



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

**UTILIZAÇÃO DO METABISSULFITO DE POTÁSSIO NO  
PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ETANÓLICA PARA  
CONTROLE DE LEVEDURAS E BACTÉRIAS  
CONTAMINANTES**

**ANNA LÍVIA PARALUPPI**

**Araras  
2017**



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

**UTILIZAÇÃO DO METABISSULFITO DE POTÁSSIO NO  
PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ETANÓLICA PARA  
CONTROLE DE LEVEDURAS E BACTÉRIAS  
CONTAMINANTES**

**ANNA LÍVIA PARALUPPI**

**ORIENTADOR: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Sandra Regina Ceccato Antonini**

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

Araras

2017

Paraluppi, Anna Livia

UTILIZAÇÃO DO METABISSULFITO DE POTÁSSIO NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ETANÓLICA PARA CONTROLE DE LEVEDURAS E BACTÉRIAS CONTAMINANTES / Anna Livia Paraluppi. -- 2017.

67 f. : 30 cm.

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

Orientador: Sandra Regina Ceccato Antonini

Banca examinadora: Margareth Batistote, Reinaldo Gaspar Bastos

Bibliografia

undefined 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)



# UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

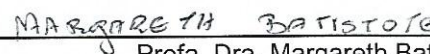
---


## Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Anna Livia Paraluppi, realizada em 11/04/2017:

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini  
UFSCar

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Margareth Batistote  
UEMS

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos  
UFSCar

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora, Prof.<sup>a</sup>. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini, por quem tenho extrema admiração, pela dedicação, compromisso e confiança que dispôs para esta aluna. Agradeço sua paciência e seus valorosos ensinamentos.

Aos professores e funcionários da Universidade Federal de São Carlos, *campus* de Araras, do Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados.

Aos professores do LAMAM, Profa. Dra. Silvana Perissatto Meneghin e Profa. Dra. Márcia Maria Rosa Magri, pelo acolhimento, carinho e dedicação aos alunos.

Agradeço também a todos do LAMAM, em especial minhas amigas Ana Paula, Vanda, Bianca, Amanda, Letícia, Ligianne, Jéssica e a Técnica Lucinha, pela ajuda durante todos esses anos de trabalho e estudo.

Agradeço também a Usina São João, Araras-SP, por ter aberto as portas da indústria para a coleta das amostras.

À minha família pela compreensão, carinho, paciência, amor e principalmente pela dedicação e apoio aos meus estudos.

Ao meu noivo, amigo e companheiro Rodolpho, pela paciência, ajuda e amor dedicados a mim nos dias mais difíceis.

Ao Centro de Ciências Agrárias – CCA/UFSCar, pelo acolhimento e por me presentear com amigos que sempre estarão presentes na minha vida, em especial Gisele, Afra e Carolina.

## 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    O processo industrial para produção de etanol combustível.....	05
2    Micro-organismos contaminantes da fermentação etanólica.....	07
3    Utilização do dióxido de enxofre no controle de contaminações microbianas.....	11
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	16
<b>CAPÍTULO 1. Efeito da adição de metabissulfito de potássio ao caldo de cana para controle do crescimento de bactérias e leveduras nativas</b> .....	25
1    Resumo.....	25
2    Introdução.....	26
3    Materiais e Métodos.....	27
3.1    Coleta das amostras de caldo, amostragens e plaqueamento.	27
3.2    Análise dos resultados.....	28
4    Resultados e Discussão.....	28
5    Conclusões.....	36
6    Literatura citada.....	36
<b>CAPÍTULO 2. Efeito da adição de metabissulfito de potássio ao tratamento ácido do fermento no controle do crescimento de <i>Dekkera bruxellensis</i> e <i>Lactobacillus fermentum</i></b> .....	38
1    Resumo.....	38
2    Introdução.....	39
3    Materiais e Métodos.....	40
3.1    Micro-organismos.....	40

3.2	Determinação da concentração mínima inibitória de MBP adicionado ao tratamento ácido do fermento para controle do crescimento de <i>D. bruxellensis</i> .....	41
3.3	Efeito do MBP adicionado ao tratamento ácido do fermento para controle do crescimento de <i>D. bruxellensis</i> e <i>L. fermentum</i> em co-cultura com <i>S. cerevisiae</i> em fermentação em batelada com reciclo celular.....	42
4	Resultados e Discussão.....	45
4.1	Determinação da concentração mínima inibitória de MBP adicionado ao tratamento ácido do fermento para controle do crescimento de <i>D. bruxellensis</i> .....	45
4.2	Efeito do MBP adicionado ao tratamento ácido do fermento para controle do crescimento de <i>D. bruxellensis</i> e <i>L. fermentum</i> em co-cultura com <i>S. cerevisiae</i> em fermentação em batelada com reciclo celular.....	48
5	Conclusões.....	53
6	Literatura citada.....	54
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	56

## ÍNDICE DE TABELAS

Página

### Capítulo 1

Tabela 1. Máxima redução logarítmica do número de bactérias nativas e respectivo tempo de incubação com MBP (entre parênteses) das amostras de caldo bruto coletadas na Usina São João, Araras – SP, durante as safras 2015/2016 e 2016/2017.....	35
Tabela 2. Máxima redução logarítmica do número de leveduras nativas e respectivo tempo de incubação com MBP (entre parênteses) das amostras de caldo bruto coletadas na Usina São João, Araras – SP, durante as safras 2015/2016 e 2016/2017.....	35



## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema da fermentação etanólica com batelada alimentada e reciclo celular no Brasil.....	06
Figura 2. Formas e concentração de SO <sub>2</sub> ao longo da faixa de pH, variando de 0 a 10. Os retângulos destacam a faixa de pH onde as etapas de tratamento ácido do fermento e a fermentação se desenvolvem durante o processo industrial.....	12

### Capítulo 1

Figura 1. Número de UFC/mL de bactérias ao longo de 9 horas de incubação das amostras de caldo bruto coletadas na Usina São João, Araras – SP, das safras 2015/2016 e 2016/2017, com MBP em concentrações variando de 0 a 800 mg/L, a 30°C, 160 rpm. As datas indicadas em cada gráfico referem-se ao dia da coleta da amostra de caldo.....	29
Figura 2. Fotos das placas com meio Ágar Nutriente inoculadas com caldo de cana bruto (amostra coletada em 12/07/2015) para avaliar o crescimento de bactérias nativas, durante 9 horas de contato com MBP em concentrações de 0, 75 e 150 mg/L, a 30°C, 160 rpm. Os círculos em vermelho apontam colônias diferentes de bactérias, nos diferentes tempos de incubação, na mesma concentração de metabissulfito. Todas as placas são da diluição 10 <sup>-5</sup> .....	30
Figura 3. Número de UFC/mL de leveduras ao longo de 9 horas de incubação das amostras de caldo bruto coletadas na Usina São João, Araras – SP, das safras 2015/2016 e 2016/2017, com MBP em concentrações variando de 0 a 800 mg/L, a 30°C, 160 rpm. As datas indicadas em cada gráfico referem-se ao dia da coleta da amostra de caldo.....	33

### Capítulo 2

Figura 1. Número de UFC/mL de <i>D. bruxellensis</i> antes do tratamento ácido adicionado ou não de metabissulfito de potássio (MBP) em concentrações variando de 50 a 250 mg/L, após o tratamento e após fermentação em caldo de cana por 12 horas.....	46
Figura 2. Regressão da redução logarítmica do número de <i>D. bruxellensis</i> em função da concentração de MBP adicionado ao tratamento ácido.....	47
Figura 3. Produção de etanol após fermentação e número de micro-organismos antes do tratamento ácido das células (pH 2,0) acrescido ou não de 225 mg/L de MBP, depois do tratamento e depois da fermentação em caldo de cana 16°Brix, a 30°C, por 9 horas, pH inicial 4,5. 'Inicial' refere-se aos resultados antes do tratamento ácido das células.....	49

- Figura 4. Número de micro-organismos em fermentação em batelada com co-cultura de *S. cerevisiae*, *D. bruxellensis* e *L. fermentum*, com reciclo celular e tratamento ácido das células (pH 2,0) acrescido ou não de 150 mg/L de MBP, em caldo de cana 16°Brix, 30°C, pH inicial 4,5 'Inicial' refere-se aos resultados no início do 1º. ciclo fermentativo..... 50
- Figura 5. Produção de etanol, açúcar redutor total (ART) residual e eficiência fermentativa em fermentação em batelada com co-cultura de *S. cerevisiae*, *D. bruxellensis* e *L. fermentum*, com reciclo celular e tratamento ácido das células (pH 2,0) acrescido ou não de 150 mg/L de MBP, em caldo de cana 16°Brix, 30°C, pH inicial 4,5..... 51

# UTILIZAÇÃO DO METABISSULFITO DE POTÁSSIO NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ETANÓLICA PARA CONTROLE DE LEVEDURAS E BACTÉRIAS CONTAMINANTES

**Autor:** ANNA LÍVIA PARALUPPI

**Orientador:** Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI

## RESUMO

Uma das principais preocupações das indústrias de produção de etanol combustível é controlar o crescimento de micro-organismos não selecionados para o processo, os quais podem causar prejuízos ao rendimento e a produtividade. Dentre as leveduras não-*Saccharomyces* contaminantes da fermentação, destaca-se o gênero *Dekkera*, por apresentar capacidade de crescimento nas condições de fermentação e adaptação aos substratos, e dentre as bactérias, o gênero *Lactobacillus*. Na indústria do vinho, vários agentes antimicrobianos são utilizados para o controle das populações de leveduras e bactérias indesejáveis, dentre eles o dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>), utilizado na forma de sais de sulfito. No entanto, o controle de micro-organismos com este agente é pouco conhecido na indústria sucroalcooleira, a qual faz uso principalmente do tratamento ácido entre os ciclos fermentativos e antibióticos para o controle de contaminantes bacterianos. Neste contexto, este trabalho teve por objetivo verificar o efeito da adição de metabissulfito de potássio (MBP) em duas fases do processo fermentativo para produção de etanol combustível: ao caldo de cana bruto e ao tratamento ácido do fermento. Na primeira etapa, verificou-se a concentração e o tempo de contato com o antimicrobiano para causar redução no número de leveduras e bactérias nativas do caldo. Em seguida, determinou-se a concentração mínima inibitória de MBP para o controle do crescimento de *Dekkera bruxellensis*, uma importante levedura contaminante da fermentação etanólica, quando adicionado ao tratamento ácido do fermento, em cultura pura e em co-cultura com *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus fermentum* e o efeito dessa adição sobre os parâmetros fermentativos. O MBP foi eficaz no controle de bactérias e leveduras nativas do caldo na concentração de 800 mg/L com tempo de contato que variou de 3 a 6 horas, proporcionando uma redução máxima de cerca de 1 ciclo log para leveduras e de 1,5 a 1,9 ciclos log para bactérias. Quando adicionado ao tratamento ácido (pH 2,0), ocorreu uma redução de aproximadamente 1 ciclo log de *D. bruxellensis* a partir de 225 mg/L de MBP. Porém em co-cultura com *S. cerevisiae* e *L. fermentum*, essa concentração ocasionou também redução do número de células de *S. cerevisiae*, com efeito sobre a produção de etanol. Em sistema de fermentação em batelada com reciclo celular, a combinação do tratamento ácido e 150 mg/L de MBP ocasionou queda substancial na viabilidade da levedura do processo e dos contaminantes *D. bruxellensis* e *L. fermentum*, com conseqüente decréscimo na produção de etanol e eficiência fermentativa. Embora seja eficiente no contexto da fermentação para produção de vinhos, o metabissulfito de potássio não se mostrou adequado para a fermentação alcoólica para produção de etanol combustível, devido às características peculiares do substrato utilizado e das condições em que é realizada a fermentação.

Palavras-chave: Dióxido de Enxofre, caldo de cana, tratamento ácido, fermentação, etanol

# UTILIZATION OF POTASSIUM METABISULPHITE IN THE ETHANOLIC FERMENTATION PROCESS TO CONTROL THE GROWTH OF CONTAMINANT YEAST AND BACTERIA

**Author: ANNA LÍVIA PARALUPPI**

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

## ABSTRACT

One of the main concerns in the ethanol-producing industries is the growth control of undesirable microorganisms that can cause decrease in the fermentative yield. Among non-*Saccharomyces* yeasts which can contaminate the fermentation process, the genus *Dekkera* is the most important because it is able to grow in fermentation conditions and be adapted to the substrates. Regarding the bacteria, *Lactobacillus* is the most representative genus. In the wine industry, several antimicrobial agents are utilized to control the undesirable yeast and bacteria populations, among them the sulphur dioxide (SO<sub>2</sub>) which is used in the form of sulphite salts. However, the microbial control by this substance is not known yet in the sugar and alcohol industries, in which the acid treatment of the cells and antibiotics are largely utilized to control the growth of bacteria. In this context, this work aimed to verify the effect of the addition of potassium metabisulphite (PMB) in two steps of the fermentative process for fuel alcohol production: to the raw sugarcane juice and to the acid treatment of the cells. In the first step, PMB concentration and exposure time to the antimicrobial were determined to cause decrease in the number of native yeast and bacteria in the sugarcane juice. Secondly, the minimum inhibitory concentration of PMB was determined to control the growth of *Dekkera bruxellensis*, an important yeast contaminant of the alcoholic fermentation, when added to the acid treatment of the cells, both in pure culture and in co-culture with *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus fermentum*. The effect of this treatment on the fermentative parameters was also analysed. The PMB was effective to control the growth of native yeast and bacteria in the sugarcane juice at the concentration of 800 mg/L with exposure time that varied from 3 to 6 hours, resulting in a maximal reduction of one log cycle for yeasts and from 1.5 to 1.9 log cycles for bacteria. When added to the acid treatment of the cells (pH 2.0), a reduction of approximately one log cycle of *D. bruxellensis* was verified from the concentration of 225 mg/L of PMB. However, in co-culture with *S. cerevisiae* and *L. fermentum*, this concentration also resulted in the decrease of *S. cerevisiae* cell number, with negative effect on ethanol production. In a cell-recycled batch fermentation, the combination of acid treatment and 150 mg/L of PMB caused a substantial decrease in *S. cerevisiae* viability as well in the growth of both contaminants, with reduction in the ethanol production and fermentative efficiency. Although the potassium metabisulphite is effective in the context of wine fermentation, it was not appropriate to the fuel ethanol production especially due to the peculiar characteristics of the substrate and the conditions in which the fermentation is carried out.

Key-words: Sulfur dioxide, sugarcane juice, acid treatment, fermentation, ethanol

## INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de etanol proveniente da cana-de-açúcar, porém o processo brasileiro tem suas peculiaridades. O caldo extraído não é estéril, embora passe por uma série de tratamentos para a retirada de impurezas, seguindo assim para a produção de açúcar e etanol combustível. Porém estes tratamentos realizados não eliminam os micro-organismos, levando-os para as dornas de fermentação, onde competem com a levedura do processo e prejudicam a eficiência fermentativa.

Atualmente as destilarias no Brasil utilizam linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* selecionadas como agentes da fermentação. A levedura do processo convive com populações de bactérias e leveduras nativas que competem pelo substrato e produzem metabólitos afetando o desempenho do fermento. A principal preocupação da indústria etanólica é controlar o crescimento de micro-organismos não selecionados, os quais causam problemas como consumo de açúcar, queda de viabilidade da *S. cerevisiae*, devido às toxinas excretadas no meio, floculação do fermento acarretando em perda de células de levedura pelo fundo de dorna ou na centrífuga e queda no rendimento industrial.

Pesquisas realizadas na área de fermentação mostraram que os gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus* são as bactérias contaminantes que predominam na

fermentação alcoólica, sendo as Gram-positivas as de maior ocorrência. As bactérias podem ocasionar a floculação das células das leveduras e produzir ácidos orgânicos, com diminuição da eficiência fermentativa. O maior grupo encontrado é o das bactérias lácticas, do gênero *Lactobacillus*, as quais se dividem em homo ou heterofermentativas, de acordo com o metabolismo que apresentam, predominantemente produzindo ácidos orgânicos e manitol.

Os métodos empregados pela indústria sucroenergética para o tratamento do mosto são os antibióticos e outros biocidas, além de solução de ácido sulfúrico na fase de tratamento do fermento, o qual é realizado entre os ciclos fermentativos, tendo como objetivo reduzir a carga bacteriana contaminante. Embora sejam eficientes contra bactérias, não tem ação contra as leveduras selvagens (não selecionadas para o processo, também chamadas de nativas) e muitas vezes acabam por selecionar células microbianas ainda mais resistentes ao baixo pH e aos antibióticos.

Dentre as leveduras contaminantes do processo de fermentação etanólica, destaca-se a espécie *Dekkera bruxellensis*, que apresenta alta capacidade de crescimento, mas reduzida capacidade fermentativa em relação à levedura do processo *S. cerevisiae*, nas condições em que a fermentação é realizada no Brasil. Essa levedura vem sendo bastante estudada por causa das suas particularidades, como a capacidade de crescimento em situação de estresse e baixa atividade fermentativa em condições de anaerobiose. Essa levedura tem sido muito investigada na indústria do vinho, pois tem atividade após o engarrafamento da bebida, apresentando consumo de etanol e produção de ácido acético.

Embora se conheça os efeitos dos contaminantes na fermentação alcoólica, os trabalhos têm se restringido ao efeito das contaminações isoladamente, por um ou outro micro-organismo, pouco se conhecendo sobre as interações entre as bactérias, leveduras selvagens e a linhagem industrial presentes durante a fermentação.

As vinícolas utilizam o dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) como agente de controle de micro-organismos bacterianos e de leveduras não-*Saccharomyces*, tendo o mínimo efeito sobre a espécie *S. cerevisiae*. Porém pouco se tem estudado sobre o emprego dessa substância na indústria da fermentação etanólica, onde contaminantes similares àqueles encontrados no vinho também ocorrem, como por exemplo, a levedura *D. bruxellensis*.

O metabissulfito de potássio (MBP) é um aditivo utilizado na indústria de alimentos que rende cerca de 50% de  $\text{SO}_2$ , em soluções aquosas, porém é dependente do pH, ocorrendo um equilíbrio complexo entre várias formas de sulfito de acordo com a sua concentração, pH e temperatura. É grande a interação entre o MBP e o meio em que está diluído, podendo sofrer interferência do pH, álcool e concentração de açúcar. Dessa forma, estudos que avaliem a ação do  $\text{SO}_2$ , na forma de metabissulfito de potássio, na indústria do etanol combustível podem contribuir para a melhor eficiência no combate das contaminações bacterianas e por leveduras selvagens.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

Avaliar o efeito do Metabissulfito de Potássio (MBP) sobre o crescimento de bactérias e leveduras contaminantes do processo de fermentação alcoólica para produção de etanol combustível.

### **Objetivos específicos**

- Verificar o efeito da adição de MBP ao caldo de cana bruto sobre o crescimento de leveduras e bactérias nativas;
- Verificar o efeito da adição de metabissulfito de potássio ao tratamento ácido do fermento no controle do crescimento de *Dekkera bruxellensis* e *Lactobacillus fermentum* em co-cultura com *S. cerevisiae*.



## **REVISÃO DA LITERATURA**

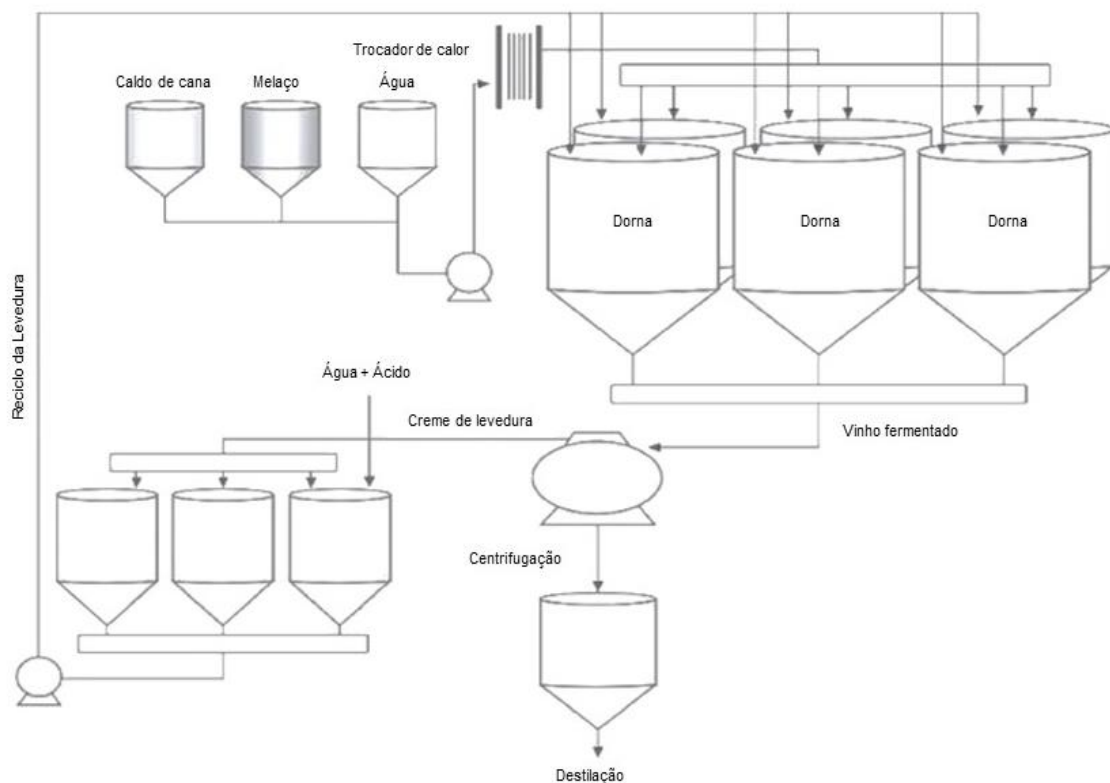
### **1 O processo industrial para produção de etanol combustível**

O principal país produtor de etanol a base de cana-de-açúcar é o Brasil. O uso deste combustível promove diversas vantagens, dentre elas, menor emissão de poluentes; maior geração de empregos; autossuficiência energética; fonte geradora de divisas internacionais; favorecimento da balança comercial do país e menor impacto ambiental (FIGUEIREDO, 2008). Segundo Única (2017), o Brasil é o maior exportador de açúcar e o segundo maior produtor de etanol, e eles juntos compõem 2,3% do Produto Interno Bruto (PIB), gerando 4,5 milhões de empregos no país. O etanol combustível representa aproximadamente 50% do total de combustível consumido pelos carros (BASSO et al., 2011).

A fermentação industrial para produção do etanol combustível pode ser conduzida nas formas de batelada ou contínua, porém a mais utilizada é o de batelada alimentada (LOPES et al., 2016, Figura 1). Esse sistema confere uma grande vantagem de adaptação do micro-organismo ao substrato, conseqüentemente obtendo um aumento na produção de etanol. As indústrias procuram trabalhar com leveduras já adaptadas ao substrato e alimentação constante de mosto nas dornas, para que ocorra um aumento da eficiência. Ao final da fermentação, o vinho é encaminhado para centrifugação a fim de recuperar a

levedura para a próxima batelada. Esse sistema de reciclo celular é conhecido como Mèlle-Boinot (LOPES et al., 2016). O outro processo fermentativo é o sistema contínuo, onde há 4 ou 5 dornas ligadas em sequência, sendo que o substrato e as células de levedura são adicionados ao mesmo tempo até o estabelecimento de um regime contínuo. A quantidade de açúcar do mosto tem que ser proporcional à quantidade de células de levedura, assim o meio de fermentação passa de um fermentador para o outro até que chegue ao último, somente então é levado para as centrífugas, para ocorrer a separação e iniciar um novo procedimento (MARQUES, 2008).

Figura 1. Esquema geral da fermentação etanólica com reciclo celular.



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

O caldo, como meio de cultura para a fermentação alcoólica, tem uma composição variada podendo assim afetar muitos parâmetros operacionais industriais, principalmente o rendimento da fermentação. Muitos fatores definem a

composição final do caldo de cana, como a variedade da cana, a qualidade do solo, o método de fertilização, as condições climáticas, a maturação da cana, a colheita realizada, a distância entre o tempo da queima, corte e processamento, proporção de palha, o uso ou não da irrigação com a vinhaça e forma de extração do caldo, por moenda ou difusor (BASSO et al., 2011).

Após a extração do caldo pela moenda, é necessário passar pela etapa onde são retiradas as impurezas, para posteriormente destinar o caldo para a produção de açúcar ou etanol. Essa etapa envolve várias fases como peneiragem, sulfitação, caleagem, aquecimento e decantação (BEM et al., 2006). Isto se faz necessário para que as impurezas sejam removidas através da precipitação resultante da reação entre fosfatos presentes no caldo e insumos adicionados (REIN, 2007).

No entanto, o caldo não passa por uma etapa onde são retirados os micro-organismos, carregando uma contaminação que irá prejudicar o processo fermentativo. As principais contaminações são por bactérias e leveduras, que podem entrar no processo de fabricação do etanol combustível através dos equipamentos (por falta de manutenção) ou por viver dentro da cana (micro-organismos endofíticos). A usina utiliza um tratamento ácido para o controle destes micro-organismos, que é normalmente realizado ao final de cada ciclo fermentativo, adicionando-se ácido sulfúrico a fim de diminuir a floculação causada por bactérias, pois as mesmas não suportam pH baixo. O tratamento ácido do fermento é realizado com uma solução ácida com pH variando de 1,8 – 2,5, por aproximadamente 2 a 3 horas, posteriormente retornando a massa celular para a dorna de fermentação (AMORIM et al., 2011). Oliva-Netto et al. (2013) descrevem o tratamento ácido como um fator estressante, pois as células de levedura acabam por fazer uso dos carboidratos de reserva, trealose e/ou glicogênio, para suportar o estresse. Dorta (2006) afirmaram que valores muito baixos de pH no tratamento ácido prejudicam a viabilidade, o brotamento da levedura, a quantidade de biomassa, o rendimento e a produtividade da fermentação, e conseqüentemente acarretam sobra de açúcares ao final da fermentação.

## **2 Micro-organismos contaminantes da fermentação etanólica**

Como o substrato que é adicionado nas dornas de fermentação (caldo de cana e ou melaço) não é esterilizado, ocorrem sucessões das linhagens de

leveduras, tornando o processo de fermentação etanólica complexo. Isso favorece o desenvolvimento de outras linhagens de leveduras *S. cerevisiae* e não-*Saccharomyces*, que causam diminuição da produtividade e problemas operacionais (AMORIM et al., 2004; SILVA FILHO et al., 2005; ANDRIETTA et al., 2007).

Cabrini e Gallo (1999) definiram levedura contaminante como qualquer levedura presente no processo fermentativo que não seja aquela selecionada para a condução da produção de álcool, causando problemas operacionais e aumentando o tempo de fermentação.

A ocorrência de leveduras nativas é associada a reduções significativas da eficiência industrial, como a queda do rendimento fermentativo, tempo mais longo de fermentação e formação de espumas pelo aumento da viscosidade, produção de compostos não desejáveis, além da floculação das células de levedura que podem ser provocadas tanto por bactérias como por leveduras (BASSO et al., 2008).

Dentre as leveduras contaminantes da fermentação etanólica, destaca-se a espécie *D. bruxellensis*. O primeiro relato de contaminação por essa levedura no Brasil que se tem conhecimento está descrito em trabalho realizado por Silva (1994). O autor documentou a ocorrência de contaminação por uma levedura selvagem no processo contínuo de produção de etanol, demonstrando a não estabilidade do fermento inicial, o qual foi praticamente substituído por *D. bruxellensis*. O poder competitivo dessa espécie em condições fermentativas foi de tal ordem que permitiu sua evolução populacional de aproximadamente 62% para 96% do número total de leveduras em 8 dias de operação. Embora os relatos sobre os efeitos da contaminação por *Dekkera* sejam predominantes em vinhos, a espécie *D. bruxellensis* tem sido detectada como principal levedura contaminante na produção de etanol combustível (GUERRA, 1998; SOUZA-LIBERAL et al., 2007; PITA et al., 2011; PEREIRA et al., 2012, 2014; SOUZA et al., 2012; BASSI et al., 2013, 2015; LEITE et al., 2013; MENEGHIN et al., 2013). Silva et al. (2016) relataram a ocorrência de *D. bruxellensis* principalmente no colmo da cana. Após a extração do caldo, a levedura entrava no processo de fermentação, porém somente 2 meses após o início da safra foram encontradas células da levedura na água de lavagem e na vinhaça, e ao final da safra houve substituição total do fermento pelas células de *D. bruxellensis*.

Mesmo em condições de anaerobiose, observou-se que *D. bruxellensis* pode produzir ácido acético suficiente para inibir o crescimento das células de *S.*

*cerevisiae*, diminuindo sua viabilidade (ABBOTT et al., 2005). Estudos mostram alta produção de ácido acético (10 g/L) por *D. bruxellensis* em plena condição de aeração em sistema de batelada (USCANGA et al., 2003). No entanto, os valores medidos industrialmente foram muito menores mesmo em altas contagens de *D. bruxellensis* (SOUZA-LIBERAL et al., 2007) e foram maiores em melaço que em caldo de cana (PEREIRA et al., 2012, 2014).

*D. bruxellensis* é capaz de metabolizar várias fontes de carbono e nitrogênio. Dentre as fontes de carbono, as mais importantes no cenário industrial são glicose, frutose, sacarose e etanol. Quanto às fontes de nitrogênio descritas como assimiláveis por esta levedura estão amônia, prolina, arginina e nitrato (CONTERNO et al., 2006). A utilização de nitrato como fonte de nitrogênio, o qual é encontrado em altas concentrações em mosto de cana-de-açúcar, pode ser uma vantagem nutricional para essa levedura em ambientes industriais, comparando-se com *S. cerevisiae*, a qual não assimila nitrato (PITA et al., 2011).

Tanto *S. cerevisiae* quanto *D. bruxellensis* apresentam o chamado “Efeito Crabtree positivo”, que é a capacidade de utilizar açúcares para produzir etanol mesmo na presença de oxigênio (PRONK et al., 1996; HAGMAN et al., 2014). Essa atividade metabólica reduz a formação de biomassa, mas produz um composto, o etanol, que age sobre os micro-organismos competidores. Como ambas as leveduras podem também assimilar o etanol, essa estratégia é assim chamada de fazer-acumular-consumir (etanol), conforme Rozpedowska et al. (2011).

Segundo Blomqvist et al. (2010), a eficiência energética de *D. bruxellensis* se mostra superior à de *S. cerevisiae*, tendo uma produção de biomassa maior e uma menor produção de glicerol. Alguns autores afirmam que as leveduras do gênero *Dekkera/Brettanomyces* não possuem capacidade de produzir glicerol para restaurar o desequilíbrio em NADH, e esta incapacidade levaria ao “Efeito Custer”, ou seja, a inibição temporária da fermentação em condições anaeróbias (WIJSMAN et al., 1984). No entanto, trabalhos tem mostrado que a levedura *D. bruxellensis* produz baixa quantidade de glicerol (SOUZA-LIBERAL et al., 2007; PEREIRA et al., 2014). O balanceamento da condição ‘redox’ pode acontecer na presença de nitrato, cuja assimilação por *D. bruxellensis* resulta em crescimento sob condições anaeróbias com aumento do metabolismo fermentativo (GALAFASSI et al., 2013).

A levedura *D. bruxellensis* é também produtora de fenóis voláteis, que para a indústria de vinhos significa perda econômica, pois há formação de odores

desagradáveis (OELOFSE et al., 2008). Nas condições da fermentação para produção de etanol combustível, a capacidade e o impacto da produção de fenóis voláteis ainda não foi avaliada.

Quanto às bactérias, Gallo (1990) observou que há uma predominância de 98,52% de bactérias do grupo Gram+, em sua maioria do gênero *Lactobacillus* (59,75%) e *Bacillus* (26,58%) no processo de produção de etanol combustível. As principais espécies que causam floculação das células de leveduras são: *L. fermentum*, *L. vini* e *L. plantarum* (LUCENA et al., 2010; TIUKOVA et al., 2014).

Bactérias do gênero *Lactobacillus* estão classificadas em dois sub-grupos metabólicos de acordo com a rota metabólica utilizada para degradar hexoses: homo e heterofermentativo (KANDLER, 1983). As homofermentativas não fermentam pentoses, enquanto as heterofermentativas convertem hexoses em CO<sub>2</sub> e etanol ou ácido acético ou ácido lático, e as pentoses são convertidas a ácido lático e acético (CHERUBIN, 2003).

Essas bactérias produzem metabólitos que causam danos à levedura do processo inibindo a produção de etanol. Basso et al. (2014) realizaram um trabalho com o objetivo de avaliar os dois tipos metabólicos de *Lactobacillus* (homo e heterofermentativo) em sistema de fermentação em co-cultura com a levedura CAT-1 em meio de fermentação utilizando caldo e melaço como substrato. Houve uma produção significativa de manitol, como já descrito por Eggleston et al. (2007). A produção de etanol diminuiu na presença de ambas as bactérias, mas a queda foi maior com a heterofermentativa (*L. fermentum*) do que com a homofermentativa (*L. plantarum*).

Carvalho-Netto et al. (2015) estudaram a fisiologia molecular da linhagem industrial *S. cerevisiae*PE-2 sob duas condições: fermentação típica (células em suspensão) e com floculação na fermentação. Os autores observaram o perfil de transcrição dessa levedura através de RNA-seq em escala industrial utilizando o método de fermentação descontínua com alimentação. A comparação das duas condições de fermentação revelou perfis de transcrição diferenciados principalmente por uma mudança gênica profunda nas amostras floculadas. Foram detectados níveis elevados de ácidos orgânicos, com a presença da bactéria *L. fermentum*.

Apesar de *S. cerevisiae* ser um micro-organismo tolerante a ácidos (ABBOTT et al., 2009), a exposição a concentrações elevadas de ácidos orgânicos produzidos por contaminantes bacterianos pode retardar o metabolismo da levedura e reduzir a

capacidade fermentativa (DORTA et al., 2005). Narendranath et al. (2001) relataram que há uma reação entre ácido láctico e ácido acético que reduz a taxa de crescimento da levedura, havendo uma queda no consumo de glicose e na produção de etanol.

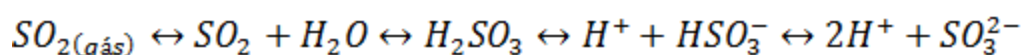
As contaminações por bactérias podem ocorrer em diferentes locais dentro da linha de produção, como trocador de calor, tanques de sacarificação e sistemas de propagação contínua de levedura. Elas se fixam formando um biofilme, funcionando como um reservatório de bactérias que são continuamente reintroduzidas no processo (KHATIBI et al., 2014).

Contaminações bacterianas acima de  $5 \times 10^6$  UFC/mL são consideradas prejudiciais, acima de  $1 \times 10^7$  UFC/mL os prejuízos econômicos são significativos e acima de  $1 \times 10^8$  UFC/mL ocorrem quedas nos rendimentos fermentativo e industrial, dificultando operações de centrifugação devido ao aumento da floculação, ocorrendo ainda o aumento do consumo de ácido sulfúrico e de antibióticos (CHERUBIN, 2003; AMORIM et al., 2009; BASSO et al., 2014). 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.

A espécie *L. fermentum* é um dos principais contaminantes do processo de produção de etanol, sendo uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa, heterofermentativa, apresentando crescimento ótimo entre 30°C e 40°C. A redução no rendimento fermentativo devido à presença de bactérias lácticas ocorre devido ao fato de que há um desvio da glicose, de forma que a molécula que seria convertida em etanol pela levedura é transformada em ácido láctico por bactérias, ocorrendo dessa forma uma queda no rendimento final da fermentação (BASSO et al., 2014).

### 3. Utilização do dióxido de enxofre no controle de contaminações microbianas

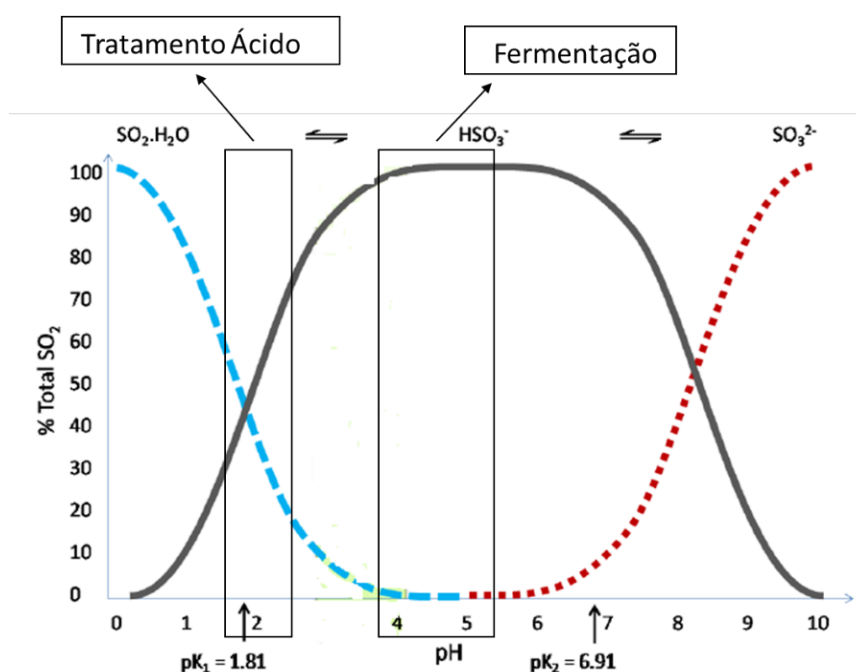
O dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) é um gás incolor que se dissolve rapidamente em água, estabelecendo um equilíbrio dependente do pH, de acordo com a seguinte equação (ADAMS; MOSS, 2008):



As formas não ionizadas do  $\text{SO}_2$ , as quais predominam em baixo pH, tem maior atividade antimicrobiana pois penetram facilmente na célula, sendo cerca de 100 a 1000 vezes mais ativas que o íon bissulfito ( $\text{HSO}_3^-$ ). Em pH próximos a neutralidade, o  $\text{SO}_2$  está presente como uma mistura de bissulfito e sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ), que apesar de apresentarem uma eficácia inferior à do  $\text{SO}_2$ , são muito utilizados na indústria de alimentos e de vinho na forma de sais desses ânions (ADAMS; MOSS, 2008).

Na Figura 2 estão demonstradas as formas de  $\text{SO}_2$  e sua relação com o pH, destacando também duas etapas do processo fermentativo – tratamento ácido do fermento e fermentação – em relação ao pH em que são desenvolvidas (DUCKITT, 2012).

Figura 2. Formas e concentração de  $\text{SO}_2$  ao longo da faixa de pH, variando de 0 a 10. Os retângulos destacam a faixa de pH onde as etapas de tratamento ácido do fermento e a fermentação se desenvolvem durante o processo industrial.



Fonte: Duckitt (2012), modificado.



Em vinho, a química do SO<sub>2</sub> é bem complexa devido à sua dissociação em diferentes compostos, tais como bissulfito e sulfito, dependendo do pH e da ligação com os compostos presentes no meio de fermentação, como açúcares, pigmentos e subprodutos da fermentação (DIVOL et al., 2012).

O SO<sub>2</sub> pode ser adicionado direta ou indiretamente por meio de sais como sulfito de sódio, bissulfito de sódio, bissulfito de potássio, metabissulfito de sódio e metabissulfito de potássio (FAVERO et al., 2011). O metabissulfito de potássio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), produto utilizado no presente projeto, rende 57,6% de SO<sub>2</sub> em solução aquosa, porém é dependente do pH (ROTTER, 2011).

O SO<sub>2</sub> inibe o crescimento microbiano, pois interfere nos processos intracelulares. É uma molécula altamente reativa que se liga a diversos metabólitos e enzimas na célula, desviando a rota das enzimas, e impedindo as substâncias dihidroxiacetona-fosfato, piruvato, acetaldeído, ácido oxalacético e ácido alfa-cetoglutarico, de serem utilizadas como fonte de energia (DIVOL et al., 2012). Harada et al. (1968) observaram que o SO<sub>2</sub> reage com acetaldeído e bloqueia a regeneração de NAD<sup>+</sup> necessário para a glicólise nas leveduras.

O SO<sub>2</sub> é ativo contra bactérias, leveduras e fungos filamentosos, sendo os fungos mais resistentes que as bactérias. Dentre essas, as Gram-negativas são mais suscetíveis. Na fermentação do vinho, a tolerância de *S. cerevisiae* à concentração de 100 mg/L de SO<sub>2</sub> é bem explorada pelo fato de essa concentração controlar o crescimento de leveduras selvagens e de bactérias acéticas (ADAMS; MOSS, 2008). Oliva-Neto e Yokoya (2001) verificaram que a concentração mínima inibitória de sulfito de sódio em pH 4,5 foi de 10 a 40 µg/L para bactérias lácticas e de 5000 µg/L para *S. cerevisiae*, nas mesmas condições.

Barata et al. (2008), Mendoza e Farias (2010) e Divol et al. (2012) estudaram o efeito do SO<sub>2</sub> sobre o crescimento de *D. bruxellensis* na indústria do vinho, para determinar a dose necessária para a inativação das células. Os resultados obtidos demonstraram um controle da população de *D. bruxellensis* com doses relativamente altas, acima de 40 mg/L de SO<sub>2</sub> (BARATA et al., 2008). Outros trabalhos mostraram que o gênero *Dekkera* foi sensível a concentrações superiores a 30 mg/L de SO<sub>2</sub> (GERBAUX et al., 2002; SERPAGGI et al., 2012), porém outros autores mostraram que ainda havia crescimento nesta concentração em vinhos (AGNOLUCCI et al., 2010). Portugal et al. (2014) verificaram que a concentração de 100 mg/L de MBP foi eficiente no controle do crescimento de linhagens de

*Brettanomyces* em vinho. A controvérsia sobre a concentração ideal de SO<sub>2</sub> para causar controle/morte celular reside no fato que a ação do SO<sub>2</sub> depende muito da composição do vinho, pH, teor de etanol, temperatura, níveis de antocianina e dos nutrientes presentes, além de haver diferença ao nível de linhagens da levedura.

Apesar da grande utilização na indústria vinícola, o SO<sub>2</sub> tem sido pouco estudado para emprego na fermentação industrial para produção de etanol combustível. Basso (1991) verificou que com a adição de 100 mg/L de SO<sub>2</sub> na forma de bissulfito de sódio, houve uma diminuição na eficiência fermentativa e no crescimento da levedura. Bréchet et al. (1969) relataram uma inibição de 30 a 40% na fermentação e entre 40 a 80% na respiração celular pela adição de sulfito no mosto. Na produção de etanol a partir de açúcar de beterraba, houve redução na produtividade em etanol e efeito sobre a viabilidade celular (GIBBONS; WESTBY, 1987).

Bassi et al. (2015) estudaram o efeito do SO<sub>2</sub>, na forma de metabissulfito de potássio, sobre linhagens de *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae* e sua eficácia quando adicionado em duas etapas do processo fermentativo: no tratamento ácido e durante a fermentação. Os resultados mostraram que nas concentrações de 100 e 200 mg/L de MBP, três linhagens de *D. bruxellensis* apresentaram crescimento mais lento e inibição do crescimento na concentração de 400 mg/L. Sobre *S. cerevisiae*, o efeito foi bem menor, independentemente do meio de cultura utilizado. A adição de MBP (250 mg/L) durante o tratamento ácido (pH 2,0) causou redução significativa na produção de etanol, porém a adição da substância no mosto de fermentação, ao longo dos ciclos fermentativos, teve um impacto menor sobre o rendimento fermentativo, com mínimo efeito sobre a viabilidade de *S. cerevisiae* e controle do crescimento de *D. bruxellensis*.

A adição de MBP na etapa do tratamento ácido seria mais viável que durante os ciclos fermentativos por causa do baixo pH das cubas de tratamento ácido, o que resultaria em liberação de formas mais ativas do SO<sub>2</sub> e uma possível diminuição na concentração de MBP a ser utilizada, além dos menores volumes a serem tratados. Para isso, é importante avaliar se concentrações menores que 250 mg/L de MBP poderiam ser utilizados com eficiência no tratamento ácido para controle da levedura *D. bruxellensis*, com mínimo efeito sobre a levedura do processo e sobre o rendimento fermentativo. Esse é, portanto, um dos objetivos do presente trabalho.

Além disso, o possível emprego do MBP no tratamento do caldo, antes de entrar na dorna de fermentação, é também avaliado neste trabalho, com vistas à eliminação de leveduras e bactérias nativas.

## LITERATURA CITADA

- ABBOTT, D.A.; HYNES S.H.; INGLEDEW, W.M. Growth rates of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts hinder their ability to compete with *Saccharomyces cerevisiae* in batch corn mash fermentations. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 66 p. 641–647, 2005.
- ABBOTT, D.A. et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of carboxylic acids: current status and challenges. **FEMS Yeast Res.**, v. 9, p. 1123–1136, 2009.
- ADAMS, M.R.; MOSS, M.O. **Food microbiology**. 3a. ed., Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2008. 463 p.
- AGNOLUCCI, M. et al. Sulphur dioxide affects culturability and volatile phenol production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis*. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 143, 76–80, 2010.
- AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; LOPES, M.L. Evolution of ethanol production in Brazil. In: BRYCE, J.H.; STEWART, G.G. (Ed.) **Distilled spirits - tradition and innovation**, Nottingham: Nottingham University Press, v. 1. p. 143-148, 2004.

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, D.R.; AUSTIN, G.D.; KLUHSPIES, C. (Ed.). **The alcohol textbook**. 5th ed., Nottingham: Nottingham University Press, 2009. p. 39-46.

AMORIM, H.V. et al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 91, p. 1267-1275, 2011.

ANDRIETTA, M.G.S. et al. Bioethanol – 30 years of Proálcool. **Int. Sugar J.**, v.109, n.1299, p.195-200, 2007.

BARATA, A. et al. Survival patterns of *Dekkera bruxellensis* in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 121, p. 201–207, 2008.

BASSI, A.P et al. Single and combined effects of low pH and high concentrations of ethanol on the growth of *Dekkera bruxellensis* and *Saccharomyces cerevisiae* strains from the fermentation for fuel alcohol production. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 29, n. 9, p. 1661-1676, 2013.

BASSI, A.P.G. et al. Potassium metabisulphite as a potential biocide against *Dekkera bruxellensis* in fuel ethanol fermentations. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 60, n. 3, p. 248- 258, 2015.

BASSO, L.C. 1991.In: ALVES, D.M.G. **Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica**. 1994. 199 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

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. **Biofuel production: recent developments and prospects**. Croatia: INTECH, p. 85-100, 2011.

- BASSO, L.C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Res.**, v. 8, p. 1155-1163, 2008.
- BASSO, T.O. et al. Homo-and heterofermentative lactobacilli differently affect sugar cane based fuel ethanol fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 105, p. 169-177, 2014.
- BEM, A.J.; KOIKE, G.H.A.; PASSARINI, L.C. Modelagem e simulação para o processo industrial de fabricação do açúcar e álcool. **Revista Minerva**, v. 3, n. 1, p. 33-46, 2006.
- BLOMQVIST, J. et al. Fermentations characteristics of *Dekkera bruxellensis* strains. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 87, p. 1487-1497, 2010.
- BRÉCHOT, P.; CROSON, M.; MATSURA, S. Fermentation and respiration of yeasts in presence of sulphur dioxide. **Antonie van Leeuwenhoek.**, v.35, p. 21-22, 1969.
- CABRINI, K.T.; GALLO C.R. Identificação de levedura contaminantes no processo de fermentação alcoólica na Usina Santa Elisa. **STAB**, v. 17, n. 6, p. 48-50, 1999.
- CARVALHO-NETO, O.V. et al. *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional reprogramming due to bacterial contamination during industrial scale bioethanol production. **Microb. Cell Fact.**, v. 14, p. 1-13, 2015.
- CHERUBIN, R.A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica.** 2003. 137 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- CONTERNO, L. et al. Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. **Am. J. Enol. Vitic.** v. 57, n. 2, p. 139, 2006.

- DIVOL, B.; du TOIT, M.; DUCKITT, E. Surviving in the presence of sulphur dioxide: strategies developed by wine yeasts. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 95, p. 601–613, 2012.
- DORTA, C. **Sinergismo entre sulfito, ácido láctico, pH e etanol na fermentação alcoólica de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e M-26.** 2006. 135 p. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado em Ciências Biológicas, Microbiologia Aplicada, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.
- DORTA, C. et al. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26). **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 22, p. 177–182, 2005.
- DUCKITT, E. **Investigating the impact of sulphur dioxide on *Brettanomyces bruxellensis* at a molecular and cellular level.** 2012. 89 p. Dissertação (Mestrado) – Wine Biotechnology Course, Stellenbosch University, África do Sul, 2012.
- EGGLESTON, G. et al. Mannitol as a sensitive indicator of sugarcane deterioration and bacterial contamination in fuel alcohol production. **Zuckerindustrie**, v. 132, p. 33-39, 2007.
- FAVERO, D.M.; RIBEIRO, C.S.G.; AQUINO, A.D. Sulfitos: importância na indústria alimentícia e seus possíveis malefícios à população. **Segur. Aliment. Nutr.**, v. 18, p. 11–20, 2011.
- FIGUEIREDO, C.M. **Análise molecular da floculação e formação de espuma por leveduras utilizadas na produção industrial de álcool combustível no Brasil.** 2008. 71 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

- GALAFASSI, S. et al. Utilization of nitrate abolishes the “Custers effect” in *Dekkera bruxellensis* and determines a different pattern of fermentation products. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 40, p. 297-303, 2013.
- GALLO, C.R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica.** 1990. 338 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1990.
- GERBAUX, V.; VINCENT, B.; BERTRAND, A. Influence of maceration temperature and enzymes on the content of volatile phenols in Pinot noir wines. **Am. J. Enol. Vitic.**, v. 53, p. 131–137, 2002.
- GIBBONS, W.R; WESTBY, C.A. Effects of sodium metabisulfite on diffusion fermentation of fodder beets fuel ethanol production. **Biotechn. Bioeng.**, v.30, p. 906-916, 1987.
- GUERRA, E. **Mecanismo de infecção da fermentação alcoólica industrial por *Brettanomyces bruxellensis*, impacto no processo e medidas operacionais do agente infeccioso.** 1998. 92p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1998.
- HAGMAN, A.; SALL, T.; PISKUR, J. Analysis of the yeast short-term Crabtree effect and its origin. **FEBS J.**, v. 281, p.4805-4814, 2014.
- HARADA, K.; HIGUCHI, R.; UTSUMI, I. Studies on sorbic acid. Part 4. Inhibition of the respiration in yeast. **Agr. Biol. Chem.**, v. 32, n. 8, p. 940-946, 1968.
- KANDLER, O. Carbohydrate-metabolism in lactic-acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 49, p. 209-224, 1983.
- KHATIBI, P.A. et al. *Saccharomyces cerevisiae* expressing bacteriophage endolysins reduce *Lactobacillus* contamination during fermentation. **Biotechnol. Biofuels**, v. 7, n. 104, p.1-13, 2014.



- LEITE, F.C.B. et al. Quantitative aerobic physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis*, a major contaminant in bioethanol production plants. **FEMS Yeast Res.**, v.13, n.1, p.34-43, 2013.
- LOPES, M.L. et al. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Braz J Microbiol**, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.003>
- LUCENA, B.T. L et al. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. **BMC Microbiol.**, v.10, p. 298-306, 2010.
- MARQUES, A.S. **Estudo da influência da complementação de nutrientes no mosto sobre o processo de fermentação alcoólica em batelada**. 2008. 95 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2008.
- MENDOZA, L.; FARIAS, M.E. Improvement of wine organoleptic characteristics by non-*Saccharomyces yeasts*. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology**. Badajoz: Formatex, p. 908-919, 2010.
- MENEGHIN, M.C. et al. Fermentative and growth performances of *Dekkera bruxellensis* in different batch systems and the effect of initial low cell counts in co-cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 30, n. 8, p. 295-305, 2013.
- NARENDRANATH, N.V; THOMAS, K.C; INGLEDEW, W.M. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** v. 26, p. 171-177, 2001.
- OELOFSE, A.; PRETORIUS, I.S.; du TOIT, M. Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking: a synoptic review. **South Afric. J. Enol. Vitic.**, v. 29, n.2, p. 1-17, 2008.

- OLIVA-NETTO, P. et al. The Brazilian technology of fuel ethanol fermentation—yeast inhibition factors and new perspectives to improve the technology. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Materials and processes for energy: communicating current research and technological developments**. Badajoz: Formatex, p. 371-379, 2013.
- OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria from the alcohol industry to several antimicrobial compounds. **Braz. J. Microbiol.**, v. 32, p.10-14, 2001.
- PEREIRA, L.F. et al. The physiological characteristics of the yeast *Dekkera bruxellensis* in fully fermentative conditions with cell recycling and in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 101, n. 3, p. 529-539, 2012.
- PEREIRA, L.F. et al. The fermentation of sugarcane molasses by *Dekkera bruxellensis* and the mobilization of reserve carbohydrates. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 105, n. 3, p. 481-489, 2014.
- PITA, W.B. et al The ability to use nitrate confers advantage for *Dekkera bruxellensis* over *S. cerevisiae* and can explain its adaptation to industrial fermentation processes. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 100, n. 1, p. 99-107, 2011.
- PORTUGAL, C. et al. *Brettanomyces* susceptibility to antimicrobial agents used in winemaking: in vitro and practical approaches. **Eur. Food. Res. Technol.**, v. 238, p. 641-652, 2014.
- PRONK, J.T.; STEENSMA, H.Y.; VAN DIJKEN, J.P. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 12, n. 16, p. 1607-1633, 1996.
- REIN, P. **Cane sugar engineering**. Berlim: Verlag, 2007. 768 p.

- ROTTER, B. Sulphur dioxide. In: Improved winemaking: advanced theory, practical solutions and opinion, 2011. Disponível em:  
<<http://www.brsquared.org/wine/Articles/SO2/SO2.htm>>. Acesso em: 23 julho 2016.
- ROZPEDOWSKA, E. et al. Parallel evolution of the make– accumulate–consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts. **Nature Comm.**, v. 2, p. 302, 2011. doi: 10.1038/ncomms1305.
- SERPAGGI, V. et al. Characterization of the “viable but nonculturable” (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. **Food Microbiol.**, v. 30, p. 438-447, 2012.
- SILVA, R.B.O. **Leveduras contaminantes na produção de etanol industrial por processo contínuo: quantificação e identificação.** 1994. 145 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 1994.
- SILVA-FILHO, E.A. et al. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.88, p.13-23, 2005.
- SILVA, T.C.D. da; LEITE, F.C.B.; MORAIS JUNIOR, M.A. Distribution of *Dekkera bruxellensis* in a sugarcane-based fuel ethanol fermentation plant. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 62, p. 354-358, 2016.
- SOUZA, R.B. et al. The consequences of *Lactobacillus vini* and *Dekkera bruxellensis* as contaminants of the sugarcane-based ethanol fermentation. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 39, p. 1645-1650, 2012.
- SOUZA-LIBERAL, A.T. et al. Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. **J. Appl. Microbiol.**, v. 102, p. 538–547, 2007.

TIUKOVA, I.; EBERHARD, T.; PASSOTH, V. Interaction of *Lactobacillus vini* with the ethanol-producing yeasts *Dekkera bruxellensis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Appl. Bioch.**, v. 61, p. 40-44, 2014.

ÚNICA. Disponível em:

<http://unica.com.br/download.php?idSecao=17&id=40377637/>. Acesso em: janeiro de 2017.

USCANGA, M.G.A; DELIA, M.L.; STREHAIANO, P. *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 61 p.157–162, 2003.

WIJSMAN, M.R. Inhibition of fermentation and growth in batch cultures of the yeast *Brettanomyces intermedius* upon a shift from aerobic to anaerobic conditons (Custer´s effect). **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 50, p. 83-192, 1984.

## **CAPÍTULO 1. Efeito da adição de metabissulfito de potássio ao caldo de cana para controle do crescimento de bactérias e leveduras nativas**

### **1. Resumo**

O caldo processado ao longo da safra passa por alterações de seus componentes fazendo assim as células de leveduras passarem por grandes oscilações fisiológicas, devido a sua inconstância na composição nutricional. A produção de etanol combustível no Brasil difere de outras fermentações industriais, pois existem particularidades no seu processo, como o fato de não ocorrer de forma asséptica, e de se realizar a reciclagem do fermento durante a safra. A indústria do vinho faz uso de vários agentes antimicrobianos que controlam as populações de leveduras e bactérias indesejáveis, dentre eles o dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>), na forma de sais de sulfito. No entanto, pouco se conhece sobre o seu efeito sobre os micro-organismos nativos do caldo de cana. Este trabalho teve por objetivo verificar o efeito da adição de metabissulfito de potássio - MBP (concentração e tempo de exposição) ao caldo de cana antes de entrar na fase de fermentação, avaliando a capacidade do composto de reduzir o número de leveduras e bactérias nativas do mosto. Foram coletadas quatro amostras de caldo bruto em uma unidade industrial de duas safras subsequentes. O MBP foi eficaz no controle de bactérias e leveduras

nativas do caldo na concentração de 800 mg/L com tempo de contato que variou de 3 a 6 horas, proporcionando uma redução máxima de cerca de 1 ciclo log para leveduras e de 1,5 a 1,9 ciclos log para bactérias. A alta concentração do produto inviabiliza o seu uso na indústria devido ao custo em termos de quantidade de caldo a ser tratada.

## 2. Introdução

Após a cana de açúcar ser recebida na indústria, o caldo é processado e grande parte de suas impurezas são eliminadas, porém alguns micro-organismos resistentes são levados para as dornas de fermentação. Este caldo é levado para o mosto de alimentação juntamente com as células de leveduras selecionadas já adaptadas para a fermentação alcoólica. Este processo é contínuo ao longo de toda a safra, sendo reciclada a biomassa celular ao final de cada ciclo fermentativo (FERREIRA, 2008).

O caldo processado ao longo da safra passa por alterações de seus componentes fazendo assim as células de leveduras passarem por grandes oscilações fisiológicas, devido a sua inconstância na composição nutricional. Além das alterações físicas e químicas do caldo de cana, durante a etapa de fermentação ocorre estresse fisiológico por causa da variação inicial e final da osmolaridade, pH, temperatura, disponibilidade nutricional, densidade e aumento da concentração de etanol, incidindo diretamente no rendimento fermentativo industrial (SOUZA et al., 2015).

A produção de etanol combustível no Brasil difere de outras fermentações industriais, pois existem particularidades no seu processo, como o fato de não ocorrer de forma asséptica, e de se realizar a reciclagem do fermento durante a safra. Por estes motivos é que hoje se utiliza leveduras selecionadas, com grande capacidade adaptativa e de resistência aos estresses, no entanto, ocorre perda significativa da viabilidade das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* quando as dornas se encontram com altas contaminações de bactérias e leveduras nativas (BASSO et al., 2008).

Estes micro-organismos nativos já estão adaptados ao substrato, pois são trazidos junto com a cana, ou na água de lavagem da cana, permanecendo na tubulação, na moenda (micro-organismos endofíticos), na água de diluição, no

trocador de calor e nas dornas de fermentação. Para o controle destes microorganismos é utilizado o tratamento ácido (pH 2,0, por aproximadamente 2 horas), mas este tratamento só é eficiente para as bactérias, pois elas não resistem a pH baixo. Além disso, faz-se uso de antibióticos, que pode resultar em aumento da resistência das bactérias. No entanto, para as leveduras nativas não há um controle específico (BASSO et al., 2008; BASSI et al., 2015)

O SO<sub>2</sub> é extensivamente utilizado nas vinícolas para o controle dos contaminantes bacterianos e leveduras do vinho, com pouco efeito sobre a levedura *S. cerevisiae* (DIVOL et al, 2012; BASSI et al, 2015). A proposta é avaliar se o MBP poderia ser utilizado no caldo obtido logo após a moagem da cana, antes de entrar no processo de fermentação, a fim de diminuir a contaminação por microorganismos nativos que poderiam infectar as dornas de fermentação. Nesse contexto, o presente trabalho vem propor a utilização do metabissulfito de potássio (MBP) como fonte de SO<sub>2</sub> no controle do crescimento de bactérias e leveduras nativas do caldo de cana, avaliando-se o efeito da concentração do produto e do tempo de contato do caldo com o MBP para causar inibição do crescimento microbiano.

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1 Coleta das amostras de caldo, amostragens e plaqueamento**

Foram coletadas amostras de caldo de cana da Usina São João – Araras – SP, em dois períodos da safra 2015/2016 (12/07/2015 e 14/10/2015) e dois períodos da safra 2016/2017 (09/11/2016 e 16/12/2016). Os ensaios foram realizados no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM) na UFSCar, *campus* Araras.

O caldo bruto (não estéril) foi coletado em frascos estéreis com tampa rosqueada, trazido para o laboratório e distribuído em frascos estéreis em volumes de 50 mL. Aos frascos foi adicionado metabissulfito de potássio (Dinâmica®) nas concentrações finais de 0, 75, 150, 200, 400 e 800 mg/L. Para avaliação do crescimento de bactérias foram utilizadas as concentrações de 0, 75, 150 e 800 mg/L e para as leveduras, as concentrações de (0, 200, 400 e 800 mg/L). Os experimentos foram realizados em duplicata para cada concentração. O MBP foi

adicionado na forma de soluções concentradas, preparadas em água destilada estéril.

As amostras de caldo de cana foram mantidas a 30°C, 160 rpm, por 9 horas, sendo retiradas amostras a cada 3 horas para determinação do número de UFC/mL de bactérias e leveduras, por meio de diluição seriada e plaqueamento em meio Agar Nutriente (1 g/L extrato de carne; 2 g/L extrato de levedura; 5 g/L peptona; 5 g/L cloreto de sódio e 20 g/L ágar, em água destilada) e YPD (20 g/L peptona; 20g/L glicose; 10g/L extrato de levedura; 20 g/L ágar, em água destilada), respectivamente. As placas inoculadas foram mantidas a 35°C, por 24 horas para as bactérias e 30°C, por 72 horas, para as leveduras, quando então foram realizadas as contagens de UFC/mL.

### **3.2 Análise dos resultados**

Os resultados das quatro coletas realizadas foram analisados em conjunto quanto à redução logarítmica do número de bactérias e leveduras nativas, considerando-se o número de UFC/mL inicial em relação ao número de UFC/mL final, ao término de cada período de amostragem (3, 6 e 9 horas), para cada concentração de MBP. A redução logarítmica foi calculada da seguinte forma:

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

## **4. Resultados e Discussão**

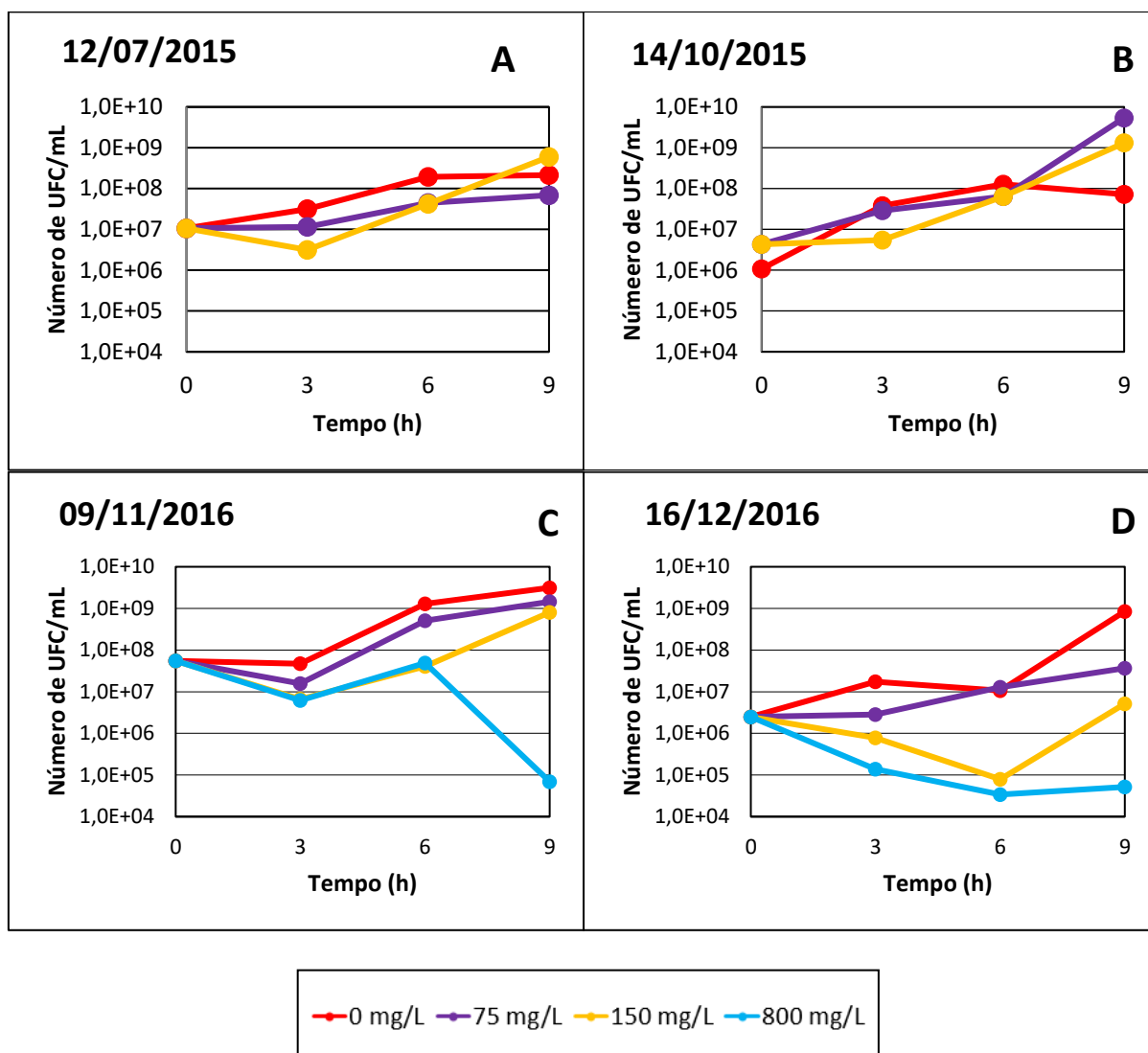
Os resultados apresentados na Figura 1 mostram a evolução do crescimento de bactérias nativas das quatro amostras de caldo de cana bruto, durante 9 horas de tratamento com concentrações distintas de MBP.

Foram testadas concentrações diferentes de MBP para a análise de bactérias e leveduras, de acordo com resultados prévios (BASSI et al., 2015; COCCA et al., 2015). Houve efeito do MBP sobre o crescimento de bactérias nativas das quatro amostras de caldo de cana bruto (Figuras 1A, 1B, 1C e 1D). Nas amostras da safra 2015/2016, com 75 mg/L de MBP o número de UFC aumentou mais lentamente em comparação com o caldo sem MBP, porém com 9 horas de incubação os números de UFC foram equivalentes. A velocidade de crescimento foi ainda mais lenta com



150 mg/L de MBP, no entanto, em 9 horas, o número de UFC foi semelhante ou maior do que sem MBP (Figura 1A, 1B).

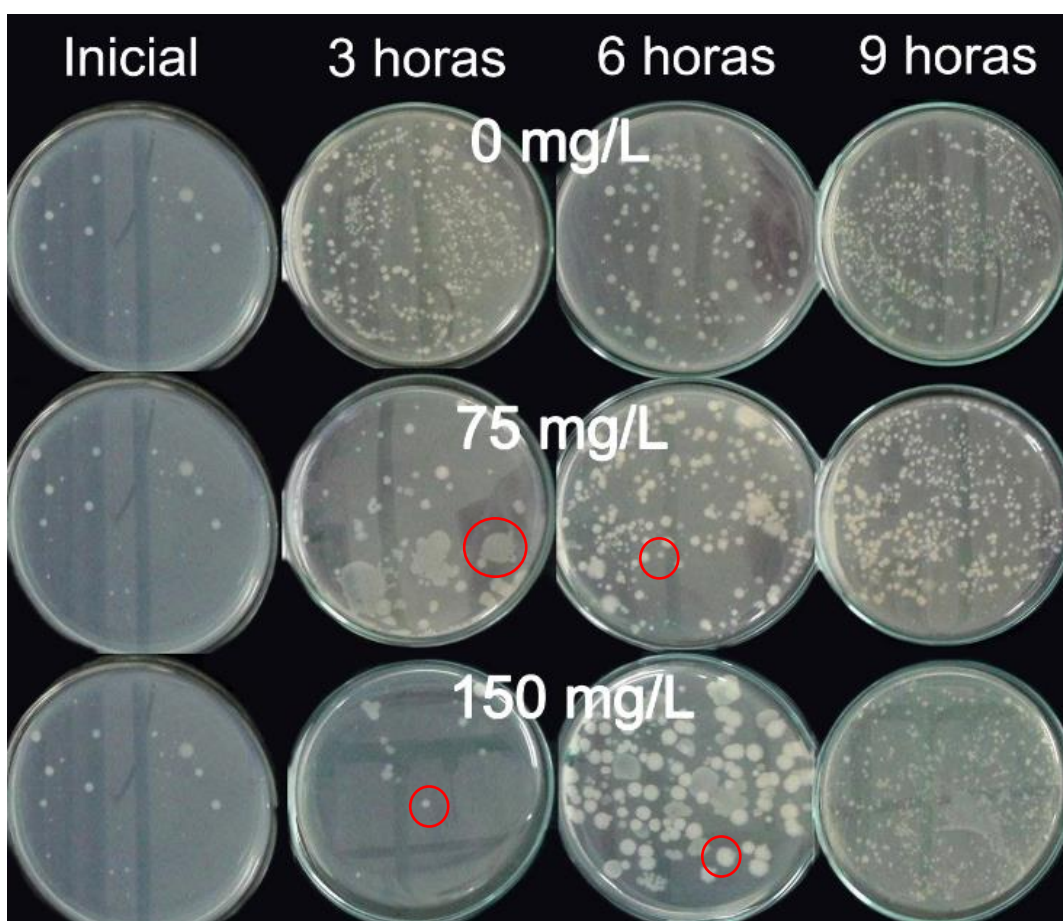
Figura 1. Número de UFC/mL de bactérias ao longo de 9 horas de incubação das amostras de caldo bruto coletadas na Usina São João, Araras – SP, das safras 2015/2016 e 2016/2017, com MBP em concentrações variando de 0 a 800 mg/L, a 30°C, 160 rpm. As datas indicadas em cada gráfico referem-se ao dia da coleta da amostra de caldo.



O aumento no número de bactérias ao final do tempo de incubação do caldo na presença de MBP, superior até mesmo ao controle, pode ser explicado pela diferença na resistência ao MBP apresentada pelas diferentes bactérias presentes no caldo. Na Figura 2 pode ser observado que nas concentrações de 75 e 150 mg/L

de MBP na amostra de caldo bruto coletado em 12/07/2015, há uma mudança nos tipos de colônias crescidas nas placas de Petri com meio Agar Nutriente, em relação ao tratamento controle (sem MBP), onde há maior homogeneidade na morfologia das colônias. Entre 3 e 6 horas de contato com o produto, ocorreu morte de alguns tipos de bactérias e predominância de outros, de forma que com 9 horas de contato, há um número maior de colônias e predominantemente de um só tipo morfológico.

Figura 2. Fotos das placas com meio Ágar Nutriente inoculadas com caldo de cana bruto (amostra coletada em 12/07/2015) para avaliar o crescimento de bactérias nativas, durante 9 horas de contato com MBP em concentrações de 0, 75 e 150 mg/L, a 30°C, 160 rpm. Os círculos em vermelho apontam colônias diferentes de bactérias, nos diferentes tempos de incubação, na mesma concentração de metabissulfito. Todas as placas são da diluição  $10^{-5}$ .



Como há diferentes tipos de bactérias nativas no caldo de cana com distintos padrões de resistência ao MBP, com o aumento da concentração do produto as sensíveis morrem propiciando o aumento do número das bactérias mais resistentes, seja pela liberação de nutrientes devido à autólise celular ou pela diminuição de competição entre as bactérias.

Quando uma célula microbiana é submetida à pressão seletiva, ocorre aclimatação ou adaptação das células às doses crescentes da substância inibitória (etanol, SO<sub>2</sub> ou antibiótico), conferindo resistência. As células resistentes, que sobrevivem à ação do antimicrobiano, assumem vantagem numérica. Além disso, células mutantes que surgem espontaneamente devido à pressão seletiva do antimicrobiano sobrevivem e se multiplicam (DELFINI; FORMICA, 2001). Isto provavelmente deve ter ocorrido nos experimentos aqui realizados.

Nas amostras de caldo sem MBP, o número de bactérias estabilizou em 6 horas de incubação, porém nas amostras com MBP, não foi observada estabilização no número de UFC de bactérias até 9 horas de incubação. Este resultado foi observado apenas em 2015. Esses resultados mostram que o produto tem efeito bacteriostático, porém não duradouro (Figura 1A e 1B).

Com as amostras coletadas na safra 2016/2017, foi também testada a concentração de 800 mg/L de MBP para avaliar se ocorreria morte microbiana, e não somente um efeito bacteriostático como observado nas concentrações de 75 e 150 mg/L. Na amostra de caldo bruto de novembro de 2016, houve diminuição na concentração de bactérias em 3 horas de contato com o MBP, nas três concentrações do produto (75, 150 e 800 mg/L). No entanto, houve aumento do número de UFC em 6 e 9 horas nas concentrações de 75 e 150 mg/L. Na concentração de 800 mg/L, apesar de um ligeiro aumento em 6 horas, houve queda acentuada do número de UFC em 9 horas de contato com o MBP. Na amostra coletada em dezembro de 2016, o resultado foi semelhante, no entanto destaca-se a diminuição no número de UFC em 6 horas na concentração de 150 mg/L e posterior aumento, e a diminuição progressiva no número de bactérias na concentração de 800 mg/L (Figura 1C e 1D).

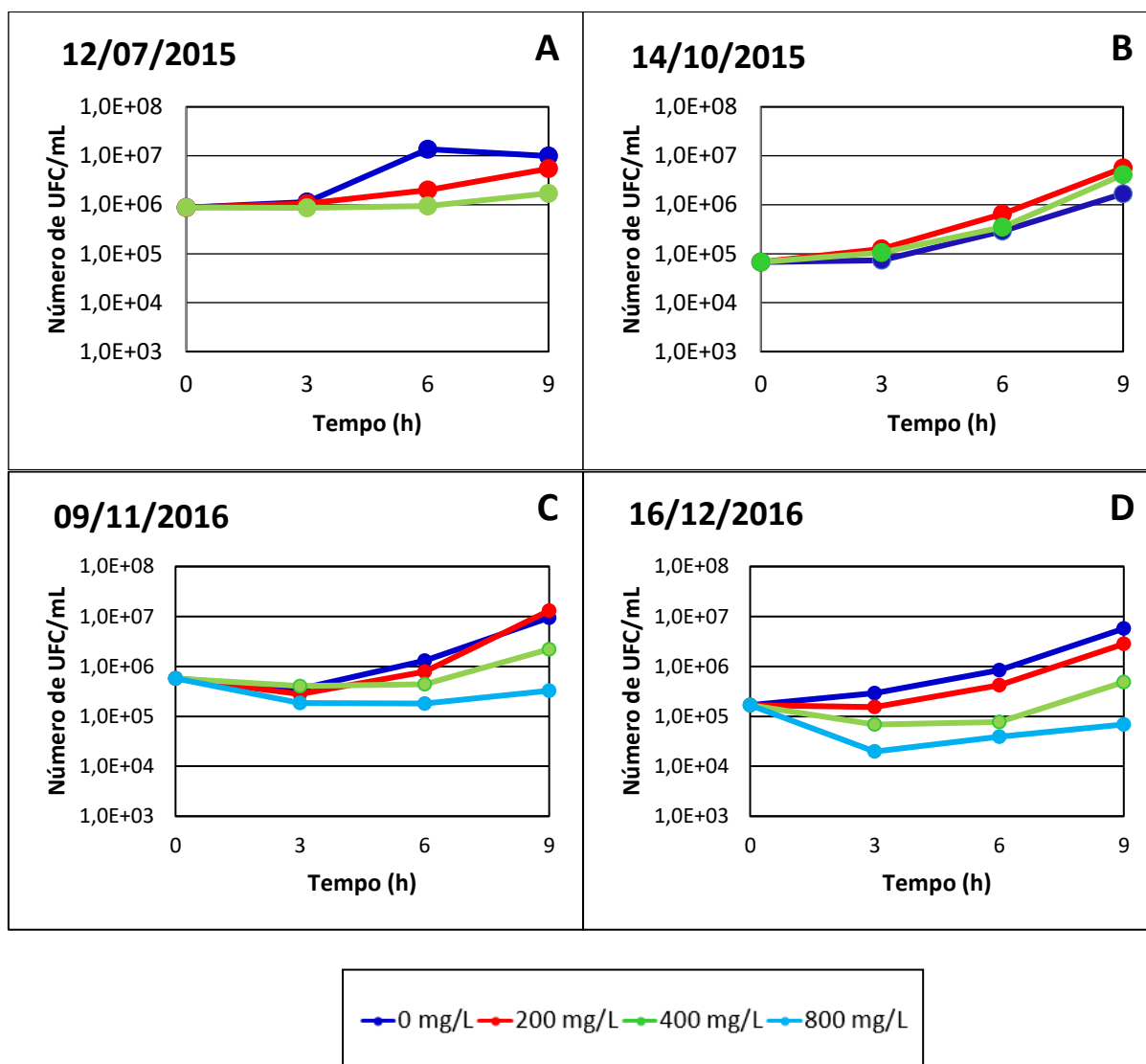
Com relação às leveduras nativas do caldo, verificou-se uma maior resistência ao MBP do que as bactérias nativas. Na concentração de 200 mg/L foi observado um crescimento mais lento e com 400 mg/L de MBP, houve uma quase completa inibição no crescimento de leveduras ao longo de 9 horas de incubação do caldo, porém esse efeito só foi observado na amostra de caldo bruto de julho de 2015 (Figura 3A). Com a amostra de caldo de outubro de 2015, não houve qualquer efeito do MBP mesmo na mais alta concentração (400 mg/L), como pode ser verificado na Figura 3B.

Enquanto para as bactérias nativas parece não ter havido um efeito da sazonalidade, ou seja, da época de coleta da amostra sobre a resposta ao MBP, para as leveduras houve uma sensível diferença quanto à eficiência da concentração de 400 mg/L de MBP entre as quatro amostras (Figura 3). Embora o plaqueamento tenha sido feito em meio YPD, um meio de contagem geral, e não tenha sido avaliada a diversidade de colônias crescidas nas placas, é possível que na amostra de caldo de outubro de 2015 tenha havido uma proporção maior de leveduras *Saccharomyces* do que não-*Saccharomyces*. As leveduras *Saccharomyces* tem maior resistência ao MBP do que leveduras *Dekkera*, por exemplo, como descrito em Bassi et al. (2015). Nesse trabalho, os autores verificaram que uma linhagem de *S. cerevisiae* foi resistente a até 400 mg/L de MBP, seja em meio YPD quanto em caldo ou melação. *D. bruxellensis* teve o crescimento inibido em concentração de 250 mg/L de MBP.

A concentração de 800 mg/L de MBP causou diminuição no número de UFC/mL de leveduras, com controle do crescimento até 9 horas (Figura 3 C e 3D).

Martini et al. (2010) verificaram que o número de *Saccharomyces* aumentou em consonância com a maturação da cana, sendo maior em amostras de caldo de cana (de duas variedades tardias ou médio-tardias) coletadas em maio e setembro que em dezembro, no ano de 2007. Houve uma alteração na proporção de *Saccharomyces* comparando-se o começo e o final da safra. Isso pode ter ocorrido nas amostras de caldo coletadas em julho e outubro de 2015 para o presente trabalho, justificando, portanto, os resultados diferentes quanto à sensibilidade ao MBP entre as duas amostras de caldo. As amostras coletadas na safra de 2016/2017 foram coletadas em novembro e dezembro de 2016, em períodos muito próximos, e assim não houve muita diferença quanto à sensibilidade ao MBP como nas amostras da safra 2015/2016.

Figura 3. Número de UFC/mL de leveduras ao longo de 9 horas de incubação das amostras de caldo bruto coletadas na Usina São João, Araras – SP, das safras 2015/2016 e 2016/2017, com MBP em concentrações variando de 0 a 800 mg/L, a 30°C, 160 rpm. As datas indicadas em cada gráfico referem-se ao dia da coleta da amostra de caldo.



O caldo de cana traz com ele uma enorme diversidade de bactérias e fungos, os quais podem entrar no processo fermentativo e afetar o rendimento do processo fermentativo. Em relação às leveduras, os gêneros *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Meyerozyma*, *Wickerhamiella* e *Zygosaccharomyces* perfazem 11,9% da diversidade de leveduras nos colmos, sendo que *Candida* representa a

maior fração da abundância total relativa das comunidades fúngicas do colmo de cana (SOUZA et al., 2016). Esse trabalho não evidenciou a presença de *Saccharomyces* nos diversos microbiomas da cana estudados (compartimentos endofíticos e exofíticos das raízes, folhas e brotos), enquanto Martini et al. (2010) relataram uma proporção entre 20 e 60% de *Saccharomyces* no caldo de cana dependendo da variedade de cana, época de coleta e parte do colmo, sendo maior na ponta.

Para uma avaliação comparativa entre as quatro amostras de caldo, considerando-se as diferentes concentrações de MBP utilizadas e os tempos de contato do produto com o caldo de cana, foi calculada a redução logarítmica do número de bactérias e leveduras em cada amostra de caldo, concentração de MBP e tempo de contato, destacando-se nas Tabelas 1 e 2, respectivamente, as máximas reduções observadas. Desta forma, avaliando-se os resultados quanto à capacidade do MBP de reduzir a carga microbiana de bactérias e leveduras em termos de ciclos log, para cada concentração, pode-se discutir o seguinte:

- Tanto para bactérias quanto para leveduras, o MBP foi mais eficiente na redução da microbiota do caldo no ano de 2016 que no ano de 2015, mostrando que a variação na diversidade de micro-organismos pode ter afetado a eficiência do MBP. Houve diferença no número inicial de UFC de bactérias (variou de  $2,5 \times 10^6$  a  $5,5 \times 10^7$  UFC/mL) e leveduras (variou de  $6,8 \times 10^4$  a  $8,8 \times 10^5$  UFC/mL) entre as amostras coletadas em 2015 e 2016, o que pode também ter influenciado a eficiência do produto, porém acredita-se que é provavelmente a diversidade dos micro-organismos que deve ter mais influenciado a eficiência do produto;

- O MBP é mais eficiente na redução do número de bactérias nativas do que de leveduras nativas do caldo, atingindo valores máximos de redução logarítmica variando de 1,5 a 2,9 em tempos de contato de 6 e 9 horas, nas concentrações de 150 e 800 mg/L, respectivamente, independentemente da amostra (em 2016);

- Para leveduras, a máxima redução logarítmica foi obtida na concentração de 800 mg/L, no tempo de 3 horas de contato com o MBP, porém não atingiu um ciclo log, na amostra de dezembro de 2016.

Tabela 1. Máxima redução logarítmica do número de bactérias nativas e respectivo tempo de incubação com MBP (entre parênteses) das amostras de caldo bruto coletadas na Usina São João, Araras – SP, durante as safras 2015/2016 e 2016/2017<sup>1</sup>

Concentração de MBP	Data da coleta das amostras de caldo			
	12/07/2015	14/10/2015	09/11/2016	16/12/2016
75 mg/L	-	-	0,54 (3 h)	-
150 mg/L	0,53 (3 h)	-	0,92 (3 h)	1,50 (6 h)
800 mg/L	-	-	2,90 (9 h)	1,86 (6 h)

<sup>1</sup> O traço (-) significa que não houve redução do número de bactérias na concentração de MBP e amostra correspondente

Tabela 2. Máxima redução logarítmica do número de leveduras nativas e respectivo tempo de incubação com MBP (entre parênteses) das amostras de caldo bruto coletadas na Usina São João, Araras – SP, durante as safras 2015/2016 e 2016/2017<sup>1</sup>

Concentração de MBP	Data da coleta das amostras de caldo			
	12/07/2015	14/10/2015	09/11/2016	16/12/2016
200 mg/L	-	-	0,31 (3 h)	0,04 (3 h)
400 mg/L	0,005 (3 h)	-	0,15 (3 h)	0,39 (3 h)
800 mg/L	-	-	0,50 (6 h)	0,93 (3 h)

<sup>1</sup> O traço (-) significa que não houve redução do número de leveduras na concentração de MBP e amostra correspondente

O pH do caldo de cana, por volta de 5,0-5,5, pode ser um fator limitante para o uso do metabissulfito de sódio no controle de bactérias e leveduras nativas. É de se esperar uma maior concentração de MBP para causar redução no número de bactérias e leveduras, uma vez que a eficiência do SO<sub>2</sub> aumenta com a diminuição do pH. Essa característica do caldo de cana – pH 5,0-5,5 – inviabiliza assim o emprego do metabissulfito de potássio. Oliva-Netto e Yokoya (2001) verificaram que a concentração mínima inibitória de sulfito de sódio para bactérias lácticas aumentou cerca de 15 vezes quando o pH passou de 4,5 para 6,5. Verificou-se, portanto, que

seria necessária uma alta concentração de MBP para ter efeito sobre o crescimento das bactérias e leveduras do caldo, o que poderia inviabilizar o seu uso na indústria devido ao custo do produto em termos da quantidade de caldo a ser tratada. Além disso, observou-se um efeito mais biostático do que biocida do produto, o que não garantiria que os micro-organismos contaminantes não se desenvolveriam no caldo na etapa de fermentação nas dornas. Desta forma, os resultados aqui apresentados não indicariam o uso do MBP para tratamento do caldo, nas condições aqui testadas.

## 5. Conclusões

O MBP é eficaz no controle de bactérias e leveduras nativas do caldo na concentração de 800 mg/L com tempo de contato que varia de 3 a 6 horas, proporcionando uma redução máxima de cerca de 1 ciclo log para leveduras e de 1,5 a 1,9 ciclos log para bactérias. A alta concentração do produto inviabiliza o seu uso na indústria devido ao custo em termos de quantidade de caldo a ser tratada.

## 6. Literatura citada

BASSI, A.P.G. et al. Potassium metabisulphite as a potential biocide against *Dekkera bruxellensis* in fuel ethanol fermentations. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 60, n. 3, p. 248- 258, 2015.

BASSO, L.C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Res.**, v.8, p.1155-1163, 2008.

COCCA, L.N.Z. et al. Efeito do metabissulfito de potássio sobre o crescimento de bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. In: Anais VI Four Biotec, São Carlos - UFSCar, p.16, 2015.

DELFINI, C.; FORMICA, J.V. **Wine microbiology: science and technology**. 3. ed., Nova York: Science and Technology, 2001. 499 p.



- DIVOL, B.; du TOIT, M.; DUCKITT, E. Surviving in the presence of sulphur dioxide: strategies developed by wine yeasts. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 95, p. 601–613, 2012.
- FERREIRA, R.J.A. **Tecnologia de produção de álcool: fermentação alcoólica**. Rio de Janeiro, 2008. 73 p.
- MARTINI, C.; MARGARIDO, L.A.C.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Microbiological and physicochemical evaluations of juice extracted from different parts of sugar cane stalks from three varieties cultivated under organic management. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, v. 3, n. 30, p.808-813, 2010.
- OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria from the alcohol industry to several antimicrobial compounds. **Braz. J. Microbiol.**, v. 32, p. 10-14, 2001.
- SOUZA, R.B. de et al. Mineral composition of the sugarcane juice and its influence on the ethanol fermentation. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 175, n. 1, p. 209-222, 2015.
- SOUZA, R.S.C. et al. Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. **Sci. Rep.**, v. 6, p. 28774, 2016. doi: 10.1038/srep28774, 2016.

## **CAPÍTULO 2. Efeito da adição de metabissulfito de potássio ao tratamento ácido do fermento no controle do crescimento de *Dekkera bruxellensis* e *Lactobacillus fermentum***

### **1. Resumo**

Pelo fato de o processo de fabricação de etanol combustível não ser estéril, o controle de micro-organismos não selecionados para o processo se faz necessário, pois podem causar prejuízos à produtividade fermentativa. A levedura contaminante que se destaca é *Dekkera*, pois apresenta alta capacidade de adaptação aos substratos e dentre as bactérias, o gênero *Lactobacillus* é mais frequente. A indústria do vinho utiliza o dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>), na forma de sais de sulfito, para o controle de micro-organismos indesejáveis, mas pouco se conhece sobre a ação deste composto na indústria sucroalcooleira, que comumente faz uso do tratamento ácido do fermento e de antibióticos para o controle dos contaminantes bacterianos. Nesse contexto, este trabalho teve por objetivo inicialmente determinar a concentração mínima inibitória de metabissulfito de potássio (MBP) como fonte de SO<sub>2</sub> para o controle do crescimento de *D. bruxellensis* quando adicionado ao tratamento ácido, em cultura pura e em co-cultura com *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus fermentum*. Em cultura pura, ocorreu uma redução de

aproximadamente 1 ciclo log de *D. bruxellensis* a partir de 225 mg/L de MBP, porém o efeito pode ser observado já na concentração de 150 mg/L, porém em co-cultura com *S. cerevisiae* e *L. fermentum*, o tratamento ácido com MBP na concentração de 225 mg/L ocasionou redução do número de células de *S. cerevisiae*, com efeito sobre a produção de etanol. Em sistema de fermentação em batelada com reciclo celular, a combinação do tratamento ácido e 150 mg/L de MBP ocasionou queda substancial na viabilidade da levedura do processo e dos contaminantes *D. bruxellensis* e *L. fermentum*, com conseqüente decréscimo na produção de etanol e eficiência fermentativa, não se mostrando adequado para o tratamento das células entre os ciclos fermentativos nas condições em que é realizado esse tratamento na indústria (pH 2,0).

## 2. Introdução

O processo fermentativo para fabricação do etanol combustível utilizado no Brasil não ocorre de forma estéril e como o mosto consiste em uma fonte rica em nutrientes que pode variar durante a safra, o caldo de cana carrega uma grande quantidade de micro-organismos (SILVA et al., 2016).

Os prejuízos causados pela contaminação bacteriana na fermentação alcoólica têm início na lavoura com a matéria-prima, com o consumo de açúcar, formação de goma, floculação do fermento, inibição e queda da viabilidade das leveduras devido às toxinas e ácidos orgânicos excretados no meio e, por conseqüência, redução no rendimento e na produtividade da fermentação (ALCARDE et al., 2007). Algumas bactérias podem se fixar em diferentes locais dentro da linha de produção, como trocador de calor, tanques de sacarificação e sistemas de propagação contínua de levedura, formando um biofilme, que funciona como um reservatório de bactérias e sempre são reintroduzidas no processo (KHATIBI et al., 2014).

Dentre as bactérias a principal espécie encontrada nas dornas de fermentação é *L. fermentum*, que causa a co-agregação das células de leveduras (LUCENA et al., 2010; TIUKOVA et al., 2014; CARVALHO-NETTO et al., 2015). Pode também produzir metabólitos que causam danos às células da levedura do processo, inibindo a produção de etanol (BASSO et al., 2014).

Em relação às leveduras, o principal gênero contaminante é *Dekkera*, a qual demonstra robustez e adaptação a variados meios de cultura. Os primeiros estudos com essa contaminante ocorreram nas vinícolas, pois ela deteriorava o vinho já engarrafado. Mas a espécie *D. bruxellensis* tem aparecido frequentemente como contaminante no processo de fabricação do etanol, com diversos trabalhos mostrando sua adaptação e seu poder competitivo (SILVA, 1994; SILVA et al., 2016).

As usinas fazem uso do tratamento ácido para o controle das contaminações, porém ele é apenas eficiente contra as bactérias (AMORIM et al., 2011). As leveduras contaminantes, principalmente *D. bruxellensis*, se mostram resistentes ao tratamento ácido.

Estudos tem relatado o dióxido de enxofre como um agente antimicrobiano, ao qual *D. bruxellensis* se mostra sensível (DIVOL et al., 2012). As vinícolas usam este composto na forma de metabissulfito de potássio (MBP), e sua ação é dependente especialmente do pH da solução.

Devido ao papel de *D. bruxellensis* na produção industrial de etanol no Brasil, à sua sensibilidade diferencial ao MBP comparando-se com *Saccharomyces cerevisiae* a potencialização do efeito do MBP em baixo pH, este trabalho objetivou avaliar o efeito do MBP quando adicionado ao tratamento ácido do fermento, simulando as condições em que é realizado industrialmente.

Inicialmente foi determinada a concentração mínima inibitória do MBP sendo adicionado ao tratamento ácido para o controle de *D. bruxellensis* e em seguida verificou-se o efeito desse tratamento com MBP sobre os parâmetros fermentativos em uma fermentação contaminada com *D. bruxellensis* e *L. fermentum* e conduzida pela levedura industrial *S. cerevisiae* PE-2. Estudos anteriores apontaram que a concentração de 250 mg/L de MBP adicionada ao tratamento ácido teve efeito no controle de crescimento de *D. bruxellensis*, no entanto, afetou drasticamente a produção de etanol (BASSI et al, 2015).

### **3. Materiais e Métodos**

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

Para este experimento, foram utilizados os seguintes micro-organismos: *S. cerevisiae* (linhagem PE-2), *D. bruxellensis* (linhagem CCA155-CCT7784) e *L. fermentum* CCT5852 (ATCC19255). 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 as leveduras 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 Determinação da concentração mínima inibitória de MBP adicionado ao tratamento ácido do fermento para controle do crescimento de *D. bruxellensis***

A levedura *D. bruxellensis* foi crescida em caldo de cana esterilizado (4°Brix, pH 5,5), com transferências diárias para novo meio até atingir a concentração celular de  $1 \times 10^9$  células/mL. Alíquotas de 10 mL da suspensão concentrada (previamente centrifugada e ressuspensa em água destilada) foram adicionadas à solução ácida estéril, preparada com ácido sulfúrico e água, para um pH final de 2,0 e com a adição ou não de MBP (Dinâmica®) para concentrações finais de 0, 50, 100, 150, 200 e 250 mg/L. As soluções de MBP foram preparadas a partir de uma solução concentrada, pesando-se a massa desejada de MBP a qual foi adicionada à água destilada estéril e a solução filtrada em membrana Millipore® 0,45µm. Os Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de volume final (em duplicata para cada concentração de MBP) foram mantidos por 90 minutos a 30°C, a 160 rpm de agitação. Em seguida, o conteúdo dos frascos foi centrifugado, o sobrenadante descartado e as células lavadas em água destilada estéril e em seguida ressuspensas em meio de fermentação esterilizado (100 mL de caldo de cana 16°Brix, pH 4,5, adicionado de 1 mL/L de solução de sais) em Erlenmeyers de 250 mL, incubados a 30°C, por 12 horas, sem agitação.

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 121°C, 15 minutos e a seguir armazenada a 4°C.

O caldo de cana utilizado para o preparo do meio de fermentação 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 121°C por 15 minutos.

Para a contagem do número inicial de *D. bruxellensis*, foi preparado um frasco contendo água destilada estéril em substituição à solução ácida, adicionando-se o inóculo da levedura. Foram retiradas amostras após o tratamento ácido e depois da fermentação de 12 horas. Alíquotas de 1 mL foram diluídas em série e plaqueadas em meio YPD para contagem do número de UFC/mL de *D. bruxellensis*. As placas foram incubadas a 30°C por 5 dias e as colônias foram contadas.

Em seguida, foi realizado um experimento com concentrações de MBP de 0, 150, 175, 200, 225 e 250 mg/L de MBP. O ensaio foi executado da mesma forma como descrito acima. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Os resultados obtidos foram utilizados para estimar a concentração mínima de MBP que causa redução de 1 ciclo log no crescimento de *D. bruxellensis* após o tratamento com MBP. Foi calculada a redução logarítmica do número de *D. bruxellensis* considerando-se o número de UFC/mL inicial em relação ao número de UFC/mL ao final do tratamento com MBP, em cada concentração de MBP. Em seguida, foi realizada regressão polinomial para obtenção do polinômio que expresse a relação entre redução logarítmica X concentração de MBP e respectivo coeficiente de correlação. A redução logarítmica foi calculada da seguinte forma: Redução logarítmica = log UFC/mL inicial – log UFC/mL final.

### **3.3 Efeito do MBP adicionado ao tratamento ácido do fermento para controle do crescimento de *D. bruxellensis* e *L. fermentum* em co-cultura com *S. cerevisiae* em fermentação em batelada com reciclo celular**

Inicialmente foi realizado um teste para avaliar o efeito da adição de 225 mg/L de MBP ao tratamento ácido sobre o crescimento de *D. bruxellensis* e *L. fermentum* em co-cultura com *S. cerevisiae*, em ciclo único. A avaliação do crescimento foi realizada após o tratamento e após fermentação.

As leveduras e a bactéria foram crescidas separadamente em caldo de cana esterilizado (4°Brix, pH 5,5), com transferências diárias para novo meio até atingir a concentração celular de  $3 \times 10^9$  células/mL. A concentração inicial de bactéria foi padronizada em 1,0 de densidade óptica após leitura no espectrofotômetro

ThermoBiomate® a 540 nm. Para as leveduras, foi realizada contagem em Câmara de Neubauer após coloração com solução de citrato de sódio-azul de metileno (LEE et al., 1981). Alíquotas de 2mL da suspensão concentrada de cada micro-organismo (previamente centrifugada e ressuspendida em água destilada) foram adicionadas à solução ácida esterilizada (a solução foi preparada com adição de ácido sulfúrico à água destilada até obtenção de pH 2,0, com o valor monitorado em pH-metro digital) sem e com a adição de MBP para uma concentração final de 225 mg/L, em duplicata. Os Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de volume final foram mantidos por 90 minutos a 30°C, 160 rpm. Ao final, o conteúdo dos frascos foi centrifugado, o sobrenadante descartado, as células lavadas em água destilada estéril e em seguida ressuspensas em caldo de fermentação (16° Brix, pH 4,5, adicionado de 1 mL/L de solução de sais, cuja composição foi descrita no item anterior). Os frascos foram mantidos por 9 horas a 30°C sem agitação. Em seguida, o conteúdo dos frascos foi centrifugado, o sobrenadante armazenado em *freezer* em tubo Falcon para posterior análise do teor alcoólico e as células descartadas.

Em seguida, foi realizado um teste fermentativo com reciclo celular e tratamento ácido + MBP (concentração de 150 mg/L) realizado entre os ciclos de fermentação. O preparo do inóculo foi realizado conforme descrito acima. Alíquotas de 2 mL da suspensão concentrada de cada micro-organismo (previamente centrifugada e ressuspendida em água destilada) foram adicionadas ao caldo de fermentação esterilizado (44 mL de caldo de cana 16°Brix, pH 4,5, adicionado de 1 mL/L de solução de sais, cuja composição foi descrita no item anterior). Os Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de volume final foram mantidos por 9 horas a 30°C, sem agitação. Ao final, o conteúdo dos frascos foi centrifugado e o sobrenadante armazenado para os testes físico-químicos e as células lavadas em água destilada estéril e em seguida ressuspensas em solução ácida estéril, preparada com ácido sulfúrico e água, para um pH final de 2,0, adicionando-se MBP para uma concentração final de 150 mg/L. Os frascos foram mantidos sob agitação a 160 rpm, a 30°C por 90 minutos. Em seguida, o conteúdo dos frascos foi centrifugado, o sobrenadante descartado e as células lavadas em água destilada estéril e em seguida ressuspensas em meio de fermentação. Foram realizados 6 ciclos fermentativos de 9 horas, com a utilização do tratamento ácido + MBP entre um ciclo e outro, lavando-se as células em água destilada estéril antes de adicionar ao frasco de fermentação contendo caldo de cana.

O caldo de cana utilizado para o preparo do meio de fermentação 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.

Para a contagem do número inicial de cada micro-organismo, foi preparado um frasco contendo água destilada estéril, adicionando-se os inóculos das leveduras e da bactéria. Foram retiradas também amostras ao final de cada ciclo fermentativo, antes do tratamento ácido + MBP. Alíquotas de 1 mL foram diluídas em série e plaqueadas em meio YPD acrescido de antibióticos (cloranfenicol e tetraciclina, concentração final de 50 mg/L, para cada um), YPD + antibióticos + actidione (concentração final de 10 mg/L) e MRS (Himedia®), acrescido de nistatina na concentração final de 50 mg/L) para contagem do número de UFC/mL de *S. cerevisiae*, *D. bruxellensis* e *L. fermentum*, respectivamente. As placas com YPD foram incubadas a 30°C para crescimento das leveduras (contagem de UFC/mL após 3 dias e 5 dias para *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis*, respectivamente) e as placas com MRS foram incubadas a 35°C para crescimento da bactéria, por 3 dias.

Foi também realizado o controle, ou seja, tratamento das células em solução ácida sem adição de MBP. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

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

Foi transferido 1 mL de cada amostra para balões volumétricos de 100 mL, sendo em seguida, adicionados 30 mL de água destilada e 2,5 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado e homogeneizado. Os balões foram levados para banho-maria a 65°C por 15 minutos. As amostras foram resfriadas em água corrente e em seguida adicionados 2,8 mL de solução de NaOH 12 mols/L e completado o volume do balão até o menisco com água destilada. Foi retirado 1 mL de cada solução preparada transferindo-se para tubos de ensaio, onde foi adicionado 1 mL da solução estoque de ADNS e 1 mL de água destilada, tendo no total 3 mL. As



amostras foram submetidas ao banho térmico (água fervente) por 5 minutos, e em seguida foram resfriadas em água corrente e receberam 5 mL de água destilada, perfazendo um total de 8 mL. Os tubos foram homogeneizados por 5 segundos em vórtex e foi realizada a leitura da absorbância a 540 nm em espectrofotômetro digital (ThermoBiomate®). 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:

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

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

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

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

## 4. Resultados e Discussão

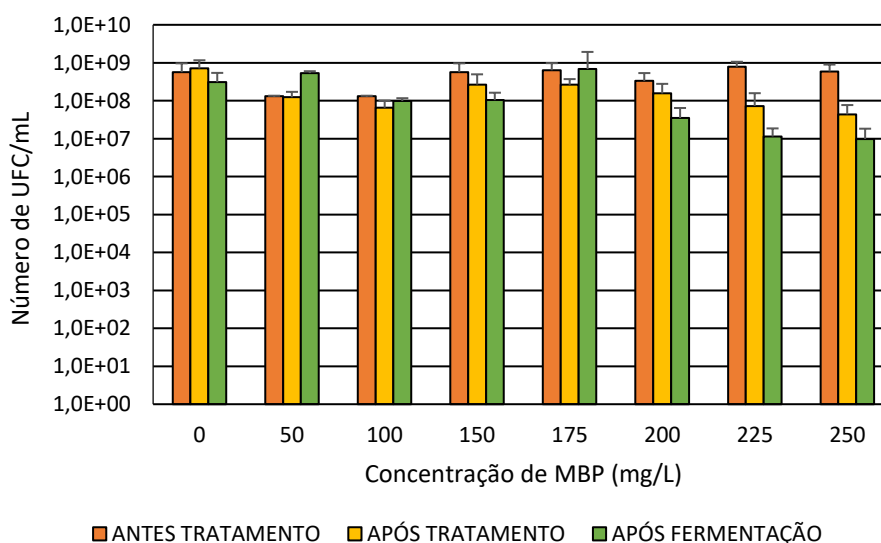
### 4.1 Determinação da concentração mínima inibitória de MBP adicionado ao tratamento ácido do fermento para controle do crescimento de *D. bruxellensis*

Em estudo anterior, a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de MBP para três linhagens de *D. bruxellensis* (entre elas a que foi utilizada neste trabalho, CCA155) foi realizada em condições de crescimento, em meio de caldo de cana, pH 4,5, sob agitação. No entanto, verificou-se que o efeito do MBP foi potencializado quando esta concentração otimizada (250 mg/L) foi utilizada no tratamento do fermento, em pH 2,0, impactando consideravelmente a produção de etanol, por afetar diretamente a fisiologia da levedura *S. cerevisiae* (BASSI et al., 2015). Nesta etapa do presente trabalho, objetivou-se a determinação da CMI do

MBP quando adicionado ao tratamento ácido do fermento, pois do ponto de vista industrial, esta etapa seria mais adequada (menor volume para ser tratado e mais baixo pH, o que diminuiria a quantidade de MBP a ser utilizada) para este procedimento do que durante a fermentação. A meta foi minimizar o impacto do MBP sobre o rendimento fermentativo e viabilidade da levedura do processo, com controle de crescimento da levedura contaminante.

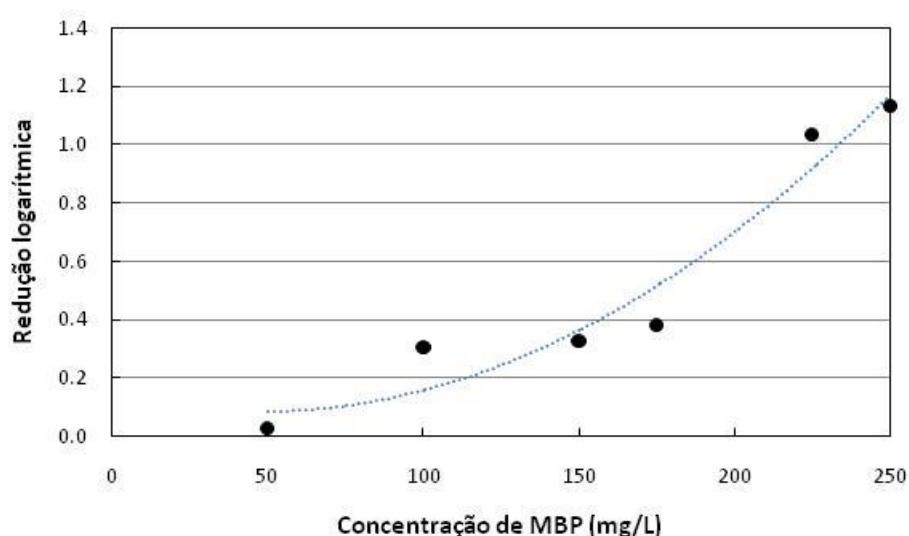
Os resultados obtidos quanto ao número de UFC de *D. bruxellensis* submetida a tratamento celular ácido com MBP em variadas concentrações estão apresentados na Figura 1. Considerando-se o número de UFC inicial (antes de iniciar o tratamento) e o número de UFC após o tratamento, houve redução do número de UFC em todas as concentrações a partir de 100 mg/L de MBP, variando de 50 a 58% até a concentração de 200 mg/L. Nas concentrações de 225 e 250 mg/L, as reduções foram da ordem de 90 a 92%, portanto de aproximadamente 1 ciclo log. É importante enfatizar que após o tratamento ácido, quando as células foram colocadas para fermentação em meio de caldo de cana com alto teor de açúcar (16°Brix), houve um decréscimo progressivo do número de UFC de *D. bruxellensis* a partir de 200 mg/L de MBP, evidenciando o efeito residual do produto sobre o metabolismo/viabilidade da levedura. Nas concentrações inferiores a 200 mg/L, esse efeito não acontece ou é mínimo.

Figura 1. Número de UFC/mL de *D. bruxellensis* antes do tratamento ácido adicionado ou não de metabissulfito de potássio (MBP) em concentrações variando de 50 a 250 mg/L, após o tratamento e após fermentação em caldo de cana por 12 horas.



Considerando-se a redução logarítmica de *D. bruxellensis* em função da concentração de MBP, obteve-se um polinômio de segundo grau com alto coeficiente de correlação (excluindo-se o ponto de 200 mg/L para melhor ajuste da curva), representado na Figura 2. A partir da equação obtida, foi possível estimar o valor de 216 mg/L como sendo a concentração de MBP que causa a redução de um ciclo log no crescimento de *D. bruxellensis*.

Figura 2. Variação da redução logarítmica de *D. bruxellensis* em função da concentração de MBP adicionado ao tratamento ácido<sup>1,2</sup>



<sup>1</sup> Equação do polinômio:  $y = 3E-05x^2 - 0,0025x + 0,143$  ( $R^2 = 0,9399$ )

<sup>2</sup> A variação da redução foi calculada a partir dos resultados obtidos durante os 90 minutos de tratamento

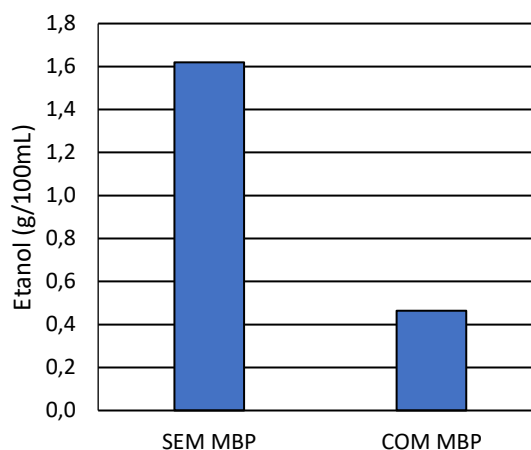
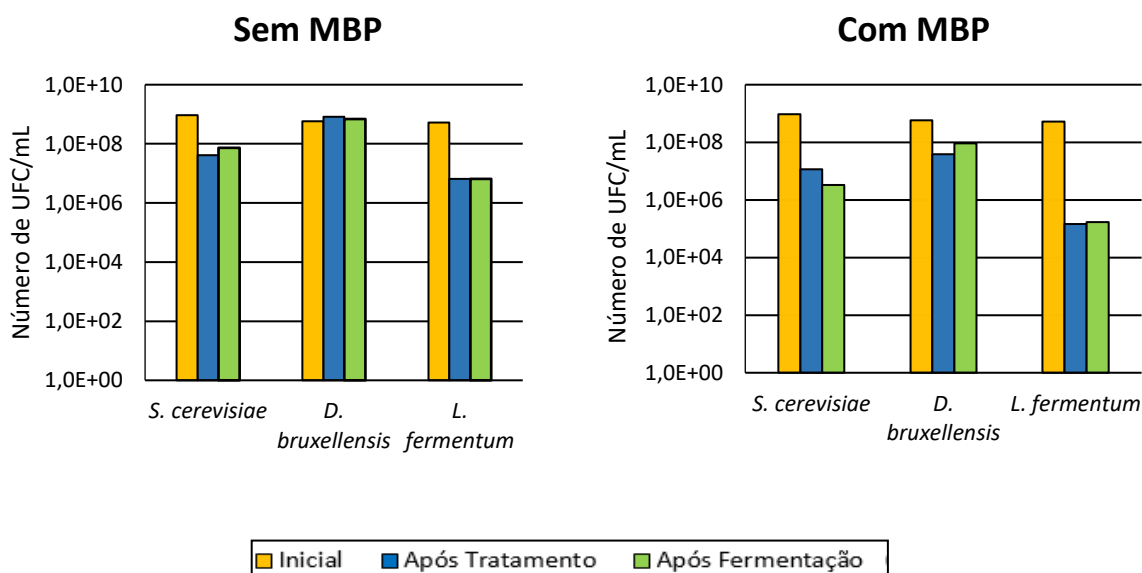
Os resultados mostraram, portanto, que seria possível reduzir a concentração de MBP de 250 mg/L (conforme otimizado por Bassi et al., 2015 e que causou redução na produção de etanol por *S. cerevisiae*) para 216 mg/L para causar redução do crescimento de *D. bruxellensis* em um ciclo log quando o MBP é adicionado ao tratamento ácido. No entanto, a diferença entre as concentrações otimizadas anteriormente e neste trabalho é pequena, o que não deve minimizar o efeito sobre os parâmetros fermentativos quando *S. cerevisiae* estiver presente. Torna-se importante verificar o efeito dessa concentração sobre a viabilidade de *S. cerevisiae* e sobre o rendimento fermentativo.

#### **4.2 Efeito do MBP adicionado ao tratamento ácido do fermento para controle do crescimento de *D. bruxellensis* e *L. fermentum* em co-cultura com *S. cerevisiae* em fermentação em batelada com reciclo celular**

Os resultados anteriores mostraram uma estimativa (através da regressão polinomial dos resultados de redução logarítmica) de 216 mg/L de MBP adicionado ao tratamento ácido, em um ciclo de tratamento, para ocasionar uma redução de um ciclo log no crescimento de *D. bruxellensis* em cultura pura. Na presente fase dos experimentos, foi avaliado o efeito do MBP adicionado ao tratamento ácido sobre a viabilidade celular de uma co-cultura de *S. cerevisiae*, *D. bruxellensis* e *L. fermentum*, e sobre a produção de etanol. Considerando que no trabalho de Bassi et al. (2015) uma concentração de 250 mg/L adicionada ao tratamento ácido ocasionou redução na produção de etanol, que a concentração estimada para ter uma redução de 1 ciclo log foi 216 mg/L, e que a partir de 225 mg/L é que houve redução de 1 ciclo log considerando-se os valores testados experimentalmente, inferiu-se que provavelmente concentrações de 216 ou 225 mg/L teriam também efeito prejudicial sobre o rendimento fermentativo, uma vez que os valores são muito próximos entre si (216 – 225 e 250 mg/L). Assim, antes de proceder ao experimento de fermentação com reciclo celular, foi feito um teste de tratamento ácido e fermentação com a co-cultura acima descrita utilizando somente um ciclo de fermentação, para avaliar o efeito sobre a viabilidade dos micro-organismos e sobre a produção de etanol. Os resultados estão expressos na Figura 3.

A adição de 225 mg/L de MBP ao tratamento ácido ocasionou decréscimos de 72,3%, 95,4% e 97,8% no número de UFC/mL de *S. cerevisiae*, *D. bruxellensis* e *L. fermentum*, respectivamente (comparando-se os resultados sem e com adição de MBP, após o tratamento das células, para cada micro-organismo). Há de se ressaltar ainda que a levedura *S. cerevisiae* não apresentou recuperação no número de UFC/mL após a etapa de fermentação, com uma diminuição de cerca de 70% no número de UFC/mL. Para os outros micro-organismos, não houve diminuição. Houve ainda um decréscimo de 71,3% no teor alcoólico da fermentação, corroborando resultados anteriores (BASSI et al., 2015) que mostraram que o MBP tem efeito seletivo sobre os micro-organismos, com menor efeito sobre a viabilidade da levedura do processo, porém com efeito sobre o metabolismo da levedura, interferindo na produção de etanol.

Figura 3. Produção de etanol após fermentação e número de micro-organismos antes do tratamento ácido das células (pH 2,0) acrescido ou não de 225 mg/L de MBP, depois do tratamento e depois da fermentação em caldo de cana 16°Brix, a 30°C, por 9 horas, pH inicial 4,5. 'Inicial' refere-se aos resultados antes do tratamento ácido das células.



Assim, a concentração testada anteriormente (225 mg/L) que causou um decréscimo de 1 ciclo log no crescimento de *D. bruxellensis* em cultura pura, também provocou o mesmo efeito quando essa levedura foi co-cultivada com *S. cerevisiae* e *L. fermentum*. No entanto, houve um efeito sobre o metabolismo da levedura do processo, de forma a resultar em diminuição de cerca de 70% na produção de etanol. Desta forma, optou-se por trabalhar com uma concentração menor de MBP, ou seja, 150 mg/L, que foi a concentração mais baixa de MBP que

apresentou redução no número de UFC de *D. bruxellensis* depois do tratamento das células e após a fermentação, conforme Figura 1.

Os resultados obtidos na fermentação com reciclo celular utilizando-se a co-cultura de *S. cerevisiae*, *D. bruxellensis* e *L. fermentum* com e sem a adição de 150 mg/L de MBP no tratamento ácido das células estão representados nas Figuras 4 e 5.

Figura 4. Número de micro-organismos em fermentação em batelada com co-cultura de *S. cerevisiae*, *D. bruxellensis* e *L. fermentum*, com reciclo celular e tratamento ácido das células (pH 2,0) acrescido ou não de 150 mg/L de MBP, em caldo de cana 16°Brix, 30°C, pH inicial 4,5. 'Inicial' refere-se aos resultados no início do 1º. ciclo fermentativo.

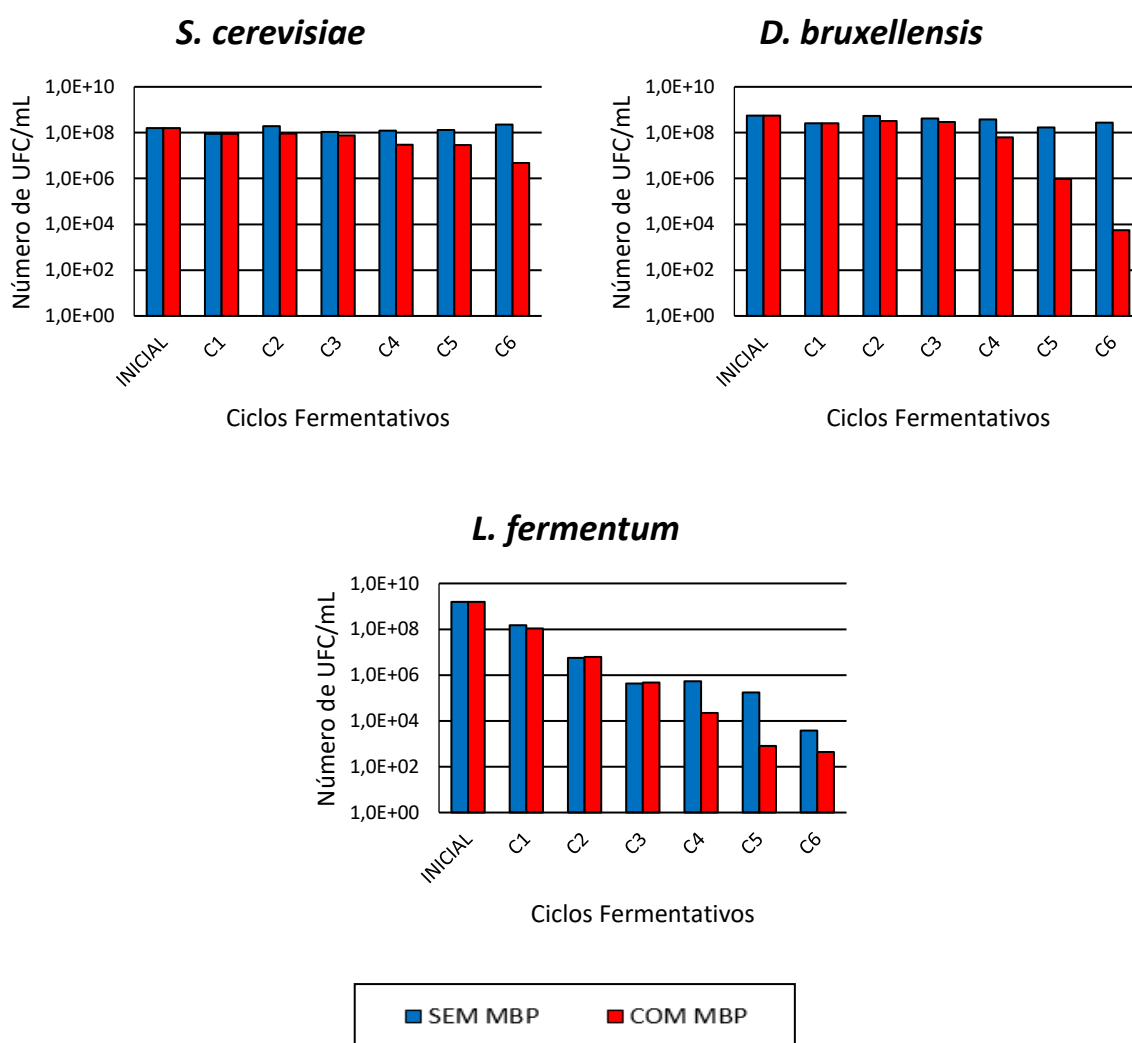
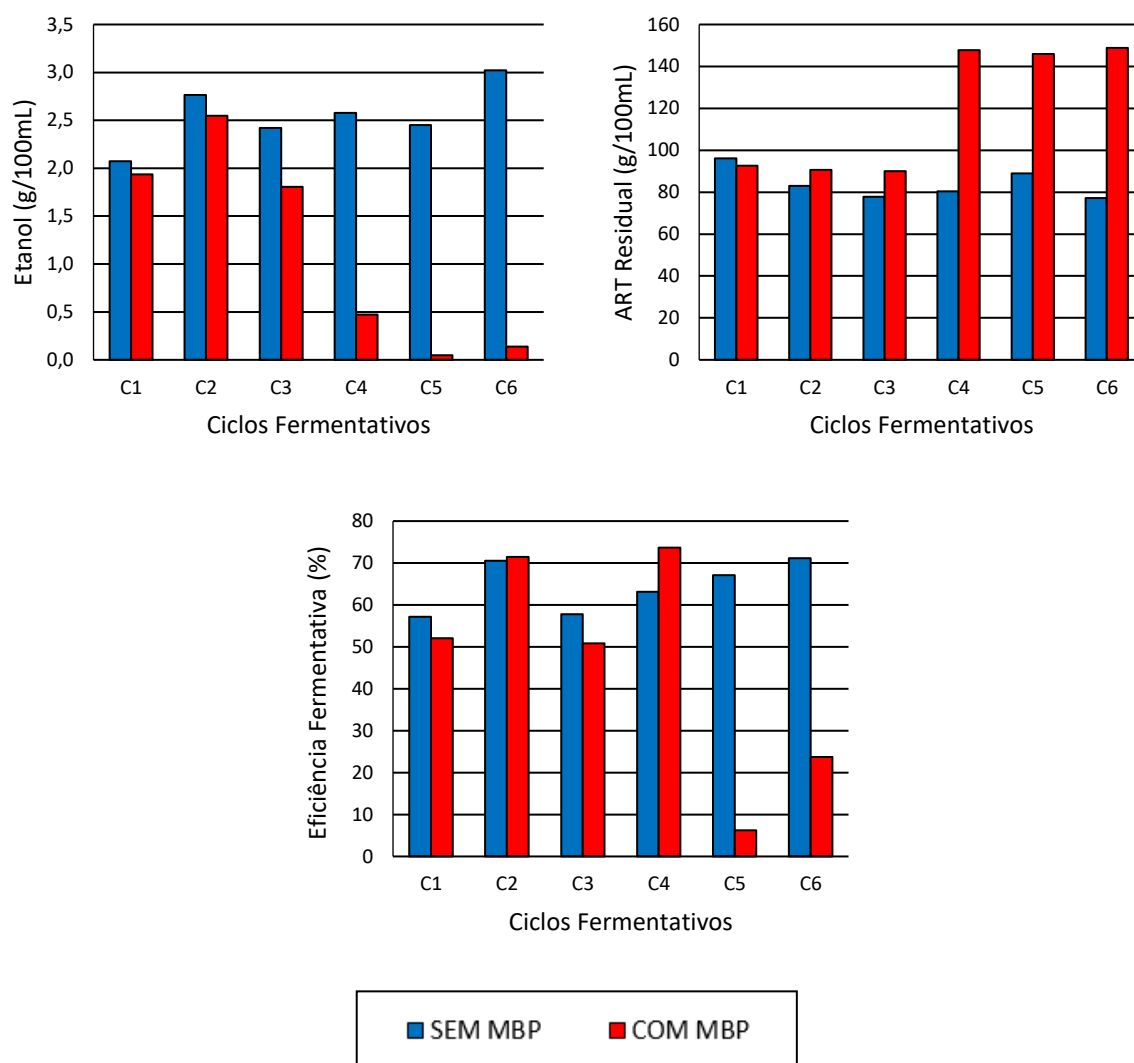


Figura 5. Produção de etanol, açúcar redutor total (ART) residual e eficiência fermentativa em fermentação em batelada com co-cultura de *S. cerevisiae*, *D. bruxellensis* e *L. fermentum*, com reciclo celular e tratamento ácido das células (pH 2,0) acrescido ou não de 150 mg/L de MBP, em caldo de cana 16°Brix, 30°C, pH inicial 4,5.



A adição de uma concentração menor de MBP não diminuiu o efeito sobre a viabilidade das células de *S. cerevisiae*. Verificou-se diferença entre o número de UFC/mL comparando-se os resultados com e sem adição de MBP a partir do 2º. ciclo fermentativo (que é o primeiro ciclo fermentativo após o tratamento), mostrando o efeito do MBP sobre a viabilidade da levedura. A redução no número de UFC variou de 52 a 98%, do 2º. ao 6º. ciclo fermentativo devido ao uso do MBP. Para *D. bruxellensis*, ocorreu o mesmo resultado, com variação de 39 a 99% no mesmo

intervalo. Com relação à *L. fermentum*, o efeito do MBP foi evidente a partir do 4º ciclo fermentativo, ocasionando redução de mais de 95% do número de UFC/mL (Figura 4).

O efeito do MBP sobre a viabilidade de *S. cerevisiae* acarretou em decréscimo na produção de etanol, maior sobra de açúcar redutor no meio de fermentação e diminuição da eficiência fermentativa. Sem a adição de MBP ao tratamento ácido, a produção de etanol variou de 2,07 a 3,02 g/100 mL, enquanto com MBP, o teor alcoólico decresceu de 1,94 para menos de 0,1 g/100 mL, ao final do sexto ciclo fermentativo. Até o quarto ciclo fermentativo, a eficiência fermentativa no tratamento com MBP foi muito semelhante ao tratamento sem MBP, no entanto a eficiência diminuiu drasticamente no quinto e sexto ciclo de fermentação (Figura 5).

O objetivo da adição de MBP ao tratamento ácido seria o de controlar o crescimento dos contaminantes *D. bruxellensis* e *L. fermentum* sem afetar a viabilidade da levedura do processo *S. cerevisiae*, utilizando a mínima concentração do produto visando minimizar o efeito sobre os parâmetros fermentativos e custo. No entanto, embora se verifique uma sensibilidade diferencial das leveduras ao MBP, sendo *D. bruxellensis* mais sensível, e a sensibilidade ainda maior da bactéria *L. fermentum*, a adição do produto ao tratamento ácido após cada ciclo de fermentação acabou por impactar os parâmetros fermentativos, causando redução na produção de etanol e eficiência fermentativa, a tal ponto que a adição de MBP se tornou mais prejudicial que a própria contaminação em si. A interação do MBP com acetaldeído (HARADA et al., 1968) principalmente afeta diretamente a produção de etanol, por diminuir a concentração do precursor para a conversão em etanol. O efeito sobre as células de *S. cerevisiae* diretamente por conta dos ciclos celulares e tratamento ácido + MBP também afeta de alguma forma o rendimento fermentativo, pela diminuição no número de células.

Esse trabalho foi uma tentativa de otimizar a concentração de MBP para adicionar ao tratamento ácido por julgar que essa seria a etapa mais adequada para esta finalidade (menor volume e potencialização do efeito por causa do baixo pH). Bassi et al. (2015) propuseram a adição de MBP durante a fermentação, e embora tenha ocorrido uma redução na produção de etanol, não houve efeito sobre a viabilidade de *S. cerevisiae* e ocorreu o controle do crescimento de *D. bruxellensis*, o qual aumentou cerca de 3 ciclos log na ausência de MBP. Essa estratégia



acarretaria maior custo à indústria por utilizar maior quantidade do produto devido ao tamanho das dornas de fermentação, mas parece ser a melhor opção.

O sulfito é um antimicrobiano intensamente utilizado na vinificação para controle de bactérias e leveduras selvagens que podem trazer mudanças sensoriais no vinho (du TOIT; PRETORIUS, 2000). O seu emprego na fermentação alcoólica para produção de etanol combustível não se mostrou viável com os experimentos aqui realizados, seja adicionando-se ao caldo antes de entrar na fermentação (dados apresentados no Capítulo 1) ou ao tratamento ácido, o que se credita especialmente ao fato de requerer altas concentrações para reduzir a carga microbiana sem ocasionar esterilização do substrato ou ao fato de se combinar com o acetaldeído (HARADA et al., 1968) para inativação e assim afetar a produção de etanol e viabilidade da levedura do processo. Na vinificação, o sulfito é adicionado especialmente na etapa de esmagamento das uvas, ao fim da fermentação maloláctica ou alcoólica e no engarrafamento (du TOIT; PRETORIUS, 2000). Nessas situações, e devido ao pH do mosto de uva, o sulfito é mais eficiente no controle de micro-organismos indesejáveis e afeta pouco a fermentação por *S. cerevisiae*. Além disso, a fermentação vínica é bem diferente da fermentação etanólica especialmente pelo fato de ser mais longa e não requerer a reutilização do fermento em ciclos celulares e tratamento ácido. Estas condições fazem provavelmente a diferença quanto à sua eficiência naquela fermentação em relação à fermentação etanólica.

## 5. Conclusões

A adição de 150 mg/L de MBP ao tratamento ácido do fermento em um sistema de fermentação em batelada com reciclo celular ocasionou queda substancial na viabilidade da levedura do processo e dos contaminantes *D. bruxellensis* e *L. fermentum*, com conseqüente decréscimo na produção de etanol e eficiência fermentativa. O metabissulfito de potássio não se mostrou adequado para o tratamento das células entre os ciclos fermentativos nas condições em que é realizado esse tratamento na indústria (pH 2,0).

## 6. Literatura citada

AMORIM, H.V. et al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 91, p. 1267-1275, 2011.

ALCARDE, A.R.; HORII, J.; NOBRE, T.P. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 20-25, 2007.

BASSI, A.P.G. et al. Potassium metabisulphite as a potential biocide against *Dekkera bruxellensis* in fuel ethanol fermentations. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 60, n. 3, p. 248- 258, 2015.

BASSO, T.O. et al. Homo-and heterofermentative lactobacilli differently affect sugar cane based fuel ethanol fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 105, p. 169-177, 2014.

CARVALHO-NETO, O.V. et al. *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional reprogramming due to bacterial contamination during industrial scale bioethanol production. **Microb. Cell Fact.**, v. 14, p. 1-13, 2015.

DIVOL, B.; du TOIT, M.; DUCKITT, E. Surviving in the presence of sulphur dioxide: strategies developed by wine yeasts. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 95, p. 601–613, 2012.

du TOIT, M.; PRETORIUS, I.S. Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons from nature's own arsenal- a review. **Enol. Viticult.**, v. 21, p. 74–96, 2000.

HARADA, K.; HIGUCHI, R.; UTSUMI, I. Studies on sorbic acid. Part 4. Inhibition of the respiration in yeast. **Agr. Biol. Chem.**, v. 32, n. 8, p. 940-946, 1968.

- LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y.; Rapid determination of yeast viability. **Biotechnol. Bioengin. Symp.**, v. 11, p. 641-649, 1981.
- LUCENA, B.T.L. et al. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. **BMC Microbiol.**, v. 10, p. 298-306, 2010.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem**, v. 31, p. 426, 1959.
- KHATIBI, P. A. et al. *Saccharomyces cerevisiae* expressing bacteriophage endolysins reduce *Lactobacillus* contamination during fermentation. **Biotechnol. Biofuels**, v. 7, n. 104, p.1-13, 2014.
- SILVA, R. B. O. **Leveduras contaminantes na produção de etanol industrial por processo contínuo: quantificação e identificação.** 1994. 145 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 1994.
- SILVA, T.C.D.; LEITE, F.C.B.; MORAIS Jr., M.A. Distribution of *Dekkera bruxellensis* in a sugarcane-based fuel ethanol fermentation plant. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 62., p. 354-358, 2016.
- SOUZA, R. S. C. et al. Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. **Sci. Rep.**, v. 6, p. 28774, 2016. doi: 10.1038/srep28774, 2016.
- TIUKOVA, I.; EBERHARD, T.; PASSOTH, V. Interaction of *Lactobacillus vini* with the ethanol-producing yeasts *Dekkera bruxellensis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Appl. Bioch.**, v. 61, p. 40-44, 2014.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho teve por objetivo verificar a viabilidade de utilização do metabissulfito de potássio (MBP) em duas fases do processo fermentativo para produção de etanol combustível, adicionando-o ao caldo de cana bruto e ao tratamento ácido do fermento, visando avaliar o emprego dessa substância tão utilizada na indústria vinícola, no contexto da fermentação etanólica para o controle de leveduras selvagens e de bactérias.

A eficiência do MBP no controle de bactérias e leveduras nativas do caldo apenas foi relevante na concentração de 800 mg/L, com tempo de contato que variou de 3 a 6 horas, onde obteve-se uma redução máxima de aproximadamente 1 ciclo log para leveduras e de 1,5 a 1,9 ciclos log para bactérias, mas a alta concentração deste produto inviabiliza o seu uso na indústria devido ao seu custo.

Após a determinação da concentração mínima inibitória do MBP quando adicionado ao tratamento ácido do fermento contra *D. bruxellensis*, uma importante levedura contaminante da fermentação etanólica, verificou-se que a adição de 150 mg/L de MBP ao tratamento ácido do fermento em um sistema de fermentação em batelada com reciclo celular ocasionou queda substancial na viabilidade da levedura do processo e dos contaminantes *D. bruxellensis* e *L. fermentum*, com conseqüente decréscimo na produção de etanol e eficiência fermentativa, não se mostrando

adequado para o tratamento das células entre os ciclos fermentativos nas condições em que é realizado esse tratamento na indústria (pH 2,0).

Embora seja eficiente no contexto da fermentação para produção de vinhos, o metabissulfito de potássio não se mostrou adequado para a fermentação alcoólica para produção de etanol combustível, devido às características peculiares do substrato utilizado e das condições em que é realizada a fermentação.