chegar a  $8,9 \times 10^8$  UFC/mL e no caldo de cana bruto para a fermentação  $6,0 \times 10^8$  UFC/mL, mostrando ainda que das espécies de *Lactobacillus*, a *L. fermentum* é a mais frequente.

A espécie *L. fermentum* é um bastonete de 0,5 a 0,9  $\mu\text{m}$  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 de crescimento entre 30°C a 40°C e pH na faixa de 5,5 a 5,9 (OLIVEIRA et al., 1995).

As bactérias lácticas homofermentativas são capazes de metabolizar glicose em ácido láctico quase em quantidades estequiométricas, enquanto

heterofermentivas produzem ácido láctico, CO<sub>2</sub> e etanol e quantidades menores de glicerol e ácido acético a partir da glicose fornecida (NARENDRANATH et al., 1997). Estudos feitos por Basso et al. (2014) sobre os efeitos das bactérias *L. fermentum* (heterofermentativa) e *L. plantarum* (homofermentativa) sobre a fermentação alcoólica conduzida pela linhagem selecionada CAT-1, 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.

### **3. Formas de controle do crescimento bacteriano**

O controle dos contaminantes é essencial para a manutenção do rendimento fermentativo. Assim, uma forma de reduzir a contaminação e floculação por bactérias é o tratamento ácido, em que o fermento é tratado em solução de ácido sulfúrico ao final de cada ciclo de fermentação. O procedimento consiste em, após a centrifugação do vinho fermentado, o fermento ser levado para uma cuba com uma solução de ácido sulfúrico (pH 2,0 a 2,5) por 2 horas para ser tratado e, em seguida, as células serem envidas para um novo ciclo fermentativo nas dornas de fermentação (WHEALS et al., 1999; BASSO, BASSO et al. 2008; BASSO et al., 2011). Dependendo do nível de contaminação das dornas e do tipo de bactéria contaminante, o tratamento com solução ácida não é suficiente, podendo requerer a adição de mais ácido ou antibióticos, o que além de comprometer a viabilidade das leveduras aumenta os custos de produção (COSTA, 2017).

O ácido sulfúrico é utilizado pela indústria como forma de combater essa contaminação, mas é visto como um problema operacional visto a toxicidade do ácido, sendo agressivo às leveduras, aos seus manipuladores, aos equipamentos da indústria e aos cuidados de armazenamento e transporte (CEBALLOS-SCHIAVONE, 2009).

O uso de antibióticos para o controle da contaminação bacteriana também é comum nas destilarias brasileiras, principalmente quando há uma grande população de bactérias, tornando-se difícil o controle somente com o ácido. Porém, além de aumentar os custos de produção há um aumento dos níveis residuais dos subprodutos da indústria do etanol, como vinhaça, fermento seco, os quais ficam

impróprios para a comercialização (BASSO et al., 2011). Há muitos problemas envolvendo o uso de antibacterianos 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 alternativas (COSTA, 2017).

Os antibióticos comumente usados no Brasil são a penicilina, tetraciclina e aqueles à base de monensina. A penicilina é mais vantajosa economicamente, já que exige uma dosagem muito baixa (0,5 a 1,0 ppm) em relação aos outros antibióticos usados na fermentação, mas as condições de fermentação como baixo pH e alta temperatura pode restringir sua ação (BREGAGNOLI, 2006; CECCATO-ANTONINI, 2018).

A monensina é o agente antimicrobiano mais utilizado nas destilarias brasileiras, o qual é obtido por meio de processo fermentativo por *Streptomyces cinnamonensis*, a qual produz o princípio ativo monensina sódica cristalina que age seletivamente como bactericida e bacteriostático. A série comercial mais vendida é conhecida como Kamoran® HJ e a dose recomendada para o controle da contaminação bacteriana é de 1 a 3 ppm, mas já houve uma alteração na sua dosagem para 4 ppm, o que indica aumento na resistência das bactérias ao antibiótico (QUIMICA REAL, 2009; SILVA, 2010).

Uma nova estratégia para controle da contaminação bacteriana tem sido adotada na busca de antimicrobianos de origem química ou natural que não apresente efeitos residuais sobre a biomassa de levedura, não afete a fermentação e não apresente risco para quem o manuseia, com o intuito de diminuir o uso de antibióticos e ácidos na indústria. O dióxido de cloro e o extrato de lúpulo são exemplos de antimicrobianos já comercializados e utilizados como alternativa aos antibióticos. Extrato de própolis e quitosana têm sido bastante estudados como antimicrobianos, porém pouco se sabe sobre o seu uso em grande escala, bem como na indústria do bioetanol (LOPES et al., 2016; CECCATO-ANTONINI, 2018).

Um dos biocidas bastante estudado e utilizado na indústria do bioetanol é o extrato de lúpulo. Os compostos presentes no lúpulo são bastante eficientes contra bactérias, como por exemplo, lupulina e ácidos alfa (homulonas) e beta (lupulonas) (RUCKLE; SENN, 2006; SUZUKI et. al., 2006). Os biocidas a base de lúpulo são muito eficientes sobre bactérias do gênero *Lactobacillus*, limitando seu metabolismo e crescimento sem maior efeito sobre a levedura do processo, o que melhora a

produção e diminui o prejuízo causado no processo pelas bactérias (RUCKLE; SENN, 2006). Durante o processo de fermentação para combater a infecção bacteriana são usadas concentrações que variam de 10 a 50 mg/L nos tanques de fermentação e durante o tratamento ácido das células (LEITE et al., 2013).

Entre os antimicrobianos químicos que foram testados em escala industrial, o dióxido de cloro se mostrou o mais bem sucedido. O dióxido de cloro é um oxidante forte que além de apresentar atividade antimicrobiana contra bactérias, tem ação contra vírus, esporos e algas, e é geralmente usado como sanitizante em sistema de tratamento de água (LAPOLLI et al., 2005; CECCATO-ANTONINI, 2018). Variando de 10 a 125 ppm, esse composto foi capaz de controlar o crescimento de bactérias comumente encontradas na fermentação alcoólica, com efeito similar ao do Kamoran® na concentração de 3 ppm (MENEHIN et al., 2008). Desde 2011 essa tecnologia é realidade nas destilarias brasileiras e traz consigo o intuito de ser mais sustentável e mais rentável para a indústria, sendo que o seu emprego pode diminuir de 15 a 30% o uso do ácido sulfúrico, o que diminui em até sete vezes os gastos com insumos por metro cúbico de etanol produzido, além de aumentar em 5% o rendimento fermentativo pela sua eficácia (ABD, 2012; P&S, 2016).

Ceballos-Schiavone (2009) propôs a adição de etanol ao tratamento ácido como uma alternativa de eliminar a contaminação por bactérias, testando concentrações diferentes de etanol (15, 20, 25, 30 e 35 % v/v) e valores de pH (2,5 e 6,0). Os resultados mostraram um efeito sobre as bactérias *Lactobacillus* quando submetidas a valores superiores a 25% (v/v) de etanol e pH 2,5 e 6,0. Houve pouco efeito dos tratamentos sobre a viabilidade da levedura *S. cerevisiae* quando as células foram submetidas às concentrações de 20 – 25% (v/v) de etanol.

Bassi et al. (2013), estudando o efeito da adição de 13% de etanol ao tratamento ácido com pH 2,0 no controle de uma importante levedura contaminante da produção de etanol combustível, *Dekkera bruxellensis*, verificaram que ocorreu uma inibição do crescimento da contaminante sem um efeito significativo sobre a levedura do processo *S. cerevisiae*. Reis et al. (2017) avaliaram também o efeito da adição de 13% de etanol à solução ácida pH 2,0 em tratamento de cultura mista de *S. cerevisiae* industrial, *L. fermentum* e levedura contaminante *S. cerevisiae* rugosa, verificando a perda total da viabilidade da bactéria logo após o primeiro ciclo de fermentação.

Nesse mesmo contexto, Costa et al. (2017) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de etanol (1, 3, 5, 9 e 15% v/v) quando adicionado ao tratamento ácido pH 2,0, verificando redução de 81,1 e 99,6% no número de UFC/mL de *L. fermentum*, com 1 e 3% etanol, respectivamente. Com adição de 5% de etanol, houve perda total da viabilidade de *L. fermentum*. Em fermentação em batelada alimentada com reciclo das células com a co-cultura *S. cerevisiae* + *L. fermentum*, em caldo de cana esterilizado, o uso do tratamento pH 2,0 + 5% etanol também causou a perda da viabilidade da bactéria *L. fermentum* logo ao final do primeiro ciclo fermentativo, sem causar efeito significativo sobre as células de levedura. No entanto, houve diminuição na produção de etanol (em g/L) sem efeito sobre o rendimento fermentativo, provavelmente devido ao fato de os autores terem aplicado o tratamento em todos os ciclos, mesmo com a perda da viabilidade da bactéria ao final do primeiro ciclo de fermentação.

Os resultados obtidos anteriormente no trabalho acima citado abrem um caminho para testar o emprego do etanol em substituição ao ácido sulfúrico, totalmente ou parcialmente, ou mesmo a adição de etanol ao tratamento ácido em fermentação com mosto não estéril e contaminado com *L. fermentum*, para avaliar também o efeito sobre as bactérias nativas do caldo de cana.

## LITERATURA CITADA

ADB. **Tecnologia faz a produção de etanol ficar mais sustentável**. 2012.

Disponível em: <[http://www.abdi.com.br/Paginas/noticia\\_detalhe.aspx?i=3081](http://www.abdi.com.br/Paginas/noticia_detalhe.aspx?i=3081)>.

Acesso em: 24/07/2018.

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.

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.

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, 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.

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.

BATISTOTE, M.; CARDOSO, A. C.; ERNANDES, J. R.; DOFFINGER, R. D. Desempenho de leveduras obtidas em indústria do Mato Grosso do Sul na produção de etanol em mosto a base de caldo de cana. **Revista Ciência e Natura**, v. 32, p. 83-95, 2010.

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. Conventional and nonconventional strategies for controlling bacterial contamination in fuel ethanol fermentations. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 80, p. 24-34, 2018.

COSTA, M. A. S. **Efeito do sistema de fermentação e da adição de etanol ao tratamento ácido do fermento sobre a fermentação alcóolica contaminada**

com *Lactobacillus sp.* 2017. 99 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, Araras, SP, Brasil, 2017.

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, SP, Brasil, 1990.

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

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

LAPOLLI, F. R.; HASSEMER, M. E. N.; CAMARGO, J. G.; DAMÁSIO, D. L.; LOBO-RECIO, M. A. Desinfecção de efluentes sanitários através de dióxido de cloro. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 10, p. 200–208, 2005.

LEITE, I. R.; FARIA, J. R.; MARQUEZ, L. D. S.; REIS M. H. M.; RESENDE M. M.; RIBEIRO, E. J.; CARDOSO, V. L. Evaluation of hop extract as a natural antibacterial agent in contaminated fuel ethanol fermentations. **Fuel Processing Technology**, v. 106, p. 611–618, 2013.

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

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.; 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.

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.

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.

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.

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.

**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: 24/07/2018.

PASHA, C.; KUHAD R. C.; RAO, L. V. Strain improvement of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* VS3 strain for better utilization of lignocellulosic substrates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 1480–1489, 2007.

PACHECO, T. F. **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente.** 2010. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química, Uberlândia, MG, Brasil, 2010.

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.

RUCKLE, L.; SENN, T. Hop acids as natural antibacterials can efficiently replace antibiotics in ethanol production. **Betatec Hop Products**, v. 7, n. 9, 2006.

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.

SUZUKI, K.; IJIMA, K.; SAKAMOTO, K.; SAMI, M.; YAMASHITA, H. A review of hop resistance in beerspoilage lactic acid bacteria. **Jornal of the Institute of Brewing**, v. 112, p.173–191, 2006.

VANZELLA, E.; BARICCATTI, R. A.; NOGUEIRA, C. A. C.; MICUANSKI, V. C.; COSTA, M. A. Processo fermentativo na indústria sucroalcooleira. **Acta Iguazu**, v. 3, n. 1, p. 50-58, 2014.

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.

## **CAPÍTULO 1. SUBSTITUIÇÃO PARCIAL E TOTAL DO ÁCIDO SULFÚRICO POR ETANOL NO TRATAMENTO DAS CÉLULAS EM FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA CONTAMINADA POR *Lactobacillus fermentum***

### **1. Resumo**

Para o controle de contaminantes bacterianos no processo de produção de bioetanol, as indústrias brasileiras utilizam o tratamento ácido (solução de ácido sulfúrico pH 2,0) entre os ciclos fermentativos. Quando o tratamento ácido não é eficiente, biocidas e antibióticos são adicionados, o que resulta em aumento de custos e problemas relacionados à resistência aos antibióticos. Nesse contexto, o presente estudo avaliou inicialmente o efeito do etanol sobre o crescimento de *Lactobacillus fermentum*, em microplacas com meio MRS com leitura de absorbância ao longo do tempo. Em seguida, avaliou-se a substituição parcial (tratamentos pH 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 + 5% etanol e pH 3,0 + 5%, 7%, 9%, 10%, 11%, 13%, 15%, 17%, 20%, 22% etanol) ou total (5%, 7%, 9%, 10%, 11%, 13%, 15%, 17%, 20%, 22%, 23% e 25% etanol) do ácido sulfúrico por etanol para o controle do crescimento da bactéria contaminante *L. fermentum* durante o tratamento das células. Os testes foram realizados em frascos contendo a solução do tratamento, para a qual foi transferido o inóculo da bactéria, mantidos a 30°C, 160 rpm por 2 horas. Em seguida as células foram transferidas para meio de caldo de cana 4°Brix por 9 horas a 30°C. A avaliação do crescimento da bactéria foi realizada por plaqueamento das amostras

antes e depois do tratamento e depois do crescimento em caldo de cana. Foi também realizada uma fermentação em batelada de ciclo único com a levedura industrial *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 em co-cultura com *L. fermentum* para avaliar o efeito sobre os parâmetros fermentativos do tratamento celular mais eficiente no controle da bactéria. A bactéria *L. fermentum* apresentou diminuição da velocidade específica de crescimento máxima e aumento da fase lag em meio de cultura com etanol em concentração de até 14% v/v. Em relação ao tratamento celular, houve perda total da viabilidade celular de *L. fermentum* em tratamento com pH 2,0 + 5% etanol, pH 3,0 + 20% etanol e com 22% etanol. Houve inibição da produção de etanol, queda de dois ciclos log no número de *S. cerevisiae* e perda total de viabilidade de *L. fermentum* quando o tratamento celular foi realizado em solução hidroalcoólica com 22% etanol, o que torna esse tratamento inviável para emprego na indústria. A variação logarítmica do número de UFC/mL foi muito abaixo de 1 ciclo log até 15% de etanol assim como para os tratamentos com pH superior a 2,0 com e sem adição de etanol. Conclui-se que o etanol é um adjuvante e não um substituto do ácido sulfúrico para o controle do crescimento da bactéria, apontando o tratamento pH 2,0 + 5% etanol como o mais econômico e eficiente.

Palavras-chave: *Lactobacillus fermentum*; etanol; tratamento ácido; *Saccharomyces cerevisiae*

## 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 cepa 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 meio de cultura são convertidos em etanol, energia, biomassa celular, CO<sub>2</sub>, 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 de 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 bactérias apresentaram um comportamento diferente quanto ao consumo do substrato, sendo que *L. fermentum* consumiu mais rápido os açúcares em comparação à *L. plantarum*.

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), a 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 a 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 baixa (36 UFC/mL), chegando a zero em 120 minutos. Em 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.

Costa et al. (2017) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de etanol (1, 3, 5, 9, e 15% v/v) quando adicionado ao tratamento ácido pH 2,0, sobre a viabilidade da bactéria *L. fermentum*. Quando adicionadas concentrações de 1 e 3% (v/v) de etanol ao tratamento ácido houve uma redução de 81,1 e 99,6% no número de UFC/mL, respectivamente. Quando o tratamento pH 2,0 + 5% de etanol (v/v) foi testado em sistema de batelada alimentada com reciclo celular, houve a eliminação total das células de *L. fermentum* logo ao final do primeiro ciclo fermentativo sem causar efeito significativo sobre as células de levedura. No entanto, houve uma diminuição na produção de etanol (em g/L) sem efeito sobre o rendimento fermentativo com maior sobra de açúcar.

Considerando o efeito que a bactéria *L. fermentum* causa no processo fermentativo e a necessidade de reduzir a quantidade de ácido sulfúrico utilizado no tratamento ácido por questões de segurança na manipulação e custos, os objetivos do presente trabalho foram inicialmente verificar a tolerância de *L. fermentum* ao

etanol, seguindo-se a avaliação da substituição parcial ou total do ácido sulfúrico por etanol para o controle do crescimento dessa bactéria. Em seguida avaliou-se o efeito do tratamento selecionado sobre o processo fermentativo conduzido por *S. cerevisiae* e contaminado por *L. fermentum*, a fim de avaliar a pertinência dessa proposta em um contexto mais sustentável, ou seja, com redução ou substituição do ácido sulfúrico.

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1 Micro-organismos**

A linhagem de bactéria utilizada neste trabalho foi *L. fermentum* CCT5852 (ATCC19255). Foi utilizada a linhagem de levedura industrial selecionada *S. cerevisiae* PE-2 como levedura do processo fermentativo (BASSO et al., 2008). Todas as culturas microbianas pertencem ao banco de culturas do LAMAM/CCA/UFSCar-Campus de Araras.

A bactéria está sendo mantida em meio MRS (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 250 mL contendo 200 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 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 dez Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de caldo 4°Brix, até a obtenção de cerca de  $2 \times 10^9$  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 fracos 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  $2 \times 10^9$  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  $2 \times 10^9$  UFC/mL.

Para a fermentação, as suspensões de células da levedura e das bactérias foram padronizadas para a contagem desejada (aproximadamente  $10^8$  células/mL para leveduras e  $10^8$  UFC/mL para bactérias, em concentração final) e ressuspensas em meio de fermentação (caldo de cana 15°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 Efeito do etanol sobre o crescimento de *L. fermentum***

As curvas de crescimento da bactéria *L. fermentum* em meio MRS líquido acrescido de diferentes concentrações de etanol foram obtidas utilizando-se a leitora de microplacas Tecan Infinite® M200. Foi utilizada a microplaca modelo “Costa 96 Flat Bottom Transparent Polystyrene” esterilizada com 96 poços.

Aos poços da microplaca foram adicionados assepticamente 180 µL de meio MRS estéril e acrescidos de 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12% e 14% (v/v) de etanol absoluto P.A. e 20 µL do inóculo de *L. fermentum*. Foram também realizados dois tratamentos controle: meio MRS sem inoculação da bactéria e sem adição de etanol; e meio MRS com inoculação da bactéria e sem adição de etanol, sendo utilizados

200  $\mu\text{L}$  de meio MRS ou 180  $\mu\text{L}$  de meio MRS esterilizado e 20  $\mu\text{L}$  de inóculo de *L. fermentum*, respectivamente. Todos os tratamentos (com e sem de etanol) foram realizados com 3 repetições.

A microplaca foi levada ao leitor de microplacas e incubada a 35°C e 160 rpm de agitação (aproximadamente 5 mm de amplitude orbital) por 24 horas. O crescimento celular foi monitorado pela medida de absorbância a 540 nm a cada 15 minutos. Foi calculada a velocidade específica de crescimento máxima ( $\mu$ ,  $\text{h}^{-1}$ ) por meio da regressão linear dos dados de  $\ln$  da absorbância X tempo na fase exponencial, considerando-se o coeficiente angular como a velocidade específica de crescimento máxima.

### **3.4 Otimização do valor de pH da solução ácida acrescida de 5% de etanol para controle de crescimento de *L. fermentum***

Um volume de 5 mL da massa celular da bactéria foi ressuspenso em solução ácida para valores de pH 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 e acrescida de etanol absoluto na concentração de 5% (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 + etanol por centrifugação a 8000 rpm, por 10 minutos, a 4°C, em centrífuga refrigerada Eppendorf®, lavadas com água destilada estéril duas vezes e inoculadas em meio de caldo de cana 4°Brix e pH 5,5, incubação a 30°C e 160 rpm por 9 horas. Foram feitos dois tratamentos controle, pH 2,0 e pH 3,0, ambos sem adição de etanol.

Foram retiradas amostras da massa celular antes do tratamento, após o tratamento, e após o crescimento 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.

Foi calculada a redução logarítmica do número de *L. fermentum* considerando-se o número de UFC/mL inicial em relação ao número de UFC/mL ao final dos tratamentos, em cada valor de pH, com ou sem adição de etanol. A redução logarítmica foi calculada da seguinte forma:

$$\text{Redução logarítmica} = \log \text{UFC/mL inicial} - \log \text{UFC/mL final}$$

A solução ácida foi preparada adicionando-se ácido sulfúrico concentrado à água destilada até obtenção de pH desejado para o tratamento, 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. Foi avaliado o valor do pH da solução ácida após a inoculação da bactéria, e caso o valor se desviasse mais que 0,2 unidades, foi adicionado ácido sulfúrico até a obtenção do valor determinado no experimento.

Os experimentos foram feitos em triplicata e repetidos no mínimo duas vezes.

Foi medido o volume de ácido sulfúrico concentrado adicionado à água destilada para o preparo da solução ácida nos diversos valores de pH testados. Em béquer contendo 1 litro de água destilada foi adicionado um volume de ácido sulfúrico com monitoramento do pH até atingir o valor de 2,0. O mesmo volume foi adicionado a dois outros béqueres contendo 1 litro de água destilada e o pH foi anotado. O mesmo procedimento foi realizado para o preparo das soluções com pH 3,0; 4,0; e 5,0.

Para efeitos de comparação foi realizado um experimento com Kamoran®. Aos frascos contendo 50 mL (volume final) de solução ácida (pH 2,0), foi adicionado um volume de 0,5 mL da solução estoque de Kamoran® (concentração final de 3 mg/L). Para a solução estoque, pesou-se 0,03 g do produto, diluindo-se em algumas gotas de etanol, e completando a seguir com 100 mL de água destilada estéril (concentração 300 mg/L).

### **3.5 Otimização da concentração de etanol adicionado à solução ácida pH 3,0 para controle de crescimento de *L. fermentum***

Um volume de 5 mL da massa celular da bactéria foi ressuspendido em solução ácida pH 3,0 e acrescida ou não de etanol absoluto nas concentrações de 5%, 7%, 9%, 11%, 13 %, 15%, 17%, 20% e 22% (v/v), em um volume final de 50 mL em Erlenmeyers de 125 mL. Em seguida as células seguiram para o tratamento e crescimento em caldo de cana conforme especificado no item 3.4.

Os experimentos foram feitos em triplicata e repetidos no mínimo duas vezes.

Foi também calculada a redução logarítmica do número de *L. fermentum*, conforme especificado no item 3.4.

### **3.6 Avaliação da substituição total do ácido sulfúrico por etanol para controle do crescimento de *L. fermentum***

Para avaliar a substituição total do ácido sulfúrico por etanol no tratamento, um volume de 5 mL da massa celular da bactéria foi ressuspendido em solução de etanol 5%, 7%, 9%, 10%, 11%, 13%, 15%, 17%, 20%, 22%, 23% e 25% (v/v), em um volume final de 50 mL em Erlenmeyers de 125 mL. Em seguida as células seguiram para o tratamento e crescimento em caldo de cana conforme especificado no item 3.4.

A solução etanólica utilizada para o tratamento das células da bactéria foi preparada adicionando-se etanol absoluto à água destilada esterilizada em volume necessário para a obtenção das concentrações desejadas. Foi feito um controle somente com água, sem a adição de etanol.

Os experimentos foram feitos em triplicata e repetidos no mínimo duas vezes, tendo sido calculada a redução logarítmica do número de *L. fermentum*, conforme especificado no item 3.4..

### **3.7 Avaliação do tratamento celular selecionado sobre a fermentação em sistema de batelada com ciclo único**

Um volume de 10 mL das suspensões de células da levedura ( $2 \times 10^9$  células/mL) e/ou das bactérias ( $2 \times 10^9$  UFC/mL) foram adicionadas a uma solução hidroalcoólica 22% para um volume final de 200 mL, em Erlenmeyers de 500 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 hidroalcoólica por centrifugação a 8000 rpm, por 10 minutos, a 4°C, em centrífuga refrigerada Eppendorf®, lavadas com água destilada estéril duas vezes. A fermentação foi realizada com as células ressuspendidas do tratamento, em batelada simples, em caldo de cana 15°Brix e pH 5,5, incubação a 30°C por 9 horas, sem agitação. Foram utilizados Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de meio como volume final. Foram feitos dois tratamentos controle, pH 2,0 e água destilada, em substituição à solução hidroalcoólica.

Foram realizadas fermentações com cultura pura de *S. cerevisiae* com tratamento ácido (pH 2,0) das células; e com co-cultura de *S. cerevisiae* e *L. fermentum* com tratamento ácido (pH 2,0), com água destilada e com a solução hidroalcoólica contendo 22% (v/v) de etanol.

Para análise de viabilidade celular foram retiradas amostras da massa celular antes do tratamento, após o tratamento, e após a fermentação. 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). 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 nistatina (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 ( $10^{-2}$ ,  $10^{-1}$  e sem diluição), em duplicata, para cada uma das repetições das fermentações.

Após a centrifugação do meio fermentado e separação das células microbianas, 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 mol/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:

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

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Efeito do etanol sobre o crescimento de *L. fermentum*

Quando avaliado o crescimento de *L. fermentum* em meio proliferativo (MRS) acrescido de etanol, a bactéria se mostrou resistente às diversas concentrações testadas (Figura 1). No entanto, observou-se um aumento na duração da fase lag nas concentrações de 12 e 14% de etanol (Tabela 1).

Em relação aos parâmetros analisados (Tabela 1), pode-se observar que houve um aumento na duração da fase lag, de 3,5 horas, da menor concentração para a maior concentração, sendo que os maiores efeitos só puderam ser vistos a partir de 10% (v/v) de etanol. Quanto à duração da fase exponencial, pode-se verificar um aumento com a elevação da concentração de etanol. Quanto aos resultados da velocidade específica de crescimento máxima, houve uma diminuição de 0,332 para 0,202 h<sup>-1</sup> com a adição de 2% etanol. A velocidade continuou a cair com o aumento da concentração de etanol, mostrando uma tendência a estabilizar após 8% até 14% de etanol, em valores variando de 0,080 a 0,126 h<sup>-1</sup>.

Esses resultados mostraram que concentrações de etanol até 14% tem um efeito sobre o crescimento de *L. fermentum*, porém não ao ponto de inibir o seu crescimento. O aumento da fase lag pode significar que a bactéria tem mecanismos de adaptação à situação estressante causada pelo etanol, além da diminuição do ritmo de crescimento. O etanol tem ação sobre as bactérias lácticas em nível de membrana citoplasmática, desorganizando sua conformação e aumentando o nível de fluidez da mesma (FERNANDES, 1989).

Figura 1. Curvas de crescimento (ln absorbância x tempo) de *L. fermentum* em meio MRS acrescido de etanol em concentrações variando de 0 a 14% (v/v) obtidas a partir das leituras de absorbância a 540 nm utilizando-se a leitora de microplacas Tecan Infinite® M200, a 35°C, 160 rpm. O gráfico é a representação de uma das triplicatas.

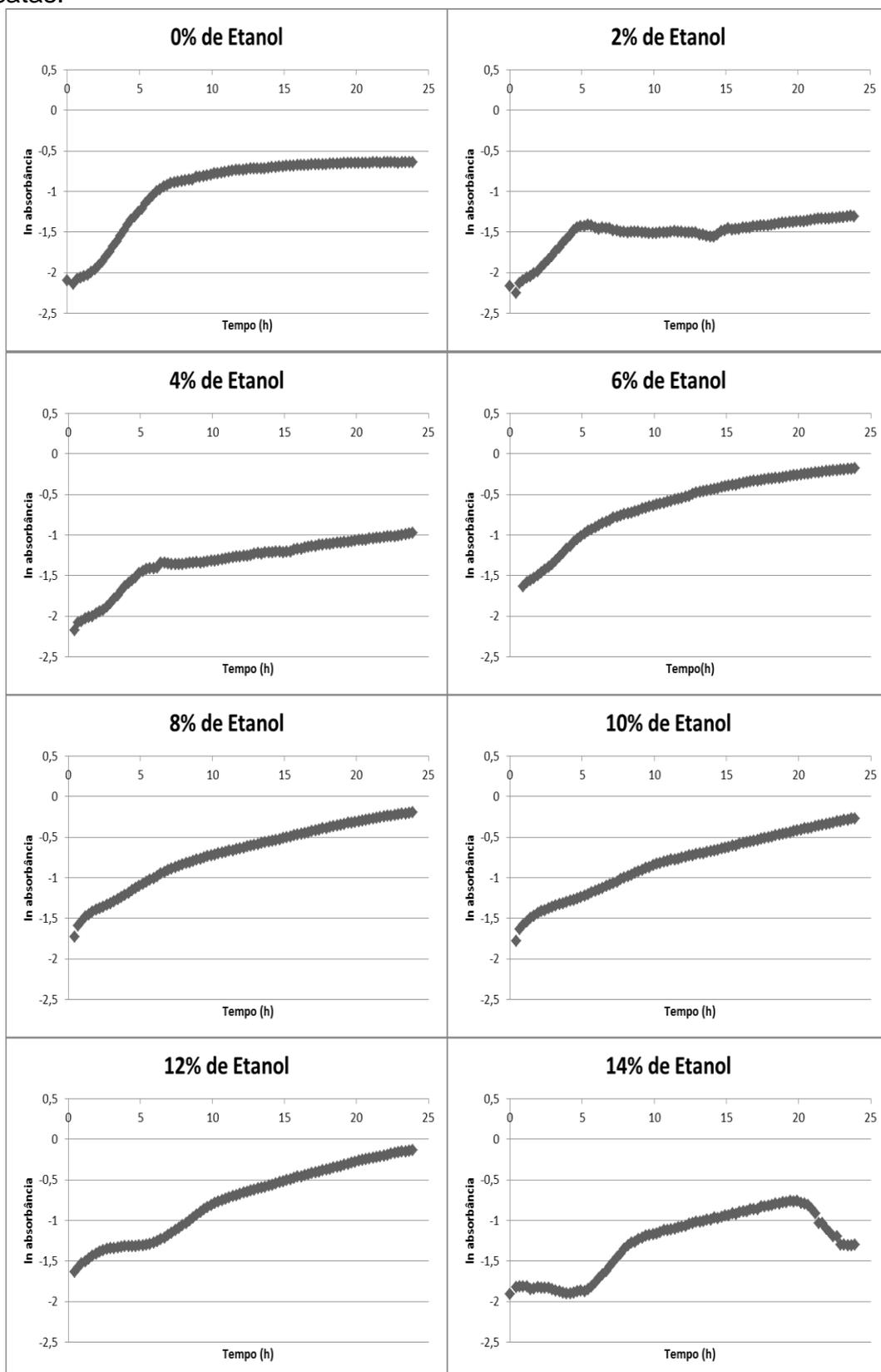


Tabela 1. Velocidade específica de crescimento máxima ( $h^{-1}$ ), duração da fase lag (h) e duração da fase exponencial (h) da bactéria *L. fermentum* em meio MRS acrescido de etanol em diferentes concentrações, utilizando-se a leitora de microplacas Tecan Infinite® M200, a 35°C, 160 rpm.

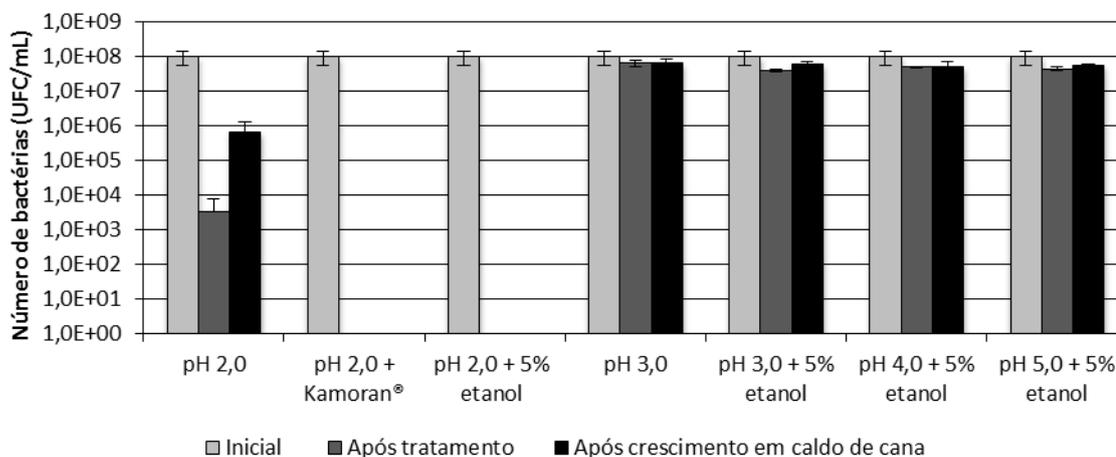
Concentração de etanol	Duração fase lag (h)	Duração fase exponencial (h)	Velocidade específica de crescimento máxima ( $h^{-1}$ ) <sup>1</sup>
0%	1,5	2 a 5	0,332 ± 0,012
2%	2	2,5 a 4	0,202 ± 0,005
4%	2	3 a 5	0,194 ± 0,019
6%	2	3 a 6	0,147 ± 0,002
8%	2	3 a 6	0,106 ± 0,003
10%	3,5	4 a 10	0,080 ± 0,004
12%	5	6 a 10	0,117 ± 0,002
14%	5	5 a 9	0,126 ± 0,069

<sup>1</sup> Média e desvio-padrão de três repetições

#### 4.2 Otimização do valor de pH da solução ácida acrescida de 5% etanol para controle de crescimento de *L. fermentum*

O objetivo inicial foi verificar o efeito que a solução ácida com pH maior que 2,0 acrescida de 5% de etanol era capaz de causar sobre *L. fermentum*, procurando assim diminuir a quantidade de ácido sulfúrico a ser utilizado para o tratamento celular. O experimento foi baseado em um trabalho anterior (COSTA et al., 2017) onde os resultados mostraram que houve morte das células de *L. fermentum* na concentração de 5% de etanol adicionado ao tratamento ácido (pH 2,0) das células logo após o primeiro ciclo fermentativo, sem afetar a viabilidade da levedura do processo *S. cerevisiae*. No presente trabalho procurou-se avaliar se o tratamento com pH acima de 2,0 acrescido de 5% de etanol seria capaz de controlar o crescimento de *L. fermentum*. Os resultados estão expressos na Figura 2.

Figura 2. 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 com pH 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 com adição de 5% etanol; com pH 2,0 e 3,0 sem adição de etanol; e com Kamoran® em pH 2,0.



As células quando tratadas com pH 2,0 + 5% de etanol perdem totalmente a viabilidade, resultados que corroboram com Costa et al. (2017), similarmente ao que ocorre com o tratamento com Kamoran®. No entanto, o aumento do pH da solução ácida para 3,0, 4,0 ou 5,0 com adição de 5% de etanol, teve pouco efeito sobre *L. fermentum*, com pequena variação no número de células após o tratamento ácido e mesmo após o crescimento em caldo de cana (Figura 2). Com o tratamento ácido pH 2,0, houve aumento de aproximadamente 3 ciclos log no número de UFC/mL de *L. fermentum* após crescimento em caldo de cana, o que não ocorreu nos demais tratamentos (Figura 2).

Houve maior redução logarítmica no número de UFC/mL quando as células foram tratadas com Kamoran® e pH 2,0 + 5% de etanol, seguido do pH 2,0. Em pH 2,0 sem adição de etanol, houve uma redução de 4 ciclos log após o tratamento, porém o aumento do pH para 3,0 não teve praticamente nenhum efeito sobre a bactéria, assim como nos demais tratamentos com adição de etanol nos valores de pH 3,0, 4,0 e 5,0 (Figura 3). A ineficiência do pH 3,0 em causar efeito sobre as células de *L. fermentum* pode estar relacionado ao fato de um volume 13 vezes maior de ácido sulfúrico ser necessário para abaixar o pH da água destilada para 2,0, comparando-se com o pH 3,0 (Tabela 2).

Figura 3. Redução logarítmica do número de UFC/mL de *L. fermentum* considerando-se o número inicial em relação ao número após o tratamento das células em solução ácida com pH 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 com adição de 5% etanol, e com pH 2,0, 3,0 sem adição de etanol e com Kamoran®.

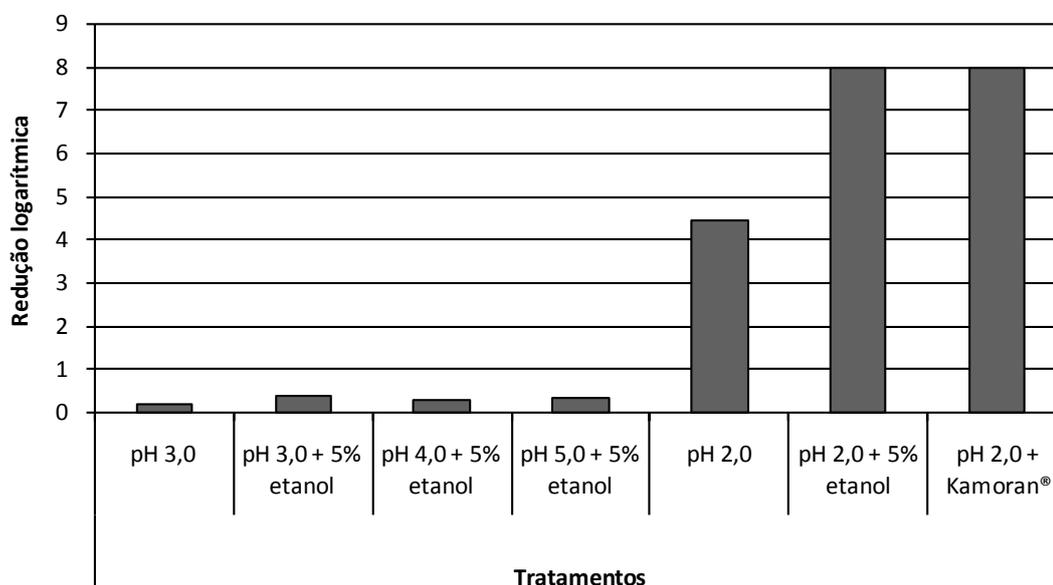


Tabela 2. Volume de ácido sulfúrico concentrado adicionado a um litro de água destilada para o preparo da solução ácida nos valores de pH dos experimentos.

Volume de ácido sulfúrico/L de água destilada	pH da solução <sup>1,2</sup>
650 µL	2,083 ± 0,004
50 µL	3,003 ± 0,020
1 µL	4,127 ± 0,132
0,1 µL	5,067 ± 0,125

<sup>1</sup> Média e desvio-padrão de três repetições; <sup>2</sup> pH da água destilada= 7,95

Fernandes (1989), estudando o efeito do etanol sobre bactérias lácticas isoladas do vinho em meio proliferativo, concluiu que o valor de etanol capaz de inibir ou causar morte depende do valor de pH do meio. O estudo mostrou que em pH 4,5, *Lactobacillus* foi mais resistente ao etanol, tendo sua velocidade específica

de crescimento e fase lag alteradas expressivamente somente com a adição de 12% de etanol ao meio. Já com pH 3,5 e 4,0, foi necessário o acréscimo de menor concentração de etanol, 5% e 8%, respectivamente, para que os mesmos efeitos fossem observados. Concluiu assim que quanto maior o valor de pH, maior a concentração de etanol necessária para controlar o crescimento de *Lactobacillus*. Desta forma, a próxima etapa desse trabalho foi avaliar qual seria a concentração mínima de etanol a ser adicionada à solução ácida pH 3,0, visando a diminuição no uso do ácido sulfúrico.

Mendonça et al. (2019) descreveram a resposta de *Lactobacillus vini*, uma bactéria também encontrada como contaminante em fermentações etanólicas, ao estresse ácido causado por ácidos inorgânicos ou ácidos fracos. Os autores verificaram que a acidificação intracelular foi revertida na presença de alguns aminoácidos como arginina, histidina e glutamina. Em geral, houve diminuição da expressão dos principais genes envolvidos na síntese e deposição de material na parede celular e aumento da expressão dos genes envolvidos na reabsorção dessa estrutura. Assim, a bactéria responde à acidificação do meio entrando logo na fase estacionária, disparando dois sinais de forma coordenada, um para a remodelagem da parede celular e outro para a manutenção do pH intracelular.

Estudos sobre o efeito do etanol em espécies de *Lactobacillus* são escassos. Cao et al. (2017) realizaram um estudo computacional a partir de dados de transcriptômica e genômica em células de *Escherichia coli* adaptadas e submetidas ao estresse por etanol a fim de identificar os mecanismos relacionados à tolerância ao etanol. Embora o estudo tenha sido feito com uma bactéria Gram-negativa de outra espécie, os resultados obtidos por Cao et al. (2017) podem ser utilizados para entender os efeitos que o etanol pode causar em bactérias em geral, a saber: (a) enfraquecimento da parede celular e membranas celulares, levando a uma diminuição no gradiente de prótons através da membrana e portanto menor produção de ATP; (b) indução de múltiplos tipos de estresses; (c) aumento na produção de ROS (espécies reativas de oxigênio) devido aos estresses com diminuição no nível de O<sub>2</sub> intracelular e portanto menor respiração aeróbia e produção de ATP; (d) diminuição na produção de ATP levando a alterações como menor biossíntese de macromoléculas e diminuição da proliferação celular; (e) alteração nas funções de cerca de 200 proteínas incluindo fatores de transcrição, com impacto em muitos processos biológicos; e (f) essas mudanças são

funcionalmente relacionadas umas às outras, todas surgindo da diminuição do gradiente de prótons através da membrana e aumento intracelular de ROS.

O etanol pode ser um adjuvante (substância que reforça a ação de outra) importante a ser considerado no tratamento ácido, quando esse não se mostra eficiente na redução da contaminação por *Lactobacillus*, causando um efeito mais significativo na viabilidade da bactéria, como pode ser aqui observado. Interessante avaliar se concentrações superiores a 5% de etanol em solução com maior valor de pH ou somente etanol em mistura com água podem ter o mesmo efeito que a adição de 5% de etanol em solução com pH 2,0, avaliando assim a possibilidade de substituir parcial ou totalmente o ácido no tratamento das células.

#### **4.3 Otimização da concentração de etanol adicionado à solução ácida pH 3,0 para controle de crescimento de *L. fermentum***

Os resultados de adição de etanol à solução ácida pH 3,0 para controle de *L. fermentum* estão apresentados na Figura 4. Verificou-se que a solução ácida pH 3,0 por demandar pouco ácido para o seu preparo (Tabela 2) não tem a mesma eficiência que o pH 2,0, pois para causar perda total de viabilidade da bactéria é necessária a adição de 20% de etanol à solução ácido pH 3,0.

Foi observada redução logaritmica de menos de 1 ciclo log até 11% de etanol (Figura 5) e para que haja um resultado de redução semelhante ao pH 2,0 (Figura 3) é necessária a adição de no mínimo 17% de etanol ao pH 3,0.

#### **4.4 Avaliação da substituição total do ácido sulfúrico por etanol para controle do crescimento de *L. fermentum***

Os resultados apresentados na Figura 6 mostram que o tratamento hidroalcoólico em substituição ao tratamento ácido é eficiente quando altas concentrações de etanol são utilizadas (20 – 25%), confirmando a alta resistência dessa bactéria ao etanol, conforme mostrado no item 4.1 (efeito do etanol sobre o crescimento de *L. fermentum*). Para que o tratamento hidroalcoólico resulte em diminuição do número de células de *L. fermentum*, é necessária a utilização de no mínimo 17% de etanol. Para a perda total da viabilidade de *L. fermentum*, comparado ao resultado do tratamento com pH 2,0 + 5% de etanol, é preciso ainda mais etanol (22%).

Figura 4. 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 com pH 3,0 com a adição de 0, 5, 7, 9, 11, 15, 17, 20 e 22% de etanol.

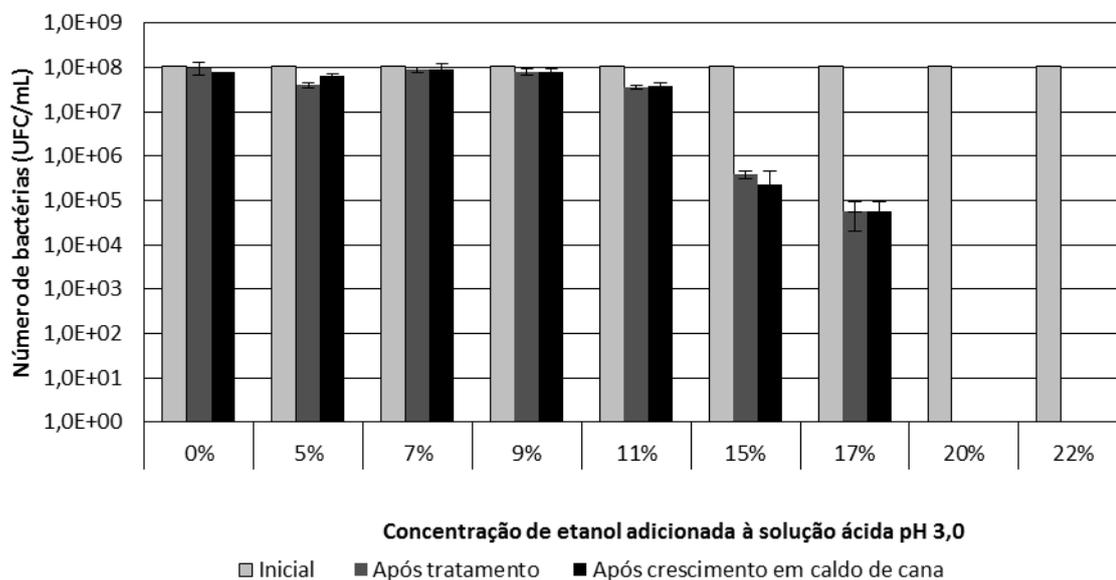


Figura 5. Redução logarítmica do número de UFC/mL de *L. fermentum* considerando-se o número inicial em relação ao número após o tratamento das células em solução ácida com pH 3,0 com a adição de 0, 5, 7, 9, 11, 15, 17, 20 e 22% de etanol.

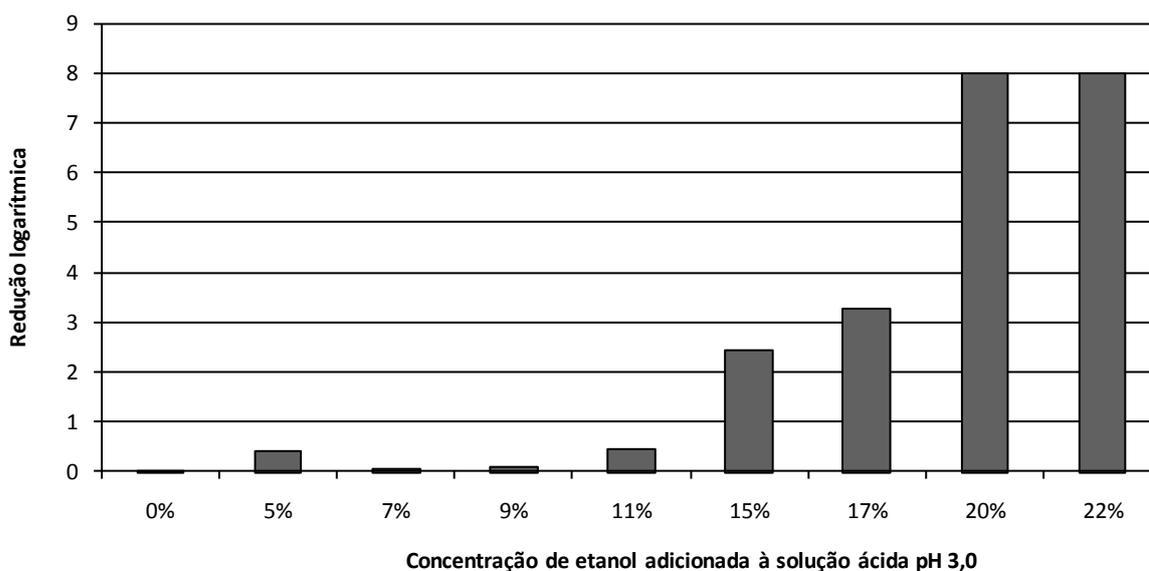
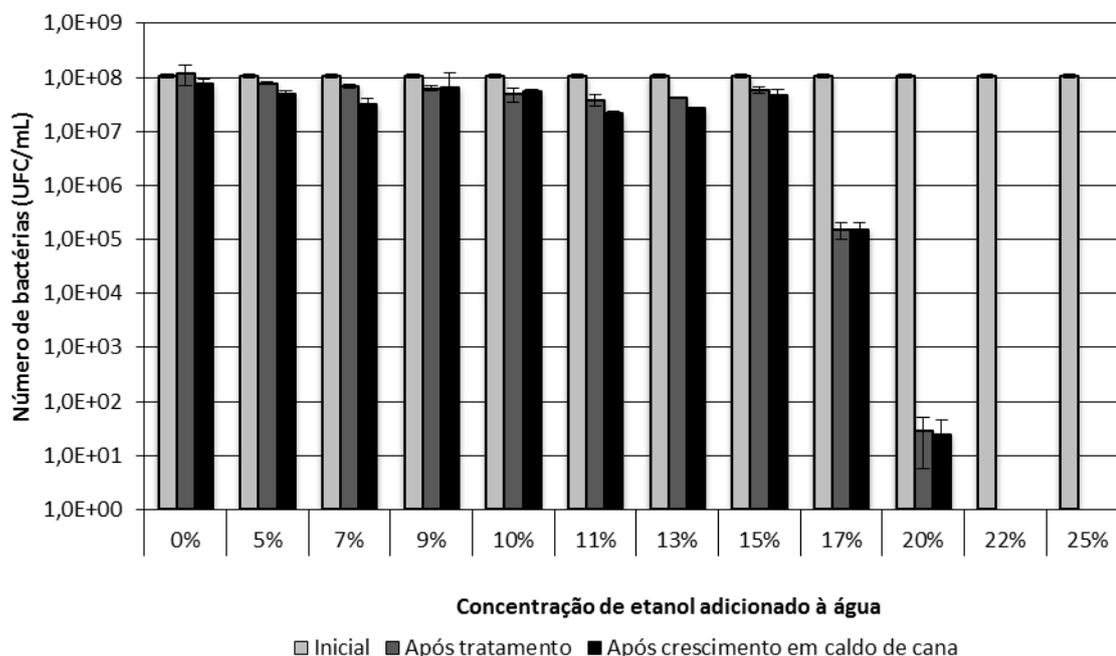


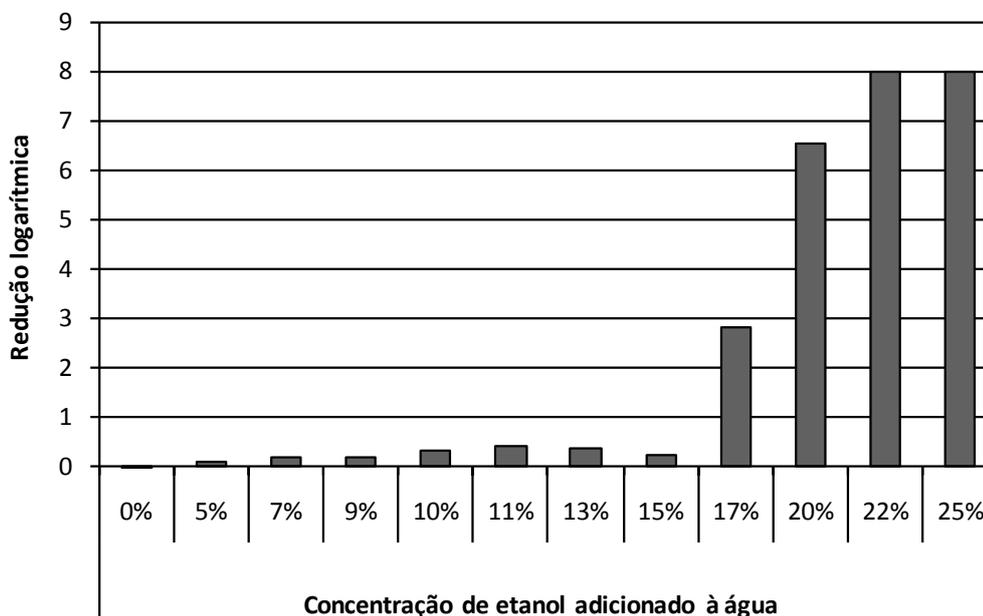
Figura 6. Número de *L. fermentum* (UFC/mL) determinado antes do tratamento (Inicial), após o tratamento e após o crescimento em caldo de cana da massa celular tratada com água sem e com adição de etanol, a 30°C, 160 rpm, por 2 horas.



Os resultados obtidos são comparáveis aos de Ceballos-Schiavone (2009), que trabalhando com pH 6,0 com diferentes concentrações de etanol (15, 20, 25, 30 e 35%) e verificada a viabilidade das células em diferentes tempos de contato, mostrou que em pH 6,0 + 25% de etanol em um tempo de 90 minutos, a contagem de UFC/mL chegou a zero. Nos resultados aqui apresentados, nenhum volume de ácido foi adicionado à solução hidroalcoólica, enquanto no trabalho anteriormente citado, certo volume de ácido deve ter sido adicionado para obter pH 6,0 da solução onde foi adicionado o etanol.

Observou-se que a redução logarítmica do número de UFC/mL foi muito abaixo de 1 ciclo log até 15% de etanol (Figura 7), da mesma maneira que ocorreu para os tratamentos com pH maior que 2,0 com e sem adição de etanol (Figura 3).

Figura 7. Redução logarítmica do número de UFC/mL de *L. fermentum* considerando-se o número inicial em relação ao número após o tratamento das células em água com e sem adição de etanol.



Comparando-se os resultados obtidos com os tratamentos ácido + etanol e exclusivamente etanol, há perda total da viabilidade celular de *L. fermentum* em tratamento com pH 2,0 + 5% de etanol, pH 3,0 + 20% de etanol e em tratamento hidroalcoólico com 22% de etanol. Em comparação com o tratamento exclusivamente com etanol, em que o uso do ácido sulfúrico é abolido, no tratamento pH 2,0 + 5% de etanol a concentração de etanol utilizada é 4,4 vezes menor porém demanda ácido sulfúrico, enquanto no tratamento pH 3,0 + 20% de etanol, utiliza-se uma quantidade um pouco menor de etanol mas ainda é necessário acrescentar ácido sulfúrico.

O tratamento com 20% de etanol foi mais eficiente que o tratamento ácido pH 2,0 (Figuras 2 e 6), reduzindo dois ciclos log a mais que o tratamento ácido (Figuras 3 e 7), o que sem dúvida é um resultado bem promissor para o controle da contaminação bacteriana. Em tratamento ácido pH 2,0, houve um aumento de aproximadamente dois ciclos log após crescimento em caldo de cana (Figura 3).

Em relação aos possíveis estresses causados pelo etanol na levedura do processo pode-se ressaltar que leveduras são significativamente bem tolerantes a altas concentrações de etanol, porém o etanol pode atuar de forma negativa no seu

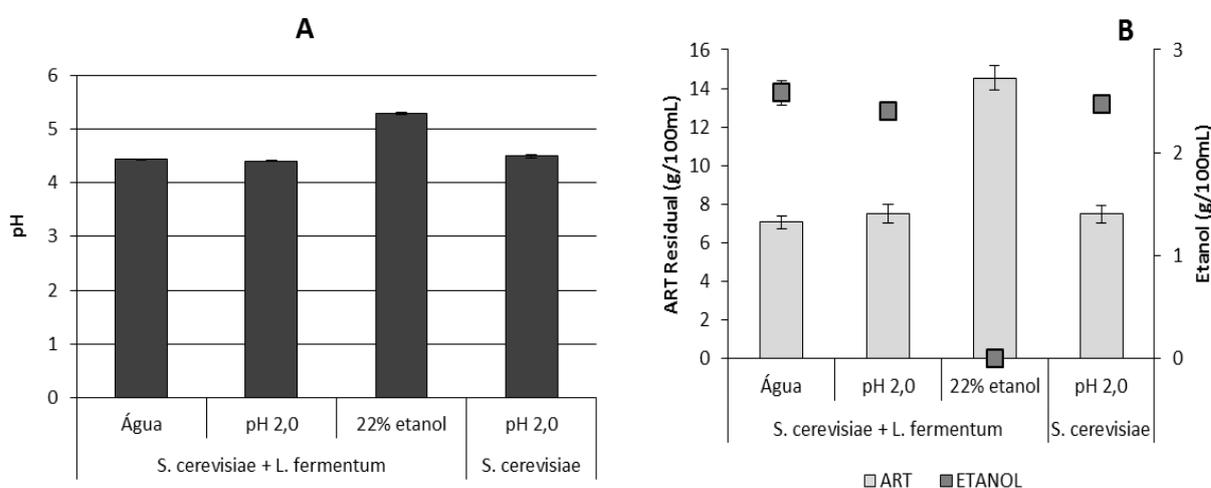
crescimento, viabilidade e capacidade fermentativa (SILVA-FILHO et al., 2005; CEBALLOS-SCHIAVONE, 2009; BASSO et al., 2011).

#### 4.5 Avaliação do tratamento celular selecionado sobre a fermentação em sistema de batelada com ciclo único

Para avaliar o efeito do tratamento celular sobre a fermentação, foi selecionado o tratamento onde ocorreu a substituição total do ácido sulfúrico por etanol, na menor concentração que causou perda total de viabilidade da bactéria *L. fermentum*: 22% de etanol. Embora no tratamento pH 3,0 + 20% etanol também tenha ocorrido perda total de viabilidade da bactéria, e se utilize uma quantidade um pouco inferior de etanol, ainda assim é necessário acrescentar ácido sulfúrico, o que não seria vantajoso.

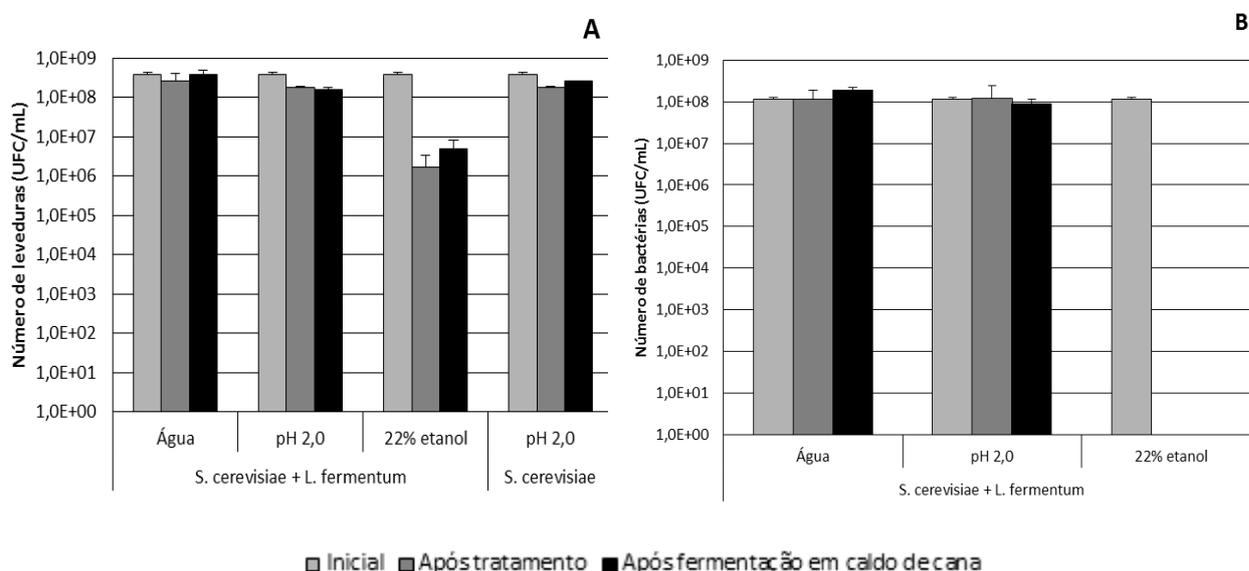
Os resultados mostraram que há um efeito do tratamento 22% etanol sobre a fermentação em relação aos controles, água e tratamento ácido pH 2,0 (Figura 8). O valor de pH variou pouco (5,3) em relação ao pH inicial (5,5) e não houve produção de etanol e consumo de açúcar redutor total.

Figura 8. Efeito do tratamento das células sobre o pH (A), açúcar redutor total residual – ART residual - e etanol (B) nas fermentações desenvolvidas em caldo de cana com cultura pura de *S. cerevisiae* e co-cultura de *S. cerevisiae* e *L. fermentum* em ciclo único de 9 horas, a 30°C, pH 5,5, 14,5 g ART inicial/100 mL, sem agitação. Tratamento das células: pH 2,0 (para a cultura pura de *S. cerevisiae* e co-cultura *S. cerevisiae* + *L. fermentum*); água e 22% etanol (para a co-cultura).



Em relação ao número de leveduras/mL, após o tratamento com 22% etanol, houve queda de cerca de 2 ciclos log. No entanto, houve perda total de viabilidade da bactéria. O número de bactérias e de leveduras teve pouca alteração nos outros tratamentos, água e pH 2,0 (Figura 9).

Figura 9. Efeito do tratamento das células no número de leveduras (A) e número de bactérias (B) nas fermentações desenvolvidas em caldo de cana com cultura pura de *S. cerevisiae* e co-cultura de *S. cerevisiae* e *L. fermentum* em ciclo único de 9 horas, a 30°C, pH 5,5, 14,5 g ART inicial/100 mL, sem agitação. Tratamento das células: pH 2,0 (para a cultura pura de *S. cerevisiae* e co-cultura *S. cerevisiae* + *L. fermentum*); água e 22% etanol (para a co-cultura).



Reis et al. (2017) observaram efeito na fermentação quando adicionaram 13% de etanol ao tratamento ácido das células (pH 2,0) em fermentação com a linhagem PE-2, contaminada com *L. fermentum* e levedura nativa.

O etanol afetou a viabilidade celular de *S. cerevisiae*, como aqui observado pela redução de 2 ciclos log no número de leveduras. O efeito maior parece ter sido sobre o processo fermentativo, pois não houve fermentação do caldo de cana após tratamento das células com 22% etanol, ainda que tenha ocorrido eliminação das bactérias.

Canetta et al. (2006), estudando o efeito do etanol sobre uma linhagem de *S. cerevisiae*, observaram pouco efeito sobre a morfologia celular até 10% de etanol dentro de 30 minutos, por meio de imagens obtidas em microscopia de força

atômica. Quando submetida a um tempo maior de exposição (uma hora) e a 20 e 30% de etanol, pode-se observar uma mudança na morfologia da membrana plasmática da levedura, sendo que as células se apresentaram encolhidas e ásperas. Acredita-se ainda que a mudança drástica na morfologia da superfície celular possa indicar maior perda na integridade da membrana, fazendo com que haja perda na viabilidade celular.

Os resultados obtidos permitem dizer que a substituição total do ácido sulfúrico por etanol não é viável devido à alta concentração (22%) que é necessária para causar perda da viabilidade da bactéria, inibindo completamente a fermentação etanólica. A substituição parcial do ácido sulfúrico por etanol só apresentou resultado comparável quanto à inibição da bactéria *L. fermentum* com o tratamento pH 3,0 + 20% etanol, igualmente uma alta concentração de etanol, ainda que com economia no uso do ácido sulfúrico. Pode-se concluir que o ácido sulfúrico é imprescindível para o controle do crescimento da bactéria, e para a perda total da viabilidade da bactéria o tratamento pH 2,0 + 5% etanol ainda é o mais vantajoso, pois apesar de demandar ácido sulfúrico, a concentração de etanol é muito menor. Costa et al. (2017) já haviam demonstrado a eficiência desse tratamento no processo fermentativo, aplicando-o nos seis ciclos em fermentação com caldo de cana esterilizado e contaminado com *L. fermentum* durante a fermentação, porém houve decréscimo na produção de etanol, embora sem afetar a eficiência fermentativa. A eficiência desse tratamento não foi ainda testada em mosto não estéril, a qual é a condição usual na indústria.

## 5 Conclusões

A bactéria *L. fermentum* apresentou diminuição da velocidade específica de crescimento máxima e aumento da fase lag em meio de cultura com etanol em concentração de até 14% v/v. Em relação ao tratamento celular, houve perda total da viabilidade celular de *L. fermentum* em tratamento com pH 2,0 + 5% etanol, pH 3,0 + 20% etanol e com 22% etanol. Houve inibição da produção de etanol, queda de dois ciclos log no número de *S. cerevisiae* e perda total de viabilidade de *L. fermentum* quando o tratamento celular foi realizado em solução hidroalcoólica com 22% etanol, o que torna esse tratamento inviável para emprego na indústria. A variação logarítmica do número de UFC/mL foi muito abaixo de 1 ciclo log até 15%

de etanol assim como para os tratamentos com pH superior a 2,0 com e sem adição de etanol. Conclui-se que o etanol é um adjuvante e não um substituto do ácido sulfúrico para o controle do crescimento da bactéria, apontando o tratamento pH 2,0 + 5% etanol como o mais econômico e eficiente.

## 6 Literatura citada

AMORIM, H. V. **Introdução à bioquímica da fermentação alcoólica**. Araras: IAA/Coordenadoria 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**. 5<sup>th</sup> 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.

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-ethanol-production-processes-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.
- 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.
- CANETTA, E.; ADYA, A. K.; WALKER, G. M. Atomic force microscopic study of the effects of ethanol on yeast cell surface morphology. **FEMS Microbiology Letters**, v. 25, p. 308-315, 2006.
- CAO, H.; WEI, D.; YANG, Y.; SHANG, Y.; LI, G.; ZHOU, Y.; MA, Q.; XU, Y. Systems-level understanding of ethanol-induced stresses and adaptation in *E. coli*. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-15, 2017.
- 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.; 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.
- COSTA, M. A. S.; CERRI, B. C.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Ethanol addition enhances acid treatment to eliminate *Lactobacillus fermentum* from the fermentation process for fuel ethanol production. **Letters in Applied Microbiology**, v. 66, p. 77-85, 2017.

- FERNANDES, M. L. M. **Efeito do etanol no crescimento de bactérias lácticas.** 1989. 128 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 1989.
- LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y.; Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 11, p. 641-649, 1981.
- MENDONÇA, A. A.; SILVA, P. K. N.; CALAZANS, T. L. S.; SOUZA, R. B.; PITS, W. B.; ELSZTEIN, C.; MORAIS JUNIOR, M. A. *Lactobacillus vini*: mechanistic response to stress by medium acidification. **Microbiology**, v. 165, p. 26-36, 2019.
- 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.
- SILVA-FILHO, E. A.; SANTOS, S. K. B.; RESENDE, A. M.; MORAIS, J. O. F.; MORAIS, Jr. M. A.; SIMÕES, D. A. Yeast population dynamics on industrial fuel ethanol fermentation processes assessed by PCR- fingerprinting. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 88, p. 13-23, 2005.
- REIS, V. R.; BASSI, A. P. G.; CARVALHO, I. G. B.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Controle de micro-organismos contaminantes da produção de etanol combustível

através de tratamento combinado de baixo ph, adição de etanol e metabissulfito de potássio. **Revista Científica UNAR**, v. 14, n. 1. p. 1-20, 2017.

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.

## **CAPÍTULO 2. EFEITO DA ADIÇÃO DE ETANOL AO TRATAMENTO ÁCIDO PARA CONTROLE DO CRESCIMENTO DE *Lactobacillus fermentum* EM MOSTO NÃO ESTÉRIL**

### **1. Resumo**

Considerando que contaminação bacteriana é um dos principais fatores que causa queda na eficiência fermentativa, que o uso de antibióticos e biocidas como formas de controle podem acarretar aumento de custo e problemas ambientais para a indústria e que 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, o presente trabalho visou avaliar a adição de 5% de etanol a solução ácida (pH 2,0) no tratamento celular em fermentação conduzida com *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2) com caldo não estéril e contaminado por *L. fermentum*. Avaliou-se também a eficiência da alternância desse tratamento celular com o tratamento pH 2,0 sem adição de etanol. Foram feitos 3 ciclos de fermentações em batelada com reciclo celular e os tratamentos entre os ciclos foram: pH 2,0; pH 2,0 + 5% etanol; pH 2,0 + 5% etanol ao final do primeiro ciclo de fermentação e pH 2,0 ao final do segundo ciclo de fermentação; pH 2,0 + 5% etanol ao final do primeiro ciclo de fermentação e pH 2,0 ao final do segundo ciclo de fermentação, com adição de *L. fermentum* somente no início do primeiro ciclo; pH

2,0 + 3 mg/L Kamoran®; Água destilada estéril. A alternância dos tratamentos celulares pH 2,0 + 5% etanol e pH 2,0 sem adição de etanol durante os ciclos de fermentação foi eficiente quando não havia alta contaminação do mosto não estéril com *L. fermentum*, pois a perda da viabilidade dessa bactéria só foi possível com o tratamento pH 2,0 + 5% etanol. A levedura *S. cerevisiae* não foi afetada pelo emprego do tratamento pH 2,0 + 5% etanol e os maiores teores alcoólicos foram obtidos quando se utilizou o etanol como adjuvante no tratamento ácido.

Palavras-chave: contaminação; etanol; tratamento ácido

## 2. Introdução

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).

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, já que todo processo é conduzido de maneira não estéril. 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. 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* (BASSO et al., 2014). Basso et al. (2014) estudaram os efeitos das bactérias *L. fermentum* e *L.*

*plantarum* 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*.

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). A maneira comum usada nas destilarias brasileiras como forma de reduzir a contaminação e floculação por bactérias é o tratamento ácido, em que o fermento é tratado em solução de ácido sulfúrico ao final de cada ciclo de fermentação. O procedimento consiste em, após a centrifugação do vinho fermentado, o fermento ser levado para uma cuba com uma solução de ácido sulfúrico (pH 2,0 a 2,5) por 2 horas para ser tratado e, em seguida, as células serem envidas para um novo ciclo fermentativo nas dornas de fermentação (WHEALS et al., 1999; BASSO et al., 2008, 2011). Dependendo do nível de contaminação das dornas e do tipo de bactéria contaminante, o tratamento com solução ácida não é suficiente, podendo requerer a adição de mais ácido ou antibióticos, o que além de comprometer a viabilidade das leveduras aumenta os custos de produção (COSTA, 2017). Assim, 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).

Os resultados obtidos anteriormente (Capítulo 1) permitiram dizer que o ácido sulfúrico é imprescindível para o controle do crescimento da bactéria, e para a perda total da viabilidade da bactéria o tratamento pH 2,0 + 5% etanol foi o mais vantajoso, pois apesar de demandar ácido sulfúrico, a concentração de etanol utilizada é bem inferior ao que seria necessário (20% etanol) se fosse utilizada solução ácida com pH 3,0. Costa et al. (2017) já haviam demonstrado a eficiência do tratamento pH 2,0 + 5% etanol no processo fermentativo, aplicando-o nos seis ciclos em fermentação com caldo de cana esterilizado e contaminado com *L. fermentum* durante a fermentação, porém houve decréscimo na produção de etanol, embora sem afetar o rendimento fermentativo. A eficiência desse tratamento não foi ainda testada em mosto não estéril, a qual é a condição usual na indústria. Desta forma, o presente trabalho objetivou avaliar o efeito do tratamento pH 2,0 + 5% etanol em fermentação em batelada com reciclo celular com a linhagem industrial de *S. cerevisiae* PE-2,

utilizando mosto não estéril e contaminado por *L. fermentum*, em alternância ou não com o tratamento ácido convencional (pH 2,0).

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1 Micro-organismos**

A linhagem de bactéria utilizada neste trabalho foi *L. fermentum* CCT5852 (ATCC19255). Foi também utilizada a linhagem de levedura industrial *S. cerevisiae* PE-2 como levedura do processo fermentativo (BASSO et al., 2008). Todas as culturas microbianas pertencem ao banco de culturas do LAMAM/CCA/UFSCar-Campus de Araras.

A bactéria está sendo mantida em meio MRS (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 ágar, 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 com o meio YPD, para dez frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 10 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 obtida ressuspendida e inoculada em caldo de cana 4°Brix, pH 5,5 por um período de 24 horas a 30°C, a 160 rpm em dez Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de caldo 4°Brix, até a obtenção de cerca de  $2 \times 10^9$  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 fracos 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  $2 \times 10^9$  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  $2 \times 10^9$  UFC/mL.

Para a fermentação as suspensões de células da levedura e das bactérias foram padronizadas para a contagem desejada (aproximadamente  $10^8$  células/mL para leveduras e  $10^8$  UFC/mL para bactérias, em concentração final) e ressuspensas em meio de fermentação constituído de caldo de cana 15°Brix (13,1 g açúcar redutor total/100 mL), pH 5,7, 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.

### **3.3 Fermentação em batelada com caldo não estéril, reciclo celular e tratamento das células**

As suspensões de células da levedura e das bactérias foram padronizadas para a contagem desejada e ressuspensas em meio de fermentação não estéril. Foi utilizado o processo de batelada simples, em Erlenmeyers de 500 mL, contendo 200 mL do meio de fermentação e inoculados com 20 mL da suspensão das células microbianas (10 mL de levedura + 10 mL de bactéria) para uma concentração final de cerca de  $1 \times 10^8$  UFC/mL de leveduras e  $1 \times 10^8$  UFC/mL de bactérias e mantidos em estufa sem agitação, a 30°C. Foram realizados 3 ciclos de fermentação de 9 horas, intercalados com o tratamento das células.

Ao término da fermentação, as células foram centrifugadas a 8000 rpm, por 10 minutos e a massa obtida foi ressuspensa em frascos Erlenmeyers de 500 mL para o tratamento celular. Foram avaliados 6 tratamentos, a seguir descritos, sendo que em cinco deles a bactéria foi inoculada (10 mL da suspensão de bactérias ressuspensas para 200 mL de caldo não estéril juntamente com a massa celular centrifugada após o final do ciclo anterior) no início de cada ciclo de fermentação e

em um deles a bactéria foi inoculada somente no início do primeiro ciclo de fermentação:

- pH 2,0 ao final de cada um dos ciclos de fermentação;
- pH 2,0 + 5% etanol ao final de cada um dos ciclos de fermentação;
- pH 2,0 + 5% etanol ao final do primeiro ciclo de fermentação e pH 2,0 ao final do segundo ciclo de fermentação;
- pH 2,0 + 5% etanol ao final do primeiro ciclo de fermentação e pH 2,0 ao final do segundo ciclo de fermentação, com adição de *L. fermentum* somente no início do primeiro ciclo;
- pH 2,0 + 3 mg/L Kamoran® ao final de cada um dos ciclos de fermentação;
- Água destilada estéril ao final de cada um dos ciclos de fermentação.

Para o tratamento pH 2,0 + 3 mg/L Kamoran®, foram utilizados frascos contendo 200 mL (volume final) de solução ácida (pH 2,0) e 2,0 mL da solução estoque de Kamoran® (concentração final de 3 mg/L). Para a solução estoque, pesou-se 0,03 g do produto, diluindo-se em algumas gotas de etanol, e completando a seguir com 100 mL de água destilada estéril (concentração 300 mg/L).

Para o tratamento ácido com 5% de etanol, foi utilizada a solução ácida (pH 2,0) esterilizada (190 mL) para a qual foram transferidos 10 mL de etanol absoluto equivalente a uma concentração final de 5% (v/v).

Em todos os tratamentos, os frascos foram mantidos a 30°C, 160 rpm, por 2 horas.

Após os tratamentos celulares, a massa celular foi centrifugada a 8000 rpm, por 10 minutos e inoculada em meio de fermentação não estéril para um novo ciclo fermentativo.

### 3.4 Análises

Foi retirado 1 mL de amostra do meio de fermentação no início do ciclo 1 (inicial) e ao final dos ciclos 1, 2 e 3, 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, 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). 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 nistatina (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 ( $10^{-2}$ ,  $10^{-1}$  e sem diluição), em duplicata, para cada uma das repetições das fermentações.

### 3.4.2 Análises físico-químicas

Após a centrifugação do meio fermentado e separação das células microbianas, 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 mol/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<sup>®</sup>). 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

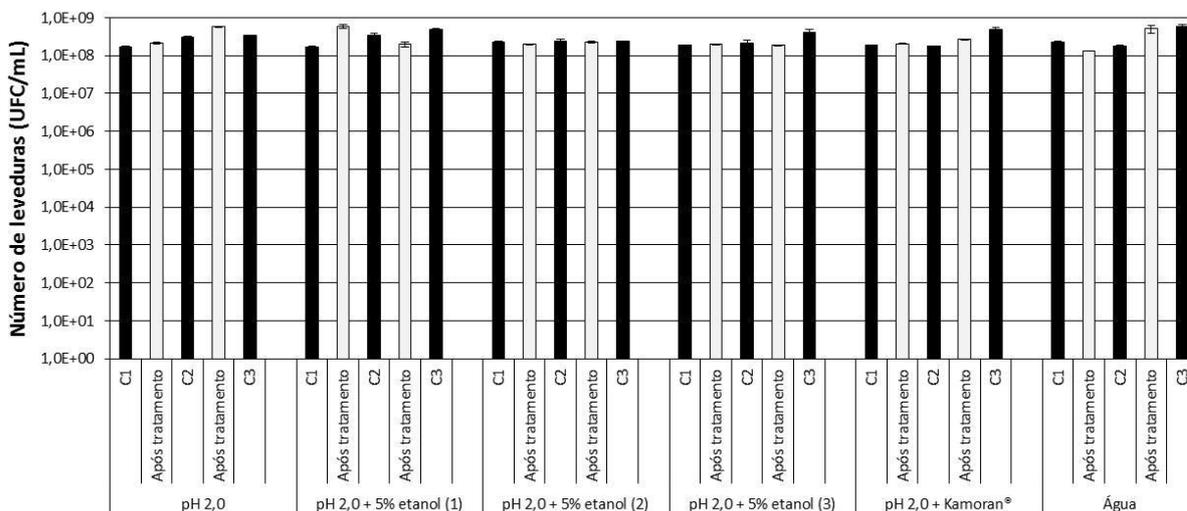
O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com três repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância e a diferença entre as médias de tratamentos foi avaliada pelo teste de Tukey a 5%, utilizando-se o software R.

## 4. Resultados e Discussão

Os resultados apresentados na Figura 1 mostraram que nenhum dos tratamentos celulares teve efeito sobre a viabilidade da levedura PE-2, sem grandes variações no número de UFC/mL até o final do terceiro ciclo.

Em relação ao número de bactérias, quando se utilizou o tratamento pH 2,0, houve redução de cerca de 5 ciclos log após o tratamento ao final do primeiro e segundo ciclos de fermentação. No entanto, quando se utilizou o tratamento pH 2,0 + 5% etanol em todos os ciclos de fermentação, houve perda total de viabilidade das bactérias ao final do tratamento nos dois ciclos fermentativos. Aplicando-se esse tratamento somente ao final do primeiro ciclo de fermentação, houve perda total de viabilidade após o primeiro ciclo de tratamento, mas detectou-se um número de cerca de  $10^3$  UFC/mL de bactérias após o tratamento com pH 2,0 no segundo ciclo fermentativo. Desta forma, o número de bactérias aumentou ao final do terceiro ciclo de fermentação, provavelmente em decorrência da sobrevivência de bactérias na massa tratada com pH 2,0 (Figura 2).

Figura 1. Número de leveduras (UFC/mL) nas fermentações desenvolvidas com *S. cerevisiae* ao longo de três ciclos fermentativos (C1 a C3) de 9 horas, a 30°C, pH inicial 5,7, em caldo de cana (13,1 g ART/100 mL) não estéril inoculado com *L. fermentum*, utilizando diferentes tratamentos das células ao final de cada ciclo de fermentação<sup>1</sup>. Concentração inicial de leveduras:  $1,1 \times 10^8$  UFC/mL.



<sup>1</sup> Tratamentos das células:

pH 2,0: pH 2,0 ao final de cada ciclo de fermentação;

pH 2,0 + 5% etanol (1): pH 2,0 + 5% etanol ao final de cada ciclo de fermentação;

pH 2,0 + 5% etanol (2): pH 2,0 + 5% etanol ao final do primeiro ciclo de fermentação e pH 2,0 ao final do segundo ciclo;

pH 2,0 + 5% etanol (3): pH 2,0 + 5% etanol ao final do primeiro ciclo de fermentação e pH 2,0 ao final do segundo ciclo, com inoculação de *L. fermentum* no caldo de cana somente no primeiro ciclo;

pH 2,0 + Kamoran®: pH 2,0 + Kamoran® ao final de cada ciclo de fermentação;

Água: água destilada estéril ao final de cada ciclo de fermentação.

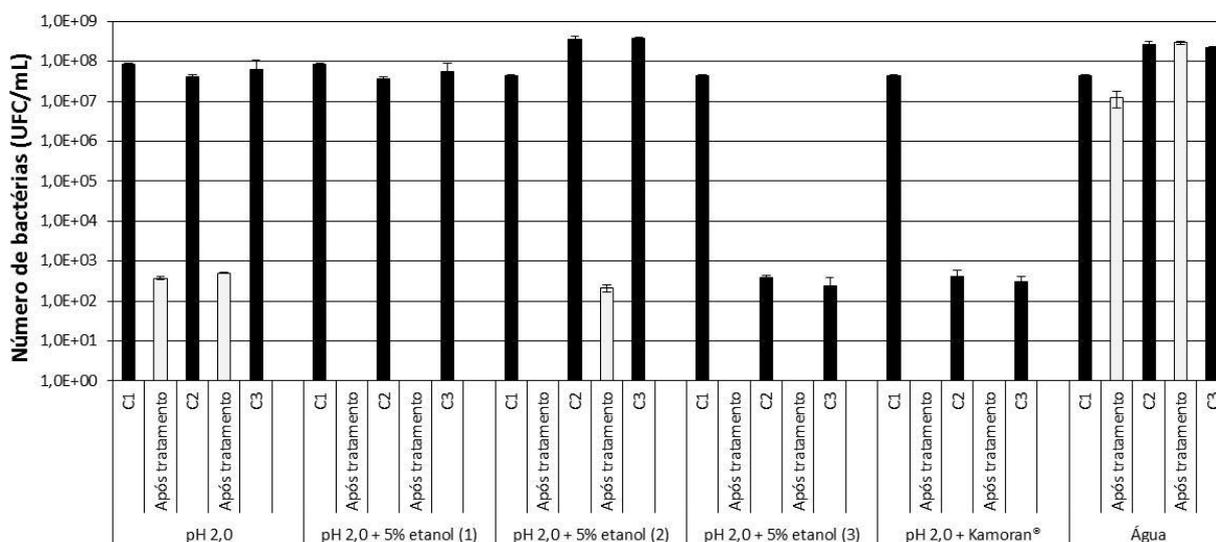
Quando foi utilizado o tratamento pH 2,0 + 5% etanol somente ao final do primeiro ciclo de fermentação e sem inoculação de *L. fermentum* nos demais ciclos, houve perda total de viabilidade das bactérias ao final de todos os ciclos de tratamento, mesmo utilizando-se pH 2,0 no segundo ciclo de tratamento. O número de bactérias ao final dos ciclos fermentativos foi por volta de  $10^3$  UFC/mL de bactérias, constituído unicamente de bactérias nativas do caldo, uma vez que não foi inoculada a bactéria *L. fermentum* no início do segundo e terceiro ciclos de fermentação. Esse resultado demonstra que as bactérias nativas do caldo perdem a viabilidade quando se utiliza o tratamento pH 2,0 e pH 2,0 + 5% etanol. O número de bactérias nativas do caldo utilizado nos experimentos foi de  $2,8 \times 10^2$  UF/mL.

Com o tratamento pH 2,0 + Kamoran®, houve perda total da viabilidade das bactérias ao final de cada ciclo de tratamento, no entanto, verifica-se que o número

de bactérias ao final de cada ciclo de fermentação ( $\sim 10^3$  UFC/mL) é muito inferior ao que deveria apresentar ( $10^7$  UFC/mL), uma vez que foi inoculada a bactéria *L. fermentum* em todos os ciclos de fermentação. Acredita-se que deve ter havido um efeito residual do antibiótico sobre as bactérias durante a fermentação, já que as células não foram lavadas após o tratamento celular, carregando provavelmente resíduos do antibiótico para dentro do frasco de fermentação com mosto (Figura 2).

O tratamento com água destilada estéril mostrou que houve aumento do número de bactérias, considerando-se o número de bactérias inicial ( $7,0 \times 10^7$  UFC/mL) e ao final do terceiro ciclo fermentativo ( $2,0 \times 10^8$  UFC/mL), Figura 2.

Figura 2. Número de bactérias (UFC/mL) nas fermentações desenvolvidas com *S. cerevisiae* ao longo de três ciclos fermentativos (C1 a C3) de 9 horas, a  $30^\circ\text{C}$ , pH inicial 5,7, em caldo de cana (13,1 g ART/100 mL) não estéril inoculado com *L. fermentum*, utilizando diferentes tratamentos das células ao final de cada ciclo de fermentação<sup>1</sup>. Concentração inicial de bactérias:  $7,0 \times 10^7$  UFC/mL.



<sup>1</sup> Tratamentos das células:

pH 2,0: pH 2,0 ao final de cada ciclo de fermentação;

pH 2,0 + 5% etanol (1): pH 2,0 + 5% etanol ao final de cada ciclo de fermentação;

pH 2,0 + 5% etanol (2): pH 2,0 + 5% etanol ao final do primeiro ciclo de fermentação e pH 2,0 ao final do segundo ciclo;

pH 2,0 + 5% etanol (3): pH 2,0 + 5% etanol ao final do primeiro ciclo de fermentação e pH 2,0 ao final do segundo ciclo, com inoculação de *L. fermentum* no caldo de cana somente no primeiro ciclo;

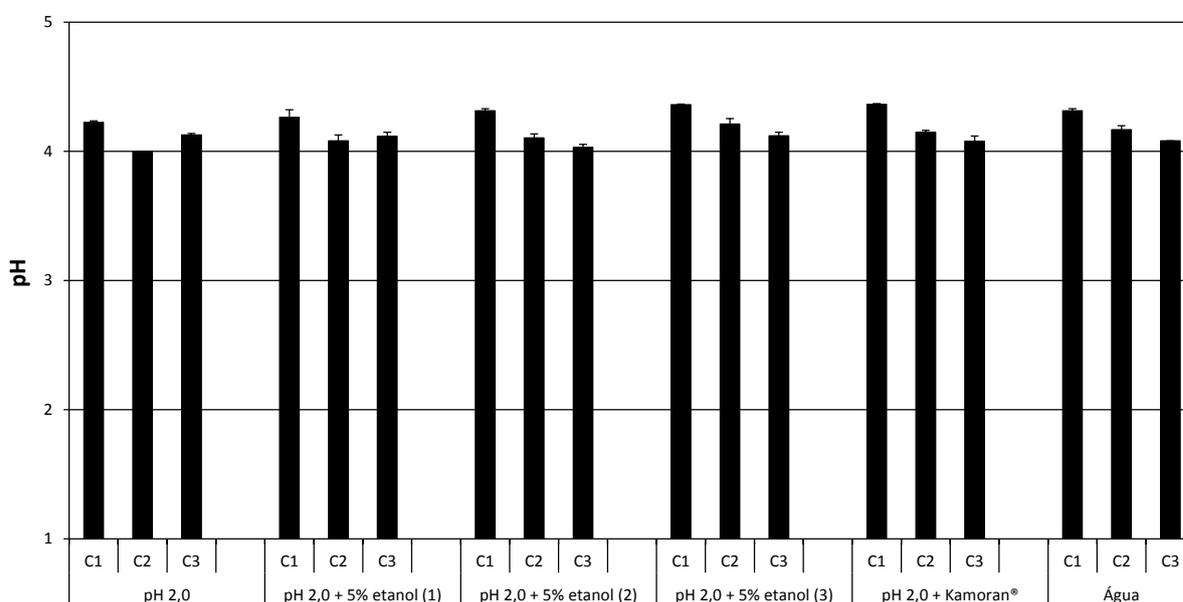
pH 2,0 + Kamoran®: pH 2,0 + Kamoran® ao final de cada ciclo de fermentação;

Água: água destilada estéril ao final de cada ciclo de fermentação.

Costa et al. (2017), estudando a adição de 5% de etanol ao tratamento ácido em caldo estéril contaminando o primeiro ciclo de fermentação com *L. fermentum*, mostraram que a bactéria perdeu totalmente sua viabilidade ao final do primeiro tratamento, não retomando o crescimento ao longo de 6 ciclos de fermentação, diferentemente de quando se utilizou o tratamento pH 2,0, onde houve diminuição de somente 3 ciclos log ao final do sexto ciclo.

As Figuras 3 e 4 mostram os resultados de pH, teor alcoólico e de açúcar redutor total no meio de fermentação, ao final de cada ciclo de fermentação, utilizando os diversos tratamentos das células. A Tabela 1 demonstra a comparação entre médias de pH, teor alcoólico e de açúcar redutor total ao final do terceiro ciclo de fermentação utilizando o teste de Tukey. As tabelas de análise de variância encontram-se no Apêndice.

Figura 3. pH do caldo de cana nas fermentações desenvolvidas com *S. cerevisiae* ao longo de três ciclos fermentativos (C1 a C3) de 9 horas, a 30°C, pH inicial 5,7, em caldo de cana (13,1 g ART/100 mL) não estéril inoculado com *L. fermentum*, utilizando diferentes tratamentos das células ao final de cada ciclo de fermentação<sup>1</sup>.



<sup>1</sup> Tratamentos das células:

pH 2,0: pH 2,0 ao final de cada ciclo de fermentação;

pH 2,0 + 5% etanol (1): pH 2,0 + 5% etanol ao final de cada ciclo de fermentação;

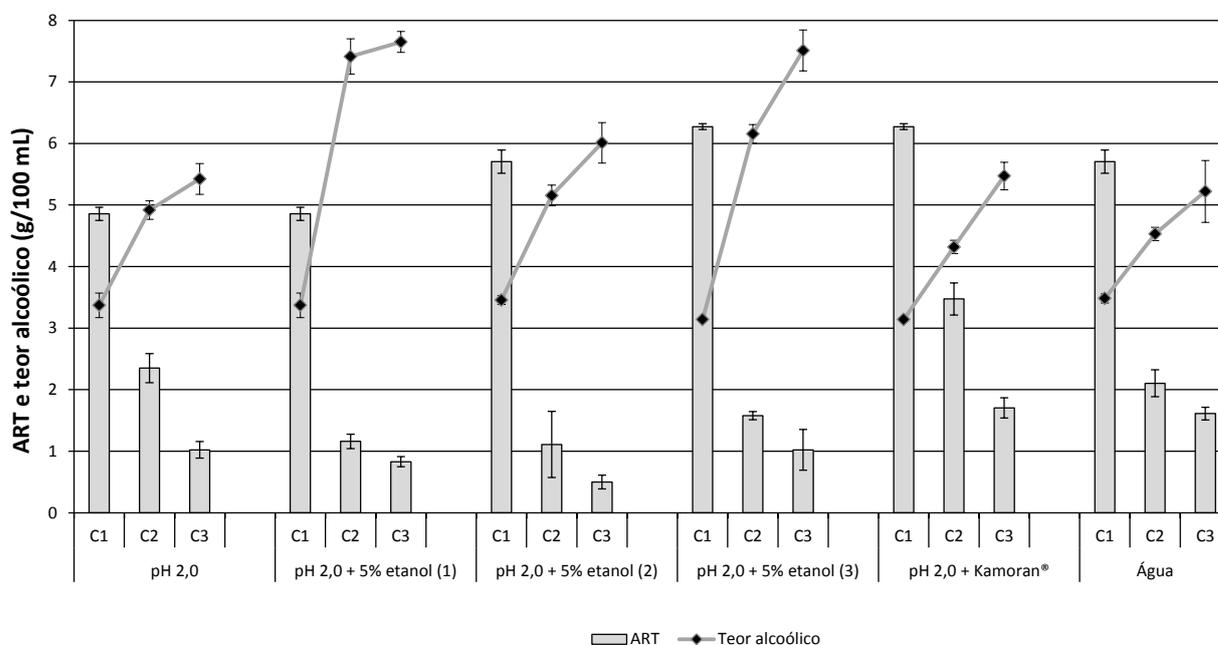
pH 2,0 + 5% etanol (2): pH 2,0 + 5% etanol ao final do primeiro ciclo de fermentação e pH 2,0 ao final do segundo ciclo;

pH 2,0 + 5% etanol (3): pH 2,0 + 5% etanol ao final do primeiro ciclo de fermentação e pH 2,0 ao final do segundo ciclo, com inoculação de *L. fermentum* no caldo de cana somente no primeiro ciclo;

pH 2,0 + Kamoran®: pH 2,0 + Kamoran® ao final de cada ciclo de fermentação;

Água: água destilada estéril ao final de cada ciclo de fermentação.

Figura 4. Açúcar redutor total – ART – e teor alcóolico (g/100 mL) nas fermentações desenvolvidas com *S. cerevisiae* ao longo de três ciclos fermentativos (C1 a C3) de 9 horas, a 30°C, pH inicial 5,7, em caldo de cana (13,1 g ART/100 mL) não estéril inoculado com *L. fermentum*, utilizando diferentes tratamentos das células ao final de cada ciclo de fermentação<sup>1</sup>.



<sup>1</sup> Tratamentos das células:

pH 2,0: pH 2,0 ao final de cada ciclo de fermentação;

pH 2,0 + 5% etanol (1): pH 2,0 + 5% etanol ao final de cada ciclo de fermentação;

pH 2,0 + 5% etanol (2): pH 2,0 + 5% etanol ao final do primeiro ciclo de fermentação e pH 2,0 ao final do segundo ciclo;

pH 2,0 + 5% etanol (3): pH 2,0 + 5% etanol ao final do primeiro ciclo de fermentação e pH 2,0 ao final do segundo ciclo, com inoculação de *L. fermentum* no caldo de cana somente no primeiro ciclo;

pH 2,0 + Kamoran®: pH 2,0 + Kamoran® ao final de cada ciclo de fermentação;

Água: água destilada estéril ao final de cada ciclo de fermentação.

Em relação ao pH do meio de fermentação ao final do terceiro ciclo fermentativo, houve diferença estatística significativa entre os tratamentos celulares a nível de 5%, Tabela 1. Os menores valores (4,03 a 4,08) foram obtidos nas fermentações onde foram utilizados os tratamentos celulares pH 2,0 + 5% etanol somente após o primeiro ciclo de fermentação, pH 2,0 + Kamoran® e água. No entanto, os valores de pH variaram dentro de uma faixa muito estreita, 4,03 a 4,13.

As fermentações se desenvolvem numa faixa de pH entre 4 e 5. A diminuição gradual ao longo da fermentação se deve principalmente à excreção de ácidos orgânicos, absorção de aminoácidos básicos, excreção de dióxido de carbono e absorção de fosfato (COOTE; KIRSOP, 1976; LIMA et al., 2001).

Tabela 1. Comparação entre médias de pH, teor alcoólico e de açúcar redutor total (ART) ao final do terceiro ciclo fermentativo nos diferentes tratamentos celulares utilizando o teste de Tukey ao nível de 5% de significância<sup>1</sup>.

Tratamento Celular	pH	Teor alcoólico (g/100 mL)	ART (g/100 mL)
pH 2,0 ao final de cada ciclo de fermentação	4,13 a	5,42 b	1,02 b
pH 2,0 + 5% etanol ao final de cada ciclo de fermentação	4,12 a	7,65 a	0,83 b
pH 2,0 + 5% etanol ao final do primeiro ciclo de fermentação e pH 2,0 ao final do segundo ciclo	4,03 b	6,01 b	0,50 b
pH 2,0 + 5% etanol ao final do primeiro ciclo de fermentação e pH 2,0 ao final do segundo ciclo, com inoculação de <i>L. fermentum</i> no caldo de cana somente no primeiro ciclo	4,12 a	7,51 a	1,02 b
pH 2,0 + Kamoran® ao final de cada ciclo de fermentação	4,08 ab	5,47 b	1,70 a
água destilada estéril ao final de cada ciclo de fermentação	4,08 ab	5,22 b	1,61 a

<sup>1</sup> Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ )

Em relação ao teor alcoólico (Figura 4), houve uma maior produção de etanol no segundo e terceiro ciclos de fermentação quando as células foram tratadas com pH 2,0 + 5% de etanol, seja somente no primeiro ou em todos os ciclos. Dentre os três tratamentos onde pH 2,0 + 5% etanol foi utilizado, aquele que apresentou menor produção de etanol no segundo e terceiro ciclos de fermentação foi aquele em que houve inoculação de *L. fermentum* no início de cada ciclo, mas o tratamento com pH 2,0 + 5% etanol só foi utilizado após o primeiro ciclo fermentativo, seguido de pH 2,0 nos demais. Nessa situação, houve sobrevivência de cerca de  $10^3$  UFC/mL de bactérias após o tratamento com pH 2,0 no segundo ciclo fermentativo (Figura 2), o que provavelmente teve efeito sobre a produção de etanol.

Houve diferença estatística entre as médias de teor alcoólico ao final do terceiro ciclo fermentativo, sendo as maiores médias encontradas nos tratamentos

pH 2,0 + 5% etanol aplicado em todos os ciclos e pH 2,0 + 5% etanol aplicado somente no primeiro ciclo, porém sem inoculação de *L. fermentum* no início dos ciclos seguintes. Esse resultado demonstra o efeito da contaminação por *L. fermentum* no processo fermentativo e a eficiência do tratamento pH 2,0 + 5% etanol em eliminar essa bactéria ao mesmo tempo que garante alta produção de etanol.

Não houve diferença significativa entre as médias de teor alcoólico nas fermentações onde foram utilizados os tratamentos pH 2,0, pH 2,0 + Kamoran® e água (Tabela 1). Sem utilização de ácido e etanol, somente água, houve aumento do número de bactérias e diminuição do teor alcoólico, o que era esperado. Com pH 2,0 somente, houve prejuízo à produção de etanol pois esse tratamento não foi capaz de eliminar as bactérias embora tenha havido uma redução de 5 ciclos log após o tratamento, considerando-se ainda que o mosto não era estéril.

No tratamento pH 2,0 + Kamoran® houve efeito residual do antibiótico sobre as bactérias na fermentação, como já discutido anteriormente, causando morte das bactérias (Figura 2). Nessa situação, pode ter ocorrido autólise das células bacterianas. Nesse caso, substâncias de baixo peso molecular como nucleotídeos e ácidos graxos e materiais de parede celular de alto peso molecular como mananas e glucanos, são liberadas no meio de fermentação, podendo afetar a parede celular das células de leveduras, ocasionando impacto no processo fermentativo (BOULTON; QUAIN, 2001; CECCATO-ANTONINI, 2018). A autólise de células microbianas ocasionada pelo uso de antimicrobianos na fermentação ainda é uma questão que demanda estudos mais aprofundados.

Em relação à concentração de açúcar redutor total no meio de fermentação, houve diferença significativa entre as médias obtidas ao final do terceiro ciclo fermentativo, de forma que os maiores valores foram observados nos tratamentos pH 2,0 + Kamoran® e água. Nos demais tratamentos celulares, o açúcar redutor total residual variou de 0,5 a 1,02 g/100 mL (Figura 4).

Os resultados demonstraram a eficiência do tratamento pH 2,0 + 5% etanol no controle da contaminação por *L. fermentum* em fermentação com mosto não estéril. Sem a presença de *L. fermentum* em concentração elevada como  $10^7$  UFC/mL, mesmo em mosto não estéril, pode-se manter a produção de etanol em níveis elevados empregando-se o tratamento celular pH 2,0 sem adição de etanol. No entanto, com *L. fermentum*, há necessidade de adicionar etanol ao tratamento ácido.

## 5. Conclusões

A alternância dos tratamentos celulares pH 2,0 + 5% etanol e pH 2,0 sem adição de etanol durante os ciclos de fermentação é eficiente se não houver alta contaminação do mosto não estéril com *L. fermentum*, pois a perda da viabilidade dessa bactéria só é possível com o tratamento pH 2,0 + 5% etanol. A levedura *S. cerevisiae* não é afetada pelo emprego do tratamento pH 2,0 + 5% etanol e os maiores teores alcoólicos foram obtidos quando se utilizou o etanol como adjuvante no tratamento ácido.

## 6. Literatura citada

AMORIM, H. V. **Introdução à bioquímica da fermentação alcoólica**. Araras:

IAA/Cordenadoria Regional Sul, 1997.

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, 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.

BOULTON, R.; QUAIN, D. **Brewing yeast and fermentation**. London: Blackwell Science Ltd., 207 p, 2001.

- 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. Conventional and nonconventional strategies for controlling bacterial contamination in fuel ethanol fermentations. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 80, p. 24-34, 2018.
- 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.
- COSTA, M. A. S. **Efeito do sistema de fermentação e da adição de etanol ao tratamento ácido do fermento sobre a fermentação alcóolica contaminada com *Lactobacillus* sp.** 2017. 99 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, Araras, SP, Brasil, 2017.
- COSTA, M. A. S.; CERRI, B. C.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Ethanol addition enhances acid treatment to eliminate *Lactobacillus fermentum* from the fermentation process for fuel ethanol production. **Letters in Applied Microbiology**, v. 66, p. 77-85, 2017.
- 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.
- 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.
- 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. Título do capítulo: **PRODUÇÃO DE ETANOL**. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotechnology Industrial. Processos Fermentativos e Enzimáticos*. São Paulo, Ed. Edgard Blucher, v. 3, 2001.
- 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.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.
- 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

A substituição total do ácido sulfúrico por etanol não é viável devido à alta concentração (22%) que é necessária para causar perda da viabilidade da bactéria, inibindo completamente a fermentação etanólica. A substituição parcial do ácido sulfúrico por etanol só apresentou resultado comparável quanto à inibição da bactéria *L. fermentum* com o tratamento pH 3,0 + 20% etanol, igualmente uma alta concentração de etanol, ainda que com economia no uso do ácido sulfúrico. Pode-se concluir que o etanol é um adjuvante no controle do crescimento da bactéria, e para a perda total da viabilidade da bactéria o tratamento pH 2,0 + 5% etanol ainda é o mais vantajoso, pois apesar de demandar ácido sulfúrico, a concentração de etanol é muito menor.

Sendo assim, quando esse tratamento (pH 2,0 + 5% de etanol) foi utilizado em um contexto mais próximo ao da indústria, utilizando caldo não estéril, os resultados demonstraram a eficiência do tratamento no controle da contaminação por *L. fermentum*, com perda total de viabilidade celular. Sem a presença de *L. fermentum* em concentração tão elevada como  $10^7$  UFC/mL, mesmo em mosto não estéril, pode-se manter a produção de etanol em altos níveis empregando-se o tratamento celular pH 2,0 sem adição de etanol. No entanto, com *L. fermentum*, há necessidade de adicionar etanol ao tratamento ácido. A levedura *S. cerevisiae* não é afetada pelo emprego do tratamento pH 2,0 + 5% etanol e os maiores teores

alcoólicos foram obtidos quando se utilizou o etanol como adjuvante no tratamento ácido.

Os resultados aqui obtidos permitem indicar o tratamento pH 2,0 + 5% etanol como uma opção para o controle da contaminação por *L. fermentum* em mosto não estéril, em fermentação com reciclo celular. Com a perda da viabilidade celular dessa bactéria e sem que haja recontaminação por *L. fermentum*, o tratamento pH 2,0 sem adição de etanol pode ser mantido para controle das bactérias nativas do caldo nos ciclos fermentativos.

## APÊNDICE

Tabela 1. Análise de variância dos valores de pH do meio de fermentação ao final do 3º ciclo nas fermentações desenvolvidas com *S. cerevisiae* ao longo de três ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, pH inicial 5,7, em caldo de cana não estéril inoculado com *L. fermentum*, utilizando diferentes tratamentos das células ao final de cada ciclo de fermentação<sup>1</sup>.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	5	0,0217	0,0043	6,46*
Resíduo	12	0,0081	0,0007	
TOTAL	17	0,0298		

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

<sup>1</sup> Tratamentos das células:

pH 2,0: pH 2,0 ao final de cada ciclo de fermentação;

pH 2,0 + 5% etanol (1): pH 2,0 + 5% etanol ao final de cada ciclo de fermentação;

pH 2,0 + 5% etanol (2): pH 2,0 + 5% etanol ao final do primeiro ciclo de fermentação e pH 2,0 ao final do segundo ciclo;

pH 2,0 + 5% etanol (3): pH 2,0 + 5% etanol ao final do primeiro ciclo de fermentação e pH 2,0 ao final do segundo ciclo, com inoculação de *L. fermentum* no caldo de cana somente no primeiro ciclo;

pH 2,0 + Kamoran®: pH 2,0 + Kamoran® ao final de cada ciclo de fermentação;

Água: água destilada estéril ao final de cada ciclo de fermentação.

Tabela 2. Análise de variância dos valores de teor alcoólico (g/100 mL) do meio de fermentação ao final do 3º ciclo nas fermentações desenvolvidas com *S. cerevisiae* ao longo de três ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, pH inicial 5,7, em caldo de cana não estéril inoculado com *L. fermentum*, utilizando diferentes tratamentos das células ao final de cada ciclo de fermentação<sup>1</sup>.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento	5	17,847	3,569	34,912*
Resíduo	12	1,227	0,102	
TOTAL	17	19,074		

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

<sup>1</sup> Tratamentos das células:

pH 2,0: pH 2,0 ao final de cada ciclo de fermentação;

pH 2,0 + 5% etanol (1): pH 2,0 + 5% etanol ao final de cada ciclo de fermentação;

pH 2,0 + 5% etanol (2): pH 2,0 + 5% etanol ao final do primeiro ciclo de fermentação e pH 2,0 ao final do segundo ciclo;

pH 2,0 + 5% etanol (3): pH 2,0 + 5% etanol ao final do primeiro ciclo de fermentação e pH 2,0 ao final do segundo ciclo, com inoculação de *L. fermentum* no caldo de cana somente no primeiro ciclo;

pH 2,0 + Kamoran®: pH 2,0 + Kamoran® ao final de cada ciclo de fermentação;

Água: água destilada estéril ao final de cada ciclo de fermentação.

Tabela 3. Análise de variância dos valores de ART (g/100 mL) do meio de fermentação ao final do 3º ciclo nas fermentações desenvolvidas com *S. cerevisiae* ao longo de três ciclos fermentativos de 9 horas, a 30°C, pH inicial 5,7, em caldo de cana não estéril inoculado com *L. fermentum*, utilizando diferentes tratamentos das células ao final de cada ciclo de fermentação<sup>1</sup>.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Tratamento	5	320,574	64,115	13,86*
Resíduo	12	55,496	4,625	
TOTAL	17	376,070		

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

<sup>1</sup> Tratamentos das células:

pH 2,0: pH 2,0 ao final de cada ciclo de fermentação;

pH 2,0 + 5% etanol (1): pH 2,0 + 5% etanol ao final de cada ciclo de fermentação;

pH 2,0 + 5% etanol (2): pH 2,0 + 5% etanol ao final do primeiro ciclo de fermentação e pH 2,0 ao final do segundo ciclo;

pH 2,0 + 5% etanol (3): pH 2,0 + 5% etanol ao final do primeiro ciclo de fermentação e pH 2,0 ao final do segundo ciclo, com inoculação de *L. fermentum* no caldo de cana somente no primeiro ciclo;

pH 2,0 + Kamoran®: pH 2,0 + Kamoran® ao final de cada ciclo de fermentação;

Água: água destilada estéril ao final de cada ciclo de fermentação.