Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Efeito do substrato e das condições de tratamento do fermento sobre a fermentação etanólica contaminada com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* selvagens e *Lactobacillus fermentum*

Vanda Renata Reis

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2016

Vanda Renata Reis
Engenheira Agrônoma

Efeito do substrato e das condições de tratamento do fermento sobre a fermentação etanólica contaminada com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* selvagens e *Lactobacillus fermentum*

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Reis, Vanda Renata
Efeito do substrato e das condições de tratamento do fermento sobre a fermentação etanólica contaminada com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* selvagens e *Lactobacillus fermentum* / Vanda Renata Reis. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.
141 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Leveduras rugosas 2. Tratamento ácido e fermentação etanólica I. Título

CDD 660.62
R375e

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar forças para alcançar meus objetivos e sonhos e me amparar nos momentos difíceis.

Ao meu querido marido Rafael por me amar, me apoiar e por alegrar a minha vida.

Agradeço a pequena Elis, que mesmo estando no meu ventre, já me tráz tantas alegrias.

Aos meus pais, Vanda e Valdemir, agradeço pela dedicação, pelo companheirismo, pela caminhada, pela luta, pela lida.

Aos meus irmãos Junior, Vinícius e Vanessa, que sempre me incentivaram desde o início da minha caminhada em busca dos meus ideais.

À profª. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini, pela oportunidade, confiança, orientação e, principalmente, pelo grande aprendizado que me proporcionou nesses dez anos de convívio no laboratório.

À minha grande amiga e comadre Ana Paula G. Bassi, por estar presente em todos os momentos da minha vida, me incentivando, me alegrando, a caminhada não seria a mesma sem vocêf!

Às professoras Dra. Silvana Perissato Meneghin e Dra. Marcia Maria Rosa e a Técnica do Lamam Lucia T. Picollo Silva pela amizade, convivência, carinho e alegria.

Às Lamanzetes Isis, Ana Livia, Amanda, Bianca, Letícia e Carol pela ajuda na elaboração deste trabalho e por fazerem do Lamam um ótimo local para se trabalhar.

Á minha amiga Afra Vital por me incentivar e me ajudar na reta final desse trabalho.

Aos professores do Departamento DTAISER, em especial o Prof. Vico, Prof. Clovis e Prof. Jorge, pela amizade, incentivo a carreira acadêmica e oportunidades.

Aos professores, funcionários e colegas da Pós-graduação do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, em especial ao Prof. André Ricardo Alcarde por nos ajudar em todos os momentos que precisamos.

Ao Centro de Ciências Agrárias–CCA/UFSCar, pela oportunidade de execução da parte experimental deste trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo no inicio do doutorado e à FAPESP pelo auxilio a pesquisa (2011/17928-0) e a bolsa de estudo (2012/18082-0).

SUMÁRIO

RESUMO 9
ABSTRACT 11
1 INTRODUÇÃO 13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 17
2.1 Etanol: importância e características do processo fermentativo 17
2.2 Bioquímica da fermentação alcoólica 20
2.3 Linhagens selecionadas para a fermentação 23
2.4 Micro-organismos contaminantes 24
Referências 30
3 EFEITO DO SUBSTRATO SOBRE FERMENTAÇÕES CONTAMINADAS COM LEVEDURAS SELVAGENS *Saccharomyces cerevisiae* E BACTÉRIA *Lactobacillus fermentum* 39
Resumo 39
Abstract 39
3.1 Introdução 40
3.2 Revisão Bibliográfica 41
3.3 Material e Métodos 42
3.3.1 Micro-organismos utilizados 42
3.3.2 Preparo do inóculo 42
3.3.3 Teste de fermentação com ciclo único 44
3.3.4 Análises 44
3.3.5 Cálculo de eficiência fermentativa 46
3.3.6 Análise estatística 46
3.4 Resultados e Discussão 46
3.5 Conclusões 62
Referências 62
4 EFEITO DO TRATAMENTO CELULAR SIMPLES E COMBINADO BASEADO EM BAIXO pH E ETANOL PARA O CONTROLE DO CRESCIMENTO DE LEVEDURAS SELVAGENS *Saccharomyces cerevisiae* E DA BACTÉRIA *Lactobacillus fermentum* . 65
Resumo 65
Abstract 65
4.1 Introdução 66

4.2 Revisão Bibliográfica 67
4.3 Material e Métodos 70
4.3.1 Micro-organismos 70
4.3.2 Preparo do inóculo.....70
4.3.3 Tratamento celular baseado em baixo pH 70
4.3.4 Tratamento celular combinado (baixo pH + etanol) 71
4.3.5 Tratamento celular com metabissulfito de potássio 71
4.3.6 Análise estatística.....72
4.4 Resultados e Discussão 72
4.5 Conclusões.....89
Referências.....89
5 EFEITO DO TRATAMENTO COMBINADO BAIXO pH + ETANOL PARA O CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO POR LEVEDURAS SELVAGENS *Saccharomyces cerevisiae E Lactobacillus fermentum* EM FERMENTAÇÃO COM RECICLO CELULAR EM DIFERENTES SUBSTRATOS 83
Resumo.....93
Abstract.....93
5.1 Introdução.....94
5.2 Revisão Bibliográfica 95
5.3 Material e Métodos 98
5.3.1 Micro-organismos utilizados 98
5.3.2 Preparo do inóculo.....98
5.3.3 Teste fermentativo com reciclo e tratamento das células 99
5.3.4 Análises 100
5.3.5 Cálculo de eficiência fermentativa 102
5.3.6 Análise estatística.....102
5.4 Resultados e Discussão 102
5.5 Conclusões.....117
REFERÊNCIAS 119
6 ANÁLISE DO CRESCIMENTO E DA ATIVIDADE INVERTÁSICA DE LINHAGENS *DE Saccharomyces cerevisiae* EM CALDO DE CANA E MELAÇO 123
Resumo 123
Abstract.....123
6.1 Introdução.....124

6.2 Revisão Bibliográfica 124
6.3 Material e Métodos 127
6.3.1 Linhagens 127
6.3.2 Preparo do inóculo 127
6.3.3 Curvas de crescimento 128
6.3.4. Atividade da invertase extracelular 128
6.3.5 Análise estatística 129
6.4 Resultados e Discussão 129
6.5 Conclusões 133
Referências 133
7 CONCLUSÕES GERAIS 137
ANEXO 139

RESUMO

Efeito do substrato e das condições de tratamento do fermento sobre a fermentação etanólica contaminada com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* selvagens e *Lactobacillus fermentum*

Pouco se sabe sobre o efeito do substrato e a interação entre as leveduras selvagens e bactérias do gênero *Lactobacillus* na fermentação alcoólica, pois os estudos tem se concentrado na avaliação dos efeitos da contaminação por um ou outro contaminante separadamente. Diante disso, este trabalho teve como objetivos estudar o efeito do substrato e das condições de tratamento do fermento sobre as fermentações contaminadas com ambos os micro-organismos, leveduras *S. cerevisiae* selvagens (três linhagens apresentando colônias rugosas e células dispostas em pseudohifas) e *Lactobacillus fermentum,* tendo a linhagem industrial de *S. cerevisiae* PE-2 como levedura do processo. Foram realizadas fermentações em batelada em mosto de caldo e de melaço, sem reciclo e com reciclo celular, utilizando tanto a cultura pura da linhagem PE-2 quanto as culturas mistas com as linhagens rugosas e ou *L. fermentum.* Foram avaliadas modificações no tratamento ácido do fermento, visando o controle do crescimento dos contaminantes sem afetar a levedura do processo. Em seguida, foram conduzidas fermentações contaminadas e não contaminadas submetidas ao tratamento ácido combinado com adição de etanol, tanto em caldo quanto em melaço, utilizando-se PE-2, uma das linhagens rugosas e *L. fermentum.* A atividade da invertase extracelular foi também avaliada em ambos os substratos para os micro-organismos estudados, em condições de crescimento. Concluiu-se que o tipo de substrato de fermentação, caldo de cana ou melaço, influenciou o desempenho da linhagem industrial PE-2 assim como afetou o desenvolvimento das contaminações com as leveduras rugosas *S. cerevisiae* na presença ou ausência da bactéria *L. fermentum*, em fermentações sem reciclo celular. O efeito da contaminação foi mais evidente quando se utilizou caldo de cana do que melaço como substrato, no caso da contaminação com leveduras rugosas, e o inverso no caso da contaminação com *L. fermentum.* O efeito da contaminação sobre a eficiência fermentativa foi maior na presença da levedura rugosa do que com a bactéria, e a contaminação dupla (tanto com a levedura rugosa quanto com a bactéria) não teve efeito maior sobre a eficiência fermentativa do que a contaminação simples, por um ou por outro micro-organismo isoladamente, especialmente na fermentação em batelada com reciclo celular, independentemente do substrato. Nas fermentações com reciclo de células, o efeito do substrato foi menos evidente. O controle do crescimento das linhagens rugosas pode ser realizado modificando o tratamento ácido normalmente realizado na indústria, seja pela adição de etanol à solução ácida ou pelo abaixamento do pH, dependendo da linhagem rugosa. O tratamento combinado baixo pH (2,0) + 13% etanol afetou a fisiologia da linhagem industrial, trazendo prejuízos à fermentação com reciclo celular, com pequeno controle sobre o crescimento da levedura rugosa e causando morte celular à *L. fermentum*. A diferença na atividade invertásica entre as linhagens rugosas e industrial de *S. cerevisiae* pode ser a responsável pela fermentação lenta apresentada pelas linhagens rugosas quando presentes na fermentação, sendo não significativa a influência do substrato sobre a atividade dessa enzima.

Palavras-chave: Leveduras rugosas; Tratamento ácido; Fermentação etanólica

ABSTRACT

Effect of the substrate and the cell treatment conditions on the ethanolic fermentation contaminated with *Saccharomyces cerevisiae* wild yeasts and *Lactobacillus fermentum*

A little is known about the effect of the substrate and the interaction among wild yeast strains and bacteria *Lactobacillus* in the alcoholic fermentation, because the studies have been concentrated in the evaluation of the contamination effects by one or another contaminant, separately. This work aimed to evaluate the effect of the substrate and the cell treatment conditions over the batch fermentations contaminated with both microorganisms, yeast wild strains of *S. cerevisiae* (three strains displaying rough colonies and pseudohyphal cell growth) and *Lactobacillus fermentum*, being the *S. cerevisiae* strain PE-2 as the starter yeast. Fermentations using sugarcane juice and molasses, without and with cell recycle, utilizing both the pure culture of PE-2 as the mixed cultures with rough yeast strains and or *L. fermentum* were carried out. Modifications in the acid cell treatment by the addition of ethanol to the acid solution and the lowering of pH of the acid solution or a treatment with potassium metabisulphite were evaluated, aiming the growth control of the contaminants without affecting the starter yeast. An acid treatment with the addition of 13% ethanol was applied in fermentation with cell recycle, both in sugarcane juice and molasses, utilizing PE-2, one of the rough yeast strains and *L. fermentum*. The extracellular invertase activity was also evaluated in both substrates for the microorganisms studied, in growing conditions. The type of substrate, sugarcane juice or molasses, influenced the performance of the PE-2 strain as well as affected the development of the contaminations with rough *S. cerevisiae* yeast strains with or without *L. fermentum,* in fermentations without cell recycle. The effect of the contamination was more remarkable when sugarcane juice was utilized, in fermentations contaminated with rough yeast strains, but the inverse was observed when *L. fermentum* was the contaminant. The contamination effect was more harmful with the rough yeast strain than with the bacteria, and the double contamination (with both rough yeast strain and bacteria) did not have a higher effect over the fermentative efficiency than the single contamination, by one or another microorganism in isolation, especially in the batch fermentation with cell recycle, regardless the substrate. In cell-recycled fermentations the effect of the substrate was less evident. The growth control of the rough yeast strains may be done by modifying the acid cell treatment carried out in the industry, both by the addition of ethanol to the acid solution or by the pH lowering, depending on the rough yeast strain. , The combined treatment (pH 2.0 + 13% ethanol) affected PE-2 physiology, bringing about loss in the cell-recycled fermentation, with low growth control of the rough yeast strain but causing cell death of *L. fermentum*. The difference in the invertase activity between the rough yeast strains and the starter yeast PE-2 may be responsible for the low fermentation rate displayed by the rough yeast strains, but a non significant effect of the substrate on the enzyme activity was observed.

Keywords: Rough yeasts; Acid treatment; Ethanol fermentation

1 INTRODUÇÃO

O etanol é uma importante fonte de energia renovável que compõe a matriz energética brasileira. A presença de unidades de produção em praticamente todos os estados traz como benefícios muitos empregos diretos e indiretos, constituindo parcela significativa da economia do país.

Dentre todas as etapas que compõem o processo de produção do etanol, a etapa de fermentação é a que possui menor eficiência, em torno de 85%. Isso ocorre em grande parte pelo fato do agente do processo ser uma levedura, a qual realiza o processo gerando ATP, gás carbônico, além do etanol. Vários fatores podem afetar a eficiência do processo fermentativo, tais como temperatura, pH, concentração de açúcar e etanol, tipo de substrato, uso de leveduras selecionadas e presença de outros micro-organismos.

O emprego de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* selecionadas (também chamadas de personalizadas) tem sido incentivado nos últimos anos. São leveduras isoladas da fermentação e reintroduzidas na própria destilaria, estando adaptadas ao processo da unidade, apresentando persistência e dominância. As linhagens mais utilizadas atualmente no Brasil são PE-2, CAT-1 e FT858L, responsáveis pela produção da maior parte do etanol brasileiro.

O mosto utilizado na fermentação pode ser composto de caldo e/ou melaço. O caldo de cana-de-açúcar se constitui em ótimo substrato para o crescimento de muitos micro-organismos, em função dos teores de nutrientes orgânicos e inorgânicos, apresentando alta atividade de água e pH favoráveis. O melaço apresenta uma concentração de nutrientes bem mais elevada do que os mostos de caldo de cana, porém não apresenta o nitrogênio em forma adequada para as leveduras, podendo assim comprometer a eficiência do processo.

Como o substrato não é esterilizado, a indústria sucro-alcooleira necessita combater os micro-organismos contaminantes, representados pelas bactérias e leveduras que se instalam no processo e causam queda no rendimento e produtividade. Essa diversidade de linhagens de leveduras nos processos industriais com ampla gama de variações nos parâmetros cinéticos (rendimento, produtividade e velocidade específica de crescimento), nem sempre causa problemas de queda de rendimento fermentativo. No entanto, verifica-se que não é um único fator o

responsável pela instalação e permanência destas linhagens no processo, mas uma série de variáveis, e que a dinâmica é única para cada um dos processos.

Entende-se por leveduras selvagens as leveduras que invadem o processo fermentativo, advindas muitas vezes do solo, da própria cana e da água de lavagem de cana. Os principais gêneros são *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces, Candida e Dekkera*. As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* que apresentam pseudohifas (brotos que não se separam da célula mãe), também chamadas de leveduras rugosas, são muito frequentes nas dornas de fermentação, podendo causar vários problemas, inclusive perda no rendimento fermentativo devido a sua lenta capacidade de conversão de açúcar em etanol.

O pH relativamente baixo dos caldos das moendas favorece o crescimento de bactérias láticas, como as do gênero *Lactobacillus.* A espécie *L. fermentum* é um dos principais contaminantes do processo de produção de etanol, sendo uma bactéria gram-positiva, anaeróbia facultativa, heterofermentativa, com temperatura ótima de crescimento entre 30° C e 40° C. A redução no rendimento fermentativo devido à presença de bactérias láticas ocorre devido ao fato de que quando uma molécula de glicose é convertida em duas moléculas de ácido lático, duas moléculas de etanol deixam de ser produzidas pela levedura do processo.

Atualmente são utilizados antibióticos e outros produtos e tratamento ácido do fermento para controlar os contaminantes bacterianos. No entanto, quando se trata de leveduras selvagens, o controle, na maioria das vezes, é muito difícil de ser realizado.

Nesse contexto, e no sentido de contribuir para o entendimento dos fatores que podem afetar o rendimento fermentativo e a relação desses com o estabelecimento das contaminações, este trabalho teve como objetivo geral avaliar o efeito das contaminações conjuntas de leveduras *S. cerevisiae* que apresentam colônias rugosas e células em pseudohifas, e da bactéria *L. fermentum* sobre o rendimento da fermentação alcoólica conduzida pela levedura industrial PE-2, procurando condições que minimizem o efeito das contaminações.

No Capítulo 1, foi estudado o efeito do substrato sobre as fermentações contaminadas em mosto de caldo de cana-de-açúcar e melaço, procurando verificar se o substrato pode interferir no estabelecimento das contaminações e nas interações dos contaminantes com a levedura do processo.

No Capítulo 2, foram estudadas modificações na fase de tratamento do fermento

que é realizada industrialmente entre os reciclos celulares, visando o controle do crescimento dos contaminantes – linhagens rugosas de *S. cerevisiae* e *L. fermentum* – sem afetar a levedura do processo.

No Capítulo 3, foi avaliado o efeito de um tratamento celular baseado em baixo pH e etanol para o controle da contaminação por *S. cerevisiae e L. fermentum*, em fermentação com reciclo celular, utilizando-se caldo e melaço como substratos de fermentação.

A atividade invertásica das linhagens de *S. cerevisiae* estudadas foi avaliada no Capítulo 4, procurando verificar diferenças na atividade dessa enzima que possam justificar os resultados obtidos nos diferentes substratos de fermentação, caldo e melaço.

Os resultados apresentados e discutidos nos capítulos permitem avaliar o efeito dos fatores “substrato de fermentação” e “tratamento de fermento” no estabelecimento das contaminações por linhagens rugosas de *S. cerevisiae* e em que extensão a contaminação concomitante por *L. fermentum* pode potencializar o prejuízo causado no rendimento fermentativo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Etanol: importância e características do processo fermentativo

O Brasil desenvolveu como nenhum outro país do mundo as tecnologias para a utilização das fontes renováveis de bioenergia em escala capaz de atender a um mercado de massas (ANA, 2009). Na última década, a participação do petróleo e derivados na matriz diminuiu cerca de oito pontos percentuais, passando de 45,5% em 2000 para 37,9% em 2009. Ao fim desse período, cerca de 18% da energia consumida no país já provinha de derivados da cana-de-açúcar, ultrapassando a energia hidráulica em importância na matriz e assumindo o segundo lugar (SOUZA; MACEDO, 2010).

Desde sua efetiva incorporação à matriz energética brasileira em 1975 até a atualidade, o etanol conseguiu importantes resultados: 1) a produção e a demanda ultrapassaram largamente as expectativas colocadas no início do Programa Nacional do Álcool (Proálcool); 2) a implementação de tecnologias e avanços gerenciais tornaram este combustível renovável competitivo com os combustíveis fósseis; e 3) as características de sua produção o tornam a melhor opção, no momento, para a redução de emissões de gases de efeito estufa no setor de transportes, em todo o mundo (MACEDO; NOGUEIRA, 2004).

A cana-de-açúcar é cultivada em mais de 9 milhões de hectares no Brasil e em todas as regiões geográficas do país. O Brasil é o maior produtor e exportador de açúcar e o segundo maior produtor de etanol (ÚNICA, 2016). Os Estados Unidos (o maior produtor de etanol, a partir de milho), juntamente com o Brasil, são responsáveis por 70% da produção mundial de etanol (RFA, 2015). O açúcar e indústria do etanol compõem 2,3% do Produto Interno Bruto (PIB), gerando 4,5 milhões de empregos no país. Além disso, o etanol combustível representa quase 50% do volume total de combustível consumido por carros (BASSO et al., 2011).

O processo de produção de etanol no Brasil, cujo *design* foi baseado em um processo utilizado na França, o Melle-Boinot, foi muito melhorado ao longo dos últimos 30 anos. Quando o governo brasileiro criou o Proálcool nos anos 70, o processo atingia rendimento de 80%, chegando a um marco atual de aproximadamente 92% (CAVALHEIRO, 2013)

De uma forma simplificada, podemos dizer que a produção de etanol está dividida em três etapas: preparo do mosto (substância açucarada que servirá de substrato para a levedura), fermentação (ocorre a transformação do açúcar em etanol, utilizando as leveduras) e destilação (recuperação do produto).

A primeira etapa pode ser iniciada com a obtenção do caldo de cana através da moenda ou difusor, ou ainda, com utilização do mel final ou melaço (subproduto da produção do açúcar). As composições químicas do melaço e do caldo de cana dependem muito da cana utilizada, portanto são também extremamente variáveis (Tabela 1).

A concentração de açúcar no mosto não deve provocar problemas de inibição do metabolismo da levedura, ou seja, repressão do catabolismo dos micro-organismos agentes por substrato e/ou pelo produto. Se o mosto for de caldo, devido à embebição no processo de extração nas moendas, o caldo resultante é utilizado diretamente como mosto, ocorrendo em muitos casos, apenas aquecimento e decantação. Se o mosto for misto, dependendo das proporções caldo:melaço, haverá necessidade de adição de água para a correção do °Brix (quantidade de sólidos solúveis). No caso de mosto de melaço, que é somente mistura de melaço e água, o teor de açúcar é ajustado para 18 a 20 °Brix (CHIEPPE JÚNIOR, 2012).

Após o acerto da concentração, o mosto passa por um tratamento térmico, que tem por objetivo diminuir o número de micro-organismos contaminantes, os quais são responsáveis por quedas de rendimento nas unidades produtoras de etanol. Em seguida, o mosto é resfriado e enviado à fermentação (ANA, 2009).

Tabela 1 - Composição química média de caldo de cana e de melaço

Composição	Caldo de cana	Melaço
Água	81,00 %	17,33 %
Sólidos totais	19,00 %	82,00 %
Sólidos solúveis	19,00 %	88,00 %
Sacarose	16,00 %	40,00 %
Glicose	0,30 %	12,00 %
Frutose	0,10 %	9,00 %
Açúcares totais	18,00 %	65,00 %
Matéria nitrogenada	0,03 %	8,00 %
Acidez sulfúrica	0,50 %	3,00 %
pH	5,5	6,5
Cinzas	0,40 %	8,50 %
P_2O_5	0,02 %	0,15 %
K_2O	0,15 %	3,80 %
CaO	0,02 %	1,05 %
MgO	0,02 %	0,50 %
Vitaminas	Variável	Variável

Fonte: Stupiello et al. (1974)

A fermentação alcoólica é o fenômeno por meio do qual os açúcares são transformados em álcool e gás carbônico, principalmente por ação das leveduras da espécie *S. cerevisiae,* em condições anaeróbicas (LIMA; BASSO; AMRIM., 2001). A concentração celular utilizada na fermentação é em torno de 10 a 15% p/v e grande parte das usinas compra esse micro-organismo como fermento seco selecionado. Com essa concentração de células elevada e com temperaturas em torno de 30-35 °C, as destilarias podem atingir tempos de fermentações de 6 a 10 horas com concentrações finais de etanol de até 11% v/v (ANA, 2009)

Após cada ciclo de fermentação, as células de leveduras são separadas do vinho (nome dado ao mosto que foi fermentado) por centrifugação e tratadas com ácido sulfúrico até atingir pH 2,0-2,5, com a finalidade de reduzir a contaminação bacteriana. De acordo com Souza e Mutton (2004), o tratamento ácido é prática comum para o controle da infecção contida no fermento. Observou-se redução de

44,3% da contaminação microbiana em função do tempo e do vigor desse tratamento. Porém, quando a levedura está floculada por indução bacteriana, esse tratamento apenas induz a separação do fermento e das bactérias, mas não elimina totalmente as células bacterianas. Em contrapartida, esse procedimento pode interferir negativamente no metabolismo e fisiologia da levedura (DORTA, 2006).

A suspensão de fermento diluído e acidificado é conhecida na prática como pé-de-cuba, permanecendo em agitação por uma a três horas, esperando o retorno para a dorna de fermentação (FURTADO; SCANDIFFIO, 2006). Em seguida, esse creme de levedura retorna às dornas de fermentação para iniciar um novo processo. Esta seqüência (ciclos de fermentação) é repetida durante toda a safra de cana-de-açúcar, pois minimiza o consumo de carbono destinado ao crescimento da levedura e proporciona uma maior produtividade de etanol (BRETHAUER; WYMAN, 2010).

O vinho é encaminhado à destilaria, iniciando a etapa de destilação. Esta fase consiste na separação das substâncias componentes do vinho, basicamente água, etanol, álcoois superiores, ácido acético e aldeídos, por meio dos seus diferentes pontos de ebulição. Ao final desse processo é obtido o etanol hidratado (95,5%) e em seguida, com mais uma operação, o álcool anidro (99,7%) (NASCIMENTO, 2012).

2.2 Bioquímica da fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica é um processo anaeróbio que ocorre com a transformação de açúcares em etanol e CO_2, catalisado por enzimas. Este processo é realizado principalmente por leveduras em nível citoplasmático com o objetivo de produzir energia, a qual será empregada na realização de suas atividades fisiológicas, e ainda para seu crescimento e reprodução, sendo o etanol resultado desse processo (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001). Para obter alta eficiência no processo de produção de etanol, há necessidade de propiciar às leveduras condições ideais que resultem em altos rendimentos (SALVATO, 2010).

A sacarose, principal substrato utilizado na produção etanólica no Brasil, é hidrolisada primeiramente em glicose e frutose pela enzima invertase produzida pela própria levedura (ZECH; GÖRISH, 1995). Através do processo de difusão facilitada da membrana do micro-organismo, tais açúcares chegam ao interior da célula e

iniciam o processo de catálise pela via glicolítica (CARTWRIGHT et al., 1989). Nesta etapa, doze reações ocorrem em seqüência ordenada e cada reação é catalisada por uma enzima específica. Fatores como pH, temperatura, composição dos substratos e substâncias do próprio metabolismo, afetam o funcionamento dessas enzimas, e consequentemente o desempenho do processo fermentativo conduzido pelas leveduras. As rotas produtoras de energia geram ATP e coenzimas necessárias para as diversas reações biossintéticas, e intermediários químicos utilizados como pontos de partida para as diversas reações de biossíntese. Como produto final significativo de todas as rotas tem-se o ácido pirúvico, que em anaerobiose é precursor dos ácidos, álcoois e outros produtos (WARD, 1991).

Pode-se representar a fermentação alcoólica pela equação de Gay-Lussac, sendo que 1 mol de glicose (180 g) produz 2 moles de etanol (92 g), 2 moles de dióxido de carbono - CO_2 (88 g) e 57 kcal de energia (LEHNINGER et al., 1995; KOLB, 2002), da seguinte forma:

$$C_6H_{12}O_6 + 2Pi + 2ADP \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 + 2ATP + 2H_2O + 57\ Kcal$$

No que diz respeito ao rendimento teórico ($Y_{P/S}$) e considerando-se o fator estequiométrico (0,511 g de álcool produzido/ g de açúcar consumido), obtém-se valor de rendimento industrial na ordem de 90%, uma vez que se estima que parte do açúcar metabolizado pela levedura seja desviado para gerar produtos como glicerol, álcoois superiores, trealose e outros, além do necessário para manutenção celular (WARD, 1991; LIMA; BASSO; AMORIM, 2001; SCHMIDELL; BONOMI, 2001).

A trealose é um dissacarídeo constituído por duas unidades de glicose (LELOIR; CABIB, 1953 apud PANEK, 1991), conhecido como carboidrato de reserva, protegendo as leveduras em situação de estresse como temperatura elevada, toxicidade do etanol, desidratação celular e aumento da pressão osmótica. A trealose é acumulada em presença de oxigênio e em baixas concentrações de açúcares (THEVELEIN, 1984; HOTTINGER et al.,1987; PANEK et al., 1990; ALCARDE; BASSO, 1997). Segundo Hottinger et al. (1987), a levedura adquire termotolerância em temperatura de 27 a 40 °C, devido ao aumento no acúmulo de trealose em seu metabolismo.

O glicerol é um poliol produzido pela levedura *S. cerevisiae* durante a fermentação da glicose em etanol a fim de manter o balanço redox (NEVOIGT; STAHL, 1997). A formação de etanol assegura a reoxidação do NADH formado na oxidação do gliceraldeído 3-fosfato, enquanto a produção de glicerol é originada do excesso de NADH gerado na assimilação de açúcares em biomassa (van DIJKEN; SCHEFFERS, 1986).

O glicerol inibe ou limita a fermentação alcoólica. Quando há um acúmulo de glicerol no caldo fermentado, ocorre um decréscimo lento e linear da produtividade de etanol (BASSO et al., 2008). No entanto, o glicerol tem um papel como osmorregulador, sendo produzido em situações onde há estresse osmótico, como meios com baixa atividade de água (MAIORELLA; BLANCH; WILKE, 1984; TOKUOKA, 1993). Uma das principais características da linhagem selecionada PE-2 é a produção balanceada de glicerol, a qual é baixa o suficiente para permitir alto rendimento alcoólico, mas alta o bastante para possibilitar tolerância ao estresse (CARVALHO-NETTO et al., 2015).

A produção de glicerol sofre influência do pH, temperatura e concentração elevada de sacarose. Quanto maiores os valores destes parâmetros, maior é a produção de glicerol (GUTIERREZ, 1991), a qual depende também das linhagens de leveduras e contaminantes presentes no processo. Contaminações bacterianas aumentam a formação de glicerol nas fermentações, provavelmente devido à resposta ao estresse causado pela presença de metabólitos bacterianos, tais como ácido lático e ácido acético (THOMAS; HYNES; INGLEDEW, 2001; BASSO et al., 2014).

O etanol é o maior agente estressante ocorrido durante a fermentação, podendo reduzir a multiplicação e a viabilidade da levedura (CANETTA; ADYA, 2005). Vários e complexos mecanismos de inibição têm sido propostos, incluindo a desnaturação e inibição de enzimas, e danos na membrana plasmática alterando a sua permeabilidade (D’AMORE; STEWART, 1987). Esses autores ainda ressaltam que os fosfolipídios presentes na membrana plasmática desempenham um importante papel no mecanismo de tolerância ao etanol. Acréscimo de ácidos graxos insaturados, além de fatores como o acúmulo de etanol intracelular, temperatura e pressão osmótica influem sobre a tolerância ao etanol.

2.3 Linhagens selecionadas para a fermentação

A espécie mais importante de levedura alcoólica é a *S. cerevisiae*, pois se trata de micro-organismo “robusto”, capaz de suportar condições drásticas. Linhagens dessa espécie apresentam alta eficiência fermentativa, crescimento rápido, eficiente metabolização de açúcares, tolerância a altas concentrações de etanol e baixos níveis de oxigênio, osmotolerância e tolerância a grandes variações de temperatura (ANDRIETTA et al., 2007).

Além disto, conseguem sobreviver e se adequar a ambientes inóspitos e estressantes através da sua capacidade de formar filamentos, de apresentar crescimento invasivo sob a forma de pseudohifas, de flocular, de formar espuma e de desenvolver biofilmes. Este micro-organismo não só pode explorar novos ambientes à procura de nutrientes, como também consegue se fixar e persistir naqueles adequados ao seu desenvolvimento (CECCATO-ANTONINI, 2008).

As células de *S. cerevisiae*, quando submetidas a condições de estresse, desenvolvem uma rápida resposta molecular para reparar danos e proteger as estruturas celulares dos efeitos causados pelo estresse (RUIS; SCHÜLLER, 1995; SWAN; WATSON, 1998; ESTRUCH, 2000). Essa resposta é caracterizada pela síntese de proteínas específicas, aumento do nível celular de trealose e glicerol, alteração da composição lipídica da membrana plasmática e da atividade da ATPase (BIRCH; WALKER, 1999).

Entende-se por leveduras selecionadas, as linhagens que foram isoladas a partir de processos de fermentação industrial. Em pesquisas realizadas em um programa de seleção de leveduras durante 12 anos, visando selecionar estirpes de *S. cerevisiae* adequadas para a fermentação de substratos de cana de açúcar (caldo de cana e melaço), com reciclo de células, verificou-se que o uso de cepas selecionadas aumentou a produção de etanol e reduziu os custos de produção, devido ao seu maior desempenho de fermentação (rendimento elevado de etanol, redução na formação de glicerol e de espuma, manutenção de alta viabilidade durante a reciclagem e alta capacidade de implantação em fermentadores industriais). Discute-se também que a grande biodiversidade de leveduras encontradas em ambientes de destilaria poderia ser uma importante fonte de pressão. Durante a reciclagem das células de levedura, ocorre uma pressão seletiva

sobre as células (evolução adaptativa), sobrevivendo estirpes com maior tolerância para as condições de estresse de fermentação industrial (BASSO et al., 2008).

Em 2006 havia 329 fábricas de bioetanol no Brasil, e 190 destilarias optaram por iniciar os seus processos com leveduras selecionadas. Como exemplo, pode-se citar SA-1 (Copersucar), BG-1 (Copersucar), CAT-1 (Fermentec/ESALQ) e PE-2 (Fermentec/ESALQ). Estas leveduras foram isoladas das usinas Santa Adélia, Barra Grande, Usina VO (Grupo Virgolino de Oliveira) Catanduva e Usina da Pedra, respectivamente (AMORIM, 2005).

Em 2010 e 2015, mais duas linhagens foram lançadas no mercado, a FT858L e a FERMEL, esta última apresentando como característica principal bom desempenho para fermentações com elevada concentrações de melaço, desenvolvida pela empresa Fermentec em parceria com a FAPESP (JORNAL CANA, 2014).

Embora a utilização de uma levedura qualquer selecionada seja uma alternativa viável para o início da safra, o uso de leveduras provenientes do próprio processo é a expectativa para o futuro das usinas brasileiras. A estabilidade microbiológica em relação às leveduras do processo de produção de álcool está relacionada à utilização de inóculo de uma levedura isolada do próprio processo (STROPPA; ANDRIETTA; ANDRIETTA, 2003).

2.4 Micro-organismos contaminantes

Uma das principais preocupações na indústria sucro-alcooleira é combater os micro-organismos contaminantes do processo de produção de álcool, representados pelas bactérias e leveduras que se instalam no processo.

De acordo com Alquati (1990), a planta da cana-de-açúcar, como todo organismo vivo, possui uma microbiota característica distribuída tanto no sistema vascular como em sua camada periférica. Esta microbiota é levada juntamente com o caldo bruto no momento de sua obtenção através da moagem dos colmos. O número total de bactérias presentes no caldo bruto de cana-de-açúcar pode ser aumentado sensivelmente tanto por períodos prolongados entre o corte e a moagem da planta como pela falta de assepsia na moenda, filtros, bombas e tubulações que entram em contato direto com o referido material.

Bovi e Marques (1983) também destacam que alguns micro-organismos podem adentrar a indústria pela água utilizada em alguns processos, como na lavagem da cana, no preparo do pé-de-cuba e na limpeza dos equipamentos.

A biodiversidade bacteriana nas dornas de fermentação é grande, predominando as bactérias láticas (GALLO, 1990; BASSO et al., 2008; LUCENA et al., 2010; CARVALHO-NETTO et al., 2015) e os efeitos causados são: consumo de açúcares, excreção de compostos tóxicos às leveduras, acúmulo de ácidos no decorrer dos ciclos fermentativos, aumento do tempo de fermentação e diminuição do rendimento fermentativo (LUDWIG; OLIVA-NETO; ANGELIS, 2001).

As bactérias podem também induzir a floculação das leveduras do processo. A formação de flocos compromete a conversão de açúcar em etanol e CO_2 pela redução da superfície de contato direto entre as células e o meio. Além disso, nas unidades que realizam o reaproveitamento de células, as operações de recuperação de fermento ficam prejudicadas pela presença dessas estruturas, comprometendo seriamente o desempenho industrial (LUDWIG; OLIVA-NETO; ANGELIS, 2001).

A predominância de bactérias produtoras de ácido lático no processo fermentativo se deve provavelmente à sua maior tolerância ao pH baixo e aos elevados teores de etanol, quando em comparação com outros micro-organismos (KANDLER, 1983; KANDLER; WEISS, 1986; SKINNER; LEATHERS, 2004). Estudos tem apontado que *Lactobacillus* é o gênero mais abundante (GALLO, 1990; LUCENA et al., 2010), sendo tradicionalmente classificado em dois sub-grupos metabólicos de acordo com a via utilizada para metabolizar hexoses: homo- e heterofermentativo (KANDLER, 1983). Os homofermentativos, através da via Embden-Meyerhof, convertem 1 mol de hexoses em 2 moles de ácido lático e não fermentam pentoses ou glucanato. Os heterofermentativos convertem 1 mol de hexoses em 1 mol de CO_2, 1 mol de etanol ou ácido acético e 1 mol de acido lático através da via 6-fosfoglucanato. Pentoses são convertidas a ácido lático e acético (CHERUBIN, 2003).

Basso et al. (2014) estudaram os efeitos de duas espécies de *Lactobacillus,* a *L. plantarum* pertencente ao grupo dos homofermentativos, e a *L. fermentum,* representante do grupo dos heterofermentativos, sobre o desempenho fermentativo da levedura CAT-1 no processo de produção de etanol. Quando foram inoculados números iguais de leveduras e bactérias, a espécie homofermentativa foi mais prejudicial para a levedura de processo do que a heterofermentativa. No entanto,

nas condições das unidades industriais, alta densidade celular e curto tempo de fermentação, a estirpe heterofermentativa foi mais prejudicial que a homofermentativa, provocando menor rendimento na produção de etanol e maior produção de glicerol.

Unidades industriais têm se deparado também com problemas atribuídos à presença de leveduras contaminantes que, altamente competitivas dentro das condições existentes, passam a predominar na população de células presentes (CECCATO-ANTONINI; SILVA, 1998). Quando isso ocorre, o processo industrial se torna mais lento e a destilaria acaba por produzir menor quantidade de etanol por dia, em comparação com os dias em que não há esse tipo de contaminação. Dessa forma, uma fermentação mais lenta impõe uma diminuição da moagem da cana, que, por sua vez, diminui o descarregamento desta no pátio da indústria, causando problemas no cronograma de colheita. Tudo isso provoca custos diretos e perda de receita diária para a indústria (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

Oliveira e Pagnocca (1988) detectaram as leveduras *Hansenula anomala*, *Candida famata*, *Saccharomyces kluyveri* e *S. cerevisiae* como contaminantes em uma unidade industrial a partir de amostras de fermento centrifugado, fermento tratado e mosto em fermentação. Miniac (1989) citou a espécie *Brettanomyces intermedius* como contaminante em várias destilarias na França, com prejuízo ao processo fermentativo, levando inevitavelmente à necessidade de renovação de todo o fermento em processo.

A espécie *Dekkera bruxellensis* tem se apresentado como um dos contaminantes não-*Saccharomyces* mais importantes e expressivos no contexto da fermentação etanólica industrial. No Brasil, o primeiro relato que se tem conhecimento da contaminação do processo de fermentação alcoólica por essa levedura é de um trabalho realizado por Silva (1994). O autor documentou a ocorrência de uma severa contaminação por uma levedura selvagem no processo contínuo de produção de etanol industrial, 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.

Guerra (1998) detectou que uma unidade industrial que sofria constantes quedas no rendimento fermentativo e teve seu fermento substituído sete vezes durante uma

única safra, estava contaminada com *D. bruxellensis* e então testou várias maneiras de controle dessa levedura. Concluiu que é possível realizar o controle industrial do crescimento dessa espécie mediante procedimentos onde haja minimização do oxigênio e uso de etanol, tudo dentro dos limites de tolerância da levedura de processo. Linhagens desta espécie apresentaram uma reduzida capacidade fermentativa em relação à levedura do processo *S. cerevisiae*, o que ocasionou tanto queda no rendimento de etanol quanto aumento no tempo de fermentação (PEREIRA et al., 2012; MENEGHIN et al., 2013).

Trabalhos de Basso et al. (1993, 1994, 1995 e 1996) constataram, respectivamente, nas safras de 92/93, 93/94, 94/95 e 95/96, a predominância de leveduras contaminantes do gênero *Saccharomyces* em unidades produtoras de álcool. Observações feitas por Ceccato-Antonini e Parazzi (2000) no monitoramento microbiológico da fermentação etanólica em unidades industriais e safras diversas, indicaram a presença de um biótipo de levedura com células dispostas em cadeias, apresentando colônias opacas, superfície crespa, pertencendo à espécie *S. cerevisiae*. Esse biótipo foi denominado como levedura rugosa e apresentou caracteristicamente alto crescimento, permanecendo na superfície das dornas, formando uma espécie de espuma grossa, pegajosa, causando extravasamento de mosto das dornas e conseqüentemente perda de açúcar e álcool.

Ceccato-Antonini e Parazzi (1996) verificaram uma proporção de 1:1 entre leveduras rugosas e não-rugosas no fermento e no vinho, ocasionando uma queda de 10% no rendimento fermentativo e 18% na produção de álcool, em uma destilaria de Jaú (SP). Para a retomada do rendimento a valores como 89,5%, o fermento teve que ser substituído.

Trabalho realizado durante 3 safras consecutivas sobre as características de 300 leveduras selvagens isoladas de 46 destilarias mostrou que 57% das colônias apresentavam borda lisa e 43% borda rugosa. Todas as leveduras apresentando colônias com borda rugosa mostraram problemas na fermentação como espuma em excesso, floculação e/ou sobra de açúcar no vinho. Entre as leveduras de colônias de borda lisa, 65% apresentaram pelo menos um dos problemas citados (BASSO et al., 2008).

Um estudo comparativo da capacidade fermentativa de leveduras de colônias rugosas e colônias mucosas (nome dado às linhagens que possuem células dispersas e colônias brilhantes) de *S. cerevisiae* mostrou que as rugosas têm

fermentação mais lenta em sistema de batelada com ciclo único. Utilizando reciclo celular, foi obtida uma eficiência fermentativa de 60% com a colônia rugosa (REIS et al., 2013).

Leveduras com essas características – colônias rugosas e células em pseudohifas - são capazes de dominar o processo, substituindo a levedura iniciadora. Apresentam alta taxa de sedimentação celular, causando problemas similares àqueles observados com leveduras floculantes. A agregação celular que origina as pseudohifas não deve ser confundida com floculação. A formação das cadeias de células é derivada da falha do broto jovem em se separar da célula-mãe (SOARES, 2010), permanecendo unida à célula parental depois da mitose. Essas leveduras recebem também o nome de *snowflake yeasts.* Como as cadeias continuam a aumentar por divisão das células, a tensão entre as células aumenta até que excede a força de tensão existente na conexão célula – célula, resultando na liberação de propágulos multicelulares (RATCLIFF et al., 2015).

A Figura 1 traz imagens da colônia e morfologia celular das leveduras rugosas em comparação com as leveduras mucosas.

Mais recentemente, estudos tem se concentrado na origem desse biótipo de *S. cerevisiae*. Ratcliff et al. (2015) verificaram que 1.035 genes foram expressos diferencialmente quando se comparou uma linhagem unicelular de *S. cerevisiae* e uma linhagem de levedura rugosa evoluída por evolução adaptativa. Sete genes *downregulated* dentre dez foram regulados pelo fator de transcrição ACE2, com ambos os alelos idênticos na linhagem diplóide. A perda de heterozigosidade no gene *ACE2* (causado por uma mutação de mudança de fase) foi responsável pelo fenótipo de colônia rugosa nas linhagens estudadas por Rodrigues (2013), utilizando derivativos espontâneos da linhagem JAY270/PE-2. As linhagens apresentaram colônias com superfícies rugosas, bordas irregulares e sedimentação celular semelhante à floculação em meio líquido, características que não são próprias da linhagem de levedura selecionada PE-2.

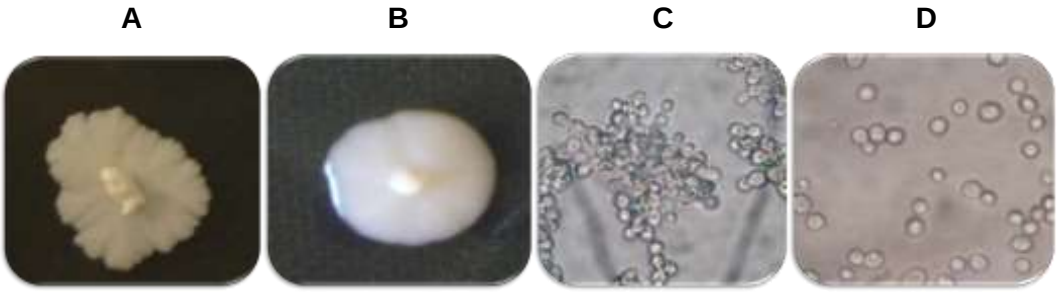


Figura 1 - Morfologia da colônia de linhagem rugosa (A) e mucosa (B) de *S. cerevisiae*. Em C, imagem das células da linhagem rugosa dispostas em cachos (pseudohifas); em D, células dispersas da linhagem de colônia mucosa
Fonte: Reis (2011)

Testes fenotípicos mostraram a resistência aumentada das colônias rugosas de *S. cerevisiae* às condições de alta concentração de açúcar e etanol, em comparação com as colônias mucosas de *S. cerevisiae* (REIS, 2011). Leveduras rugosas tem demonstrado maior tolerância ao calor e dessecação, além de agentes antimicrobianos (MENEGHIN et al., 2008; VOORDECKERS et al., 2012).

O controle das contaminações por leveduras selvagens *S. cerevisiae* não é uma tarefa fácil. Pouco se sabe também sobre a interação entre as leveduras rugosas e *Lactobacillus* no processo da fermentação alcoólica, pois os estudos tem se concentrado na avaliação dos efeitos da contaminação por um ou outro contaminante separadamente.

Para presente trabalho, foram selecionadas três linhagens rugosas, baseando-se nos resultados obtidos por Reis (2011), com 22 linhagens de leveduras pertencentes à espécie *S. cerevisiae,* sendo 11 linhagens com colônias mucosas e células dispersas, e 11 com colônias rugosas e células em cacho. Nesse trabalho, a autora demostrou no teste de caracterização genética através do loci de microssatélites a presença de dois grupos principais relacionados geneticamente, sendo o primeiro grupo constituído principalmente de colônias rugosas (67%), contendo, no entanto, a linhagem PE-2 (linhagem 17), umas das mais importantes linhagens utilizadas industrialmente no Brasil na produção de etanol combustível. O outro grupo (com 3 sub-grupos) compreendeu principalmente colônias mucosas.

Esse resultado foi associado aos resultados de estresse e de floculação e verificou-se que o grupo que incluía a levedura PE-2 e as linhagens rugosas, apresentou alta taxa de sedimentação e tolerância as altas concentrações de açúcar e etanol. O segundo grupo (com 3 sub–grupos) apresentou baixas taxas de

sedimentação e pouca resistência significativa as situações estressantes nas mucosas estudadas (Figura 2).

Sendo assim, para este trabalho foram selecionadas a linhagem 36, situada no primeiro grupo (mesmo grupo que a PE-2), possuindo tolerância a pH 1,5; 14,5% de etanol e taxa de floculação > 50%; a linhagem 52, situada no segundo grupo, apresentando taxa de floculação > 50% e tolerante a 500 g/L de açúcar; a linhagem 7, pertencente também ao segundo grupo, apresentando tolerância a 14,5% etanol e a 500 g/L de açúcar.

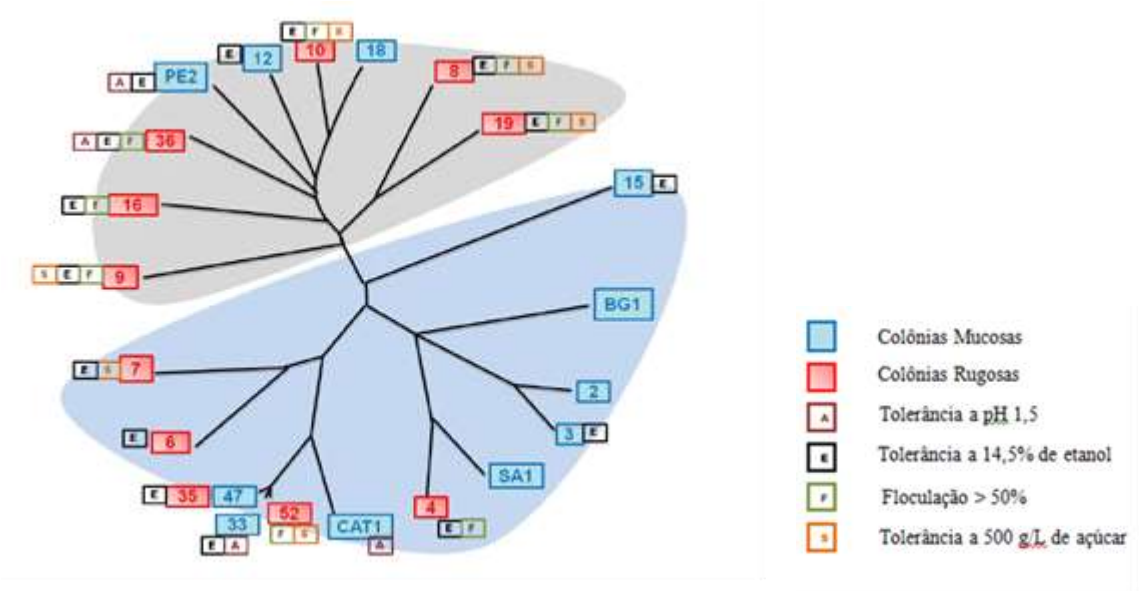


Figura 2 - Arvore fenética construída com os resultados da amplificação dos loci microssatélites, usando o software Population 1.2.31 através do método UPGMA e associada aos resultados de resistência aos estresses (Fonte: REIS, 2011).

Referências

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

ALQUATI, P.H. **Caracterização e controle de micro-organismos contaminantes em microdestilaria de álcool**. 1990. 75p. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Agronomia) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 1990.

AMORIM, H.V. **Fermentação Alcoólica:** ciência e tecnologia. São Paulo: Fermentec, 2005. 448p.

ANA. AGENCIA NACIONAL DE ÁGUA. **Manual de conservação e reuso de água na agroindústria sucroenergética.** Federação das Indústrias do Estado de São Paulo; União da Indústria de Cana-de-açúcar; Centro de Tecnologia Canavieira, Brasília: ANA, 2009. 288p.

ANDRIETTA, M.G.S.A.; ANDRIETTA,S.R.; STECKELBERG,C.; STUPIELLO, E.N.A. Bioethanol – Brazil, 30 years of Proalcool. **International Sugar Journal**, Campinas, v.109, n.1299, p.195-200, 2007. 288p.

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J. **Acompanhamento e seleção de leveduras do processo pela técnica da cariotipagem**. Piracicaba:ESALQ, 1995. p.1-56.(Relatório anual de pesquisas em fermentação alcoólica: 1995).

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J. **Leveduras selecionadas:** permanência no processo industrial monitorada pela técnica da cariotipagem. Piracicaba:ESALQ, 1996. p.1-51. (Relatório anual de pesquisas em fermentação alcoólica: 1996).

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; CAMPOS, A.A.; ORELLI, V.F.D.M. **Estabilidade da levedura em condições industriais avaliada pela técnica da cariotipagem (separação eletroforética do DNA cromossômico**).. Piracicaba:ESALQ, 1993. p.79-95. (Relatório anual de pesquisas em fermentação alcoólica: 1993).

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

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; ORELLI, V.F.D.M**. Estabilidade da levedura em condições industriais avaliada pela técnica da cariotipagem durante a safra 93/94**. Piracicaba:ESALQ, 1994. p.1-43. (Relatório anual de pesquisas em fermentação alcoólica: 1994).

BASSO, L.C.; BASSO, T.O.; ROCHA, S.N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: SANTOS B., S.M. A. (Ed.). **Biofuel production recent developments and prospects.** Croatia: Intech, 2011. chap-5, p.85-100.

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

BIRCH, R.M.; WALKER, G.M. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology,** New York, v.88, p.746-755, 1999.

BOVI, R.; MARQUES, M.O. O tratamento ácido na fermentação alcoólica. **STAB Álcool & Açúcar**, Piracicaba, v.3, n.9, p.10-13, 1983.

BRETHAUER, S.; WYMAN, C.E. Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, Essex, v.101, p.4862–4874, 2010.

CANETTA, E.; ADYA, A.K. Atomic force microscopy: applications to nanobiotecnology. **Journal of Indian Chemistry**, New Dehli, v.82, p.93-118, 2005.

CARTWRIGHT, C.P.; ROSE, A.H.; CALDERBANK, J.; KEENAN, M.H.J. Solute Transport. In: ROSE, A.H (Ed.) **The yeasts**. Academic Press, London, v.3, p.55- 56, 1989.

CARVALHO-NETTO, O.V.; CARAZZOLLE, M.F.; MOFATTO, L.S.; TEIXEIRA, P.; NORONHA, M.F.; CALDERON, L.; MIECZKOWSKI, P.A.; ARGUESO, J., PEREIRA, G. *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional reprograming due to bacterial contamination during industrial scale bioethanol production. **Microbial Cell Factories**, Barcelona, v.14, p.1-13, 2015.

CAVALHEIRO, A.A**. Análise dos mutantes de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* para a melhoria na resistência e produção de etanol**. 2013. 78p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico- Farmacêutica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

CECCATO-ANTONINI, S.R. Biotechnological implications of filamentation in *Saccharomyces cerevisia*e. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v.30, n.7, p.1151-1161, 2008.

CECCATO-ANTONINI, S.R.; PARAZZI, C**.** Isolamento de levedura selvagem floculante e efeitos da contaminação em processos de fermentação etanólica contínua. In: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DOS TÉCNICOS AÇUCAREIROS DO BRASIL, 6., 1996, Maceio. **Anais...**Maceió: STAB, 1996. p.23-29.

CECCATO-ANTONINI, S.R.; PARAZZI, C. Monitoramento microbiológico da fermentação etanólica: uma experiência. **Jornal Cana***,* Ribeirão Preto, p.25-26, jan/2000.

CECCATO-ANTONINI, S.R.; SILVA, D.F., Eficiência de meios diferenciais no isolamento de cepas de leveduras de processos industriais de fermentação alcoólica. **STAB – Açúcar Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v.18, p.40-46, 1998.

CHERUBIN, R.A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 2003.124p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

CHIEPPE JÚNIOR, J.B. **Tecnologia e Fabricação do Álcool.** – Inhumas: IFG; Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2012. 74p.

CONVERTI, A.; ZILLI, M.; ROVATTI, M. Effects of glycerol on alcohol fermentation. Inhibition mechanism and diffusion limitations**. Bioprocess Engineering**, Berlim, v.13, n.5, p.257-263, 1995.

D'AMORE, T.; STEWART, G.G. Ethanol tolerance of yeast. **Enzyme and Microbial Technology***,*New York, v.9, p.322-330, 1987.

DORTA, C. **Sinergismo entre sulfito, ácido lático, pH e etanol na fermentação alcoólica de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e M-26**. 2006**.** 144p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2006.

ESTRUCH, F. Stress-controlled transcription factor, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. **FEMS Microbiology**, Amsterdam, v.24, p.469-486, 2000.

FURTADO, T.A.; SCANDIFFIO, M.G. Álcool no Brasil - Uma longa história. **Scientific American Brasil**, São Paulo, p.66-71, 2006.

GALLO, C.R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcóolica.** 1990. 338p. Tese (Doutorado em Tecnologia de alimentos) -Faculdade de Engenharia de Alimentos,Universidade de Campinas, Campinas, 1990.

GUERRA, E. **Mecanismo de infecção da fermentação alcóolica industrial por *Brettanomyces bruxellensis***: Impacto no processo e medidas operacionais do agente infeccioso. 1988. 71p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 1998.

GUTIERREZ, L.E. Produção de glicerol por linhagens de *Saccharomyces* durante fermentação alcóolica. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, Piracicaba, v.48, p.55-69, 1991.

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

JORNALCANA. Disponível em: https://www.jornalcana.com.br/fapesp-financia-estudo-sobre-etanol/. Acesso em: 15 out. 2015.

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

KANDLER, O.; WEISS, N. *Lactobacillus*. In: WILLIAMS, S.T.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins1986. v.4. p.1209–1234.

KOLB, E. **Vinos de frutas- Elaboración artesanal e industrial**. Zaragoza: Ed. Acribia, 2002. 232p.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios da bioquímica.** 2 ed. São Paulo: Ed. Sarvier, 1995.

LIMA, U.A.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. Produção de etanol. In: LIMA, U.A. (Coord.). **Biotecnologia Industrial:** processos fermentativos e enzimáticos. 3ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. p.1-60.

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

LUDWIG, K.M.; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS, D.F. Quantificação da floculação de *S. cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.21, p.63-68, 2001.

MACEDO, I.C.; NOGUEIRA, L.A.H. **Avaliação da expansão da produção de etanol no Brasil.** Brasília: Cgee: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos**,** 2004. 73p.

MAIORELLA, B.; BLANCH, H.W.; WILKE, C.R. Feed component inhibition in ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.26, p.1156-1166, 1984.

MENEGHIN, S.P.; REIS, F.C.; ALMEIDA, P.G.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Chlorine dioxide against bacteria and yeasts from the alcoholic fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.39, p.337-343, 2008.

MENEGHIN, M.C.; BASSI, A.P.; CODATO, C.B.; REIS, V.R.; CECCATO-ANTONINI, S.R. 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**, Oxford, v.30, n.8, p.295-305, 2013.

MINIAC, M. Contamination des fermentations alcooliques industrielles par les levures du genre: *Brettanomyces.* **Industries Alimentaires et Agricoles**, Paris, v.106, n.7/8, p.559-563, 1989.

NASCIMENTO,T.S. **Efeitos da utilização de leveduras selvagens selecionadas na fermentação industrial**. 2012. 42p. Trabalho de Graduação (Tecnologia em Biocombustíveis) - Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, do Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, Araçatuba, 2012.

NEVOIGT, E.; STAHL, U. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews,** Amsterdam**,** v.21, p.231-241, 1997.

OLIVEIRA, M.C.F.L.; PAGNOCCA, F.C. Aplicabilidade de meios seletivos empregados na indústria cervejeira para detecção de leveduras selvagens em unidades sucro-alcooleiras. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÃO, 8., 1988. São Lourenço. **Anais**... São Lourenço: SBM, 1998. p.78-81.

PANEK, A.D. Storage carbohydrates. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. (Ed.). **The yeasts.** Academic Press, New York, v.4, p.655-678, 1991.

PANEK, A.D.; MANSURE, J.J.A.; PASCHOALIN, M.F.; PANEK, A.D. Regulation of trehalose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* mutants during temperatures shifts. **Biochemie,** Paris**,** v.72, p.77-79, 1990.

PEREIRA, L.F.; BASSI, A.P.G.; AVANSINI, S.H.; BARBOSA-NETO, A.G.; BRASILEIRO, B.T.R.V.; CECCATO-ANTONINI, S.R.; MORAIS JR, M.A. 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**, Dordrecht, v.101, n.3, p.529-539, 2012.

RATCLIFF, W.C.; FANKHAUSER, J.D.; ROGERS, D.W.; GREIG, D.; TRAVISANO, M. Origins of multicellular evolvability in snowflake yeast**. Nature Communications**, New York, v.6, p.1-9, 2015.

REIS, V.R. **Caracterização de linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de processos fermentativos para produção de etanol**. 2011. 81p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”,Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

REIS, V.R.; BASSI, A.P.; G.; SILVA, J.C.G.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts exhibiting rough colonies and pseudohyphal morphology with respect to alcoholic fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology,** São Paulo, v.44, n.4, p.1121-1131, 2013.

RFA. Biorefinery locations. (Renewable Fuels Association). Disponível em: http://www.ethanolrfa.org/bio-refinery-locations/: Acesso em: 05Dez 2015.

RODRIGUES, A**. Identificação e caracterização de genes e fatores relacionados à floculação desenvolvimento de uma levedura industrial não floculante**. 2013. 136p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, 2013.

RUIS, H.; SCHULLER, C. S. Stress signalling in yeast. **Bioessays**, Cambridge, v.17, n.11, p.959-965, 1995.

SALVATO, F. **Fermentação de mosto industrial por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com transportador de sacarose e sobre-expressão de invertase interna:** estudo comparativo com linhagens com alta e baixa atividade de invertase externa. 2010. 94p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2010.

SCHMIDELL, W.; BONOMI, A. Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos**.** In: BORZANI, W. **Biotecnologia industrial**. v.2. São Paulo: Editora Edgard Blucher 2001. p.123-178.

SILVA, R.B.O. **Leveduras contaminantes na produção de etanol industrial por processo contínuo**: quantificação e identificação. Rio Claro, 1994. 145p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 1994.

SKINNER, K.A.; LEATHERS, T.D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v.3, p.401–408, 2004.

SOARES, E.V. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.110, p.1-18, 2010.

SOUZA E.L.L.; MACEDO, I.C. **Etanol e bioeletricidade**: a cana-de-açúcar no futuro da matriz energética. São Paulo: Luc Projetos de Comunicação, 2010. 315p.

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

STROPPA, C.T.; ANDRIETTA, S.R.; ANDRIETTA, M.G.S. Caracterização das leveduras floculantes selecionadas em reator tipo torre em uma unidade de fermentação alcoólica. In: SINAFERM, 2003, Florianópolis. In: SINAFERM,14., 2003. Florianópolis. 280p

STUPIELLO, J.P.; MARINO, E.A.; CELINSKI, R. **Fermentação.** São Paulo: Copersucar, 1974.79p.

SWAN, T.; WATSON, K. Stress tolerance in yeast sterol auxotroph: role of ergosterol, heat shock proteins and trehalose. **FEMS Microbiology Letters,** Amsterdam, v.169, p.191-197, 1998.

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

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

TOKUOKA, K.A. Sugar- and salt- tolerant yeast. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.74, p.101-110, 1993.

Única. Disponível em: http://www.unica.com.br/documentos. Acesso em janeiro de 2016.

van DIJKEN, J.P.; SHEFFERS, W.A. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. **FEMS Microbiology**, Amsterdam, v.32, p.199-224, 1986.

VOORDECKERS, K.; MAEYER, D.; van DER ZANDE, E.; VINCES, M.D.; MEERT, W.; CLOOTS, L. Identification of a complex genetic network underlying *Saccharomyces cerevisiae* colony morphology. **Molecular Microbiology,** Salem, v.86, p.225-239, 2012.

WARD, O.P**. Biotecnologia de la fermentacion**: princípios, processos y produtos. Zaragoza-Espanha: Ed. Acribia, 1991. 155p.

ZECH, M.; GÖRISCH, H. Invertase from *Saccharomyces cerevisiae*: reversible ativation by components of industrial molasses media. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.17, p.41-46, 1995.

3 EFEITO DO SUBSTRATO SOBRE FERMENTAÇÕES CONTAMINADAS COM LEVEDURAS SELVAGENS *Saccharomyces cerevisiae* E BACTÉRIA *Lactobacillus fermentum*

Resumo

Estudos com o objetivo de verificar o efeito de diferentes substratos sobre o desenvolvimento das contaminações por bactérias e leveduras selvagens, em consorciação, durante a fermentação etanólica têm sido pouco encontrados. O presente trabalho objetivou avaliar o efeito do caldo de cana e do melaço como substratos de fermentação sobre o desenvolvimento de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* selvagens que apresentam colônias rugosas e células em pseudohifas (3 linhagens), e da bactéria *Lactobacillus fermentum*, utilizando-se a levedura industrial PE-2 como levedura do processo. Foram realizadas fermentações puras e mistas, em meios de caldo de cana e de melaço 16 ºBrix, pH 4,5 em ciclo único de fermentação, durante 48 horas, a 30 ºC. Em cultura pura, a linhagem PE-2 apresentou eficiência fermentativa maior em substrato de caldo de cana 16 °Brix quanto comparada com as linhagens rugosas. Em mosto a partir de melaço, a eficiência fermentativa decaiu para cerca de 40% nas primeiras 12 horas de fermentação com a linhagem PE-2. Tanto a contaminação com a levedura rugosa quanto com a bactéria *L. fermentum* teve prejuízo à fermentação. O substrato de fermentação, caldo de cana ou melaço, teve influência sobre a fermentação e o desenvolvimento das contaminações, pois as fermentações contaminadas com as leveduras rugosas tiveram eficiência mais alta em melaço que em caldo, com exceção da contaminação com a linhagem rugosa 7. As fermentações contaminadas com *L. fermentum* apresentaram menor eficiência em melaço, e nas fermentações contaminadas com ambos os micro-organismos (levedura rugosa e bactéria), somente verificou-se diminuição significativa na eficiência fermentativa com a linhagem rugosa 36, em ambos os substratos. Verificou-se que o tipo de substrato interferiu com o desenvolvimento das contaminações por leveduras rugosas associadas ou não à *L. fermentum.*

Palavras-chave: Bactérias láticas; Substrato; Leveduras contaminantes

Abstract

Studies in order to evaluate the effect of different substrates on the development of contamination by bacteria and wild yeasts in association during the ethanol fermentation have been seldom found. This study aimed to evaluate the effect of sugarcane juice and molasses as fermentation substrates on the development of *Saccharomyces cerevisiae* wild strains that present rough colonies and cells in pseudohyphae (3 strains), and the bacteria *Lactobacillus fermentum,* utilizing strain PE-2 of *S. cerevisiae* as industrial yeast. Pure and mixed fermentations were performed in sugarcane and molasses,16 °Brix, pH 4.5 in a single fermentation cycle, for 48 hours at 30 °C. In pure culture, PE-2 strain showed higher fermentation efficiency in sugarcane juice substrate as compared to the rough strains. In molasses, the fermentation efficiency dropped down to 40% during the first 12 hours of incubation with PE-2 strain. Both contamination with rough yeast strain and *L. fermentum* were harmful to the fermentation. The substrate influenced the fermentation and the contamination development, because the fermentations

contaminated with the rough strains presented higher ethanol yield in molasses than in juice, exception for the contamination with the rough yeast strain 7. With *L. fermentum*, lower efficiency in molasses was observed, and with both contaminants (rough yeast strain and bacteria), a significant decrease in the fermentative efficiency was verified only with the rough yeast strain 36, in both substrates. In summary, the type of substrate interfered with the development of contaminations by rough yeast strains associated or not with *L. fermentum.*

Keywords: Lactic acid bacteria; Substrate; yeast contaminants

3.1 Introdução

Nas unidades de produção de álcool acopladas às unidades de produção de açúcar, a matéria-prima utilizada para obtenção de etanol normalmente é o mel final diluído em caldo de segundo terno ou filtrado após tratamento, ou somente em água. Devido ao melaço possuir uma composição diferente do caldo de cana, pode haver diferenças quanto à eficiência fermentativa quando se opta em produzir etanol a partir desse subproduto.

Os nutrientes que estavam na cana de açúcar podem estar concentrados ou podem ser destruídos durante o processo de obtenção do açúcar e consequentemente do melaço. O acúmulo acontece quando o caldo passa pelos evaporadores e cozedores para a retirada da água e cristalização do açúcar. Durante o cozimento, pode ocorrer também a degradação térmica da sacarose, formando compostos indesejáveis à fermentação alcoólica, tais como ácidos orgânicos (ácido lático, fórmico e acético) e hidroximetil-furfural (HMF). Estes compostos, por apresentarem ação antimicrobiana, podem afetar o desempenho das leveduras, podendo ser uma das causas da baixa qualidade fermentativa de alguns méis.

Considerando que o substrato a ser fermentado não é esterilizado, a composição do substrato deve ter influência sobre a dinâmica dos micro-organismos nativos e sobre a interação desses com a levedura de processo. Sendo assim, o objetivo desde trabalho foi avaliar o efeito do substrato (melaço e caldo de cana) nas fermentações conduzidas pela levedura industrial selecionada PE-2 e contaminada com leveduras *S. cerevisiae* rugosas e ou com a bactéria *L. fermentum*, procurando verificar se o substrato pode beneficiar ou prejudicar o desenvolvimento dos contaminantes.

3.2 Revisão Bibliográfica

As fermentações no Brasil são desenvolvidas com mostos de caldo de cana, melaço diluído ou uma mistura de ambos (AMORIM et al., 2011). O caldo de cana-de-açúcar se constitui em ótimo substrato para o crescimento de muitos micro-organismos, em função dos teores de nutrientes orgânicos e inorgânicos, e apresenta alta atividade de água e pH favoráveis (CEBALLOS-SCHIAVONE, 2009). O nitrogênio na forma amoniacal (NH_4^+) é encontrado no mosto proveniente do caldo de cana, e sua concentração influi sobre o brotamento e a taxa de multiplicação da levedura (TOSETO, 2008).

Durante o processo de fabricação de açúcar, são gerados subprodutos e resíduos da produção, sendo que praticamente todos estes podem ser aproveitados de maneira a aumentar os lucros da própria indústria e diminuir os custos de produção e impactos ambientais (MEZAROBA et al., 2010). O melaço ou mel final se constitui no principal subproduto da indústria do açúcar, sendo produzido na proporção de 40 a 60 quilos por tonelada de cana processada. Ele apresenta uma concentração de nutrientes bem mais elevada do que os mostos de caldo de cana, porém não apresenta o nitrogênio em forma adequada para as leveduras, podendo inclusive comprometer a qualidade do álcool (VASCONCELOS, 1987).

A composição química tanto do caldo de cana quanto do melaço depende muito da cana utilizada, portanto, é extremamente variável (MARQUES, 2008). A quantidade de nutrientes é maior no melaço que no caldo de cana, o que pode ocasionar, segundo Souza (2009), o estresse induzido pelo aumento da osmolaridade externa, levando à redução no crescimento e perda da viabilidade das células das leveduras, devido às perturbações no gradiente osmótico através da membrana plasmática.

Lima et al. (2013) avaliaram a eficiência alcoólica da fermentação com melaço de cana-de-açúcar após reciclo de células, utilizando a fermentação de caldo de cana como referência. Verificou alta similaridade entre os substratos, porém o melaço apresentou capacidade fermentescível superior ao caldo de cana.

Venturini Filho et al. (2013) quantificaram o metabolismo aeróbio (respiração) e anaeróbio (fermentação alcoólica) durante a fermentação de mostos de melaço e de caldo de cana pela levedura de panificação por meio de método estequiométrico. Os autores diluíram o melaço com água para produzir mostos com 10, 20 e 30 °Brix,

enquanto que o teor de sólidos solúveis do caldo foi corrigido com água ou açúcar cristal com o mesmo propósito. Os mostos foram inoculados com a levedura (100 g/L) e fermentados a temperatura ambiente. Os resultados mostraram que a levedura catabolizou o açúcar durante o processo fermentativo, tanto por via aeróbia como pela via anaeróbia, com prevalência dessa última. A taxa de fermentação no mosto de melaço ficou entre 80,02 % (10 °Brix) e 91,58 % (30 °Brix), enquanto no mosto de caldo de cana esses valores foram de 83,17 % (10 °Brix) e 89,16 % (30 °Brix), demonstrando o efeito do substrato na fermentação.

Poucos trabalhos tem relacionado o substrato ao desenvolvimento de contaminantes na fermentação. Pereira et al. (2014) verificaram que a levedura contaminante *Dekkera bruxellensis* produziu acetato em fermentação a base de melaço, o que não ocorreu quando o meio de fermentação foi caldo de cana. Essa diferença no metabolismo pode afetar a interação entre o contaminante e a levedura do processo. É esse contexto que o presente trabalho pretende abordar.

3.3 Material e Métodos

3.3.1 Micro-organismos utilizados

Foram utilizadas as seguintes linhagens de *S. cerevisiae:* PE-2 como levedura de processo, e as linhagens rugosas 07, 36 e 52 (CCT7789, CCT7788 e CCT7787, respectivamente) além da linhagem de *L. fermentum* CCT5852 (ATCC 19255). As linhagens pertencem ao banco de culturas do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM), CCA/UFSCar – *Campus* de Araras e foram armazenadas em meio YPD a 4°C.

3.3.2 Preparo do inóculo

A fermentação iniciou-se com o preparo do inóculo das leveduras, separadamente, que ocorreu em duas fases. Na primeira fase, a de pré-inóculo, a levedura foi transferida para uma placa de Petri com meio de reativação YPD (em p/v: 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose, 2% ágar) e posteriormente incubada a 30ºC por 48 horas. Na segunda fase, para obtenção do inóculo, foram transferidas duas alçadas de células da placa de Petri para

erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de multiplicação (caldo de cana ou melaço 4 ^{o}Brix, pH 5,0, com solução de sais na proporção de 10 mL/L). A solução de sais foi preparada da seguinte forma: dissolveu-se 50 g de sulfato de amônio, 20 g de fosfato monobásico de potássio, 10 g de sulfato de magnésio, 1 g de sulfato de zinco e 1 g de sulfato de manganês em 500 mL de água destilada, completando-se o volume para 1000 mL. A solução foi esterilizada em autoclave e armazenada a 4 ^{o}C.

Os frascos foram mantidos em incubadora a 30 ºC, sob agitação de 160 rpm, por 24 horas, a fim de se obter a quantidade de massa úmida necessária para a fermentação. Após esse período a massa foi centrifugada e lavada com agua destilada estéril por 2 vezes.

Após a última lavagem, os tubos foram pesados em balança analítica para estimativa do peso da massa úmida no total. Utilizou-se a proporção de 10 g de massa úmida/litro de meio de fermentação, sendo necessários, portanto, 2 g de massa úmida/frasco de fermentação, para experimentos feitos em duplicata, ou seja, 1 g de massa úmida de cada levedura. Essa massa foi ressuspendida em meio de fermentação (caldo de cana ou melaço 16° Brix, pH 4,5, com solução de sais na proporção de 10 mL/L). O número inicial de leveduras na fermentação foi de ~10^{8} UFC/mL para PE-2 e ~10^{6} UFC/mL para a levedura rugosa.

O inóculo da bactéria *L. fermentum* foi preparado da mesma maneira que para as leveduras, em duas etapas. Inicialmente, a bactéria foi crescida em meio MRS (Peptona proteose: 10,0 g/L; Extrato de carne: 10,0 g/L; Extrato de levedura: 5,0 g/L; Dextrose: 20,0 g/L; Polisorbato 80: 1,0 g/L; Citrato de amônia: 2,0 g/L; Acetato de sódio: 5,0 g/L; Sulfato de magnésio: 0,10 g/L; Sulfato de manganês: 0,05g/L; Fosfato dipotássico: 2,0 g/L; Agar: 12,0 g/L), e incubada a 35ºC por 48 horas. Posteriormente, a bactéria foi transferida para o meio de multiplicação acima e incubada a 35 ºC, sob agitação de 160 rpm, por 24 horas. Os frascos foram centrifugados e a massa celular foi ressuspendida em meio de fermentação. O número inicial de bactéria na fermentação foi em torno de 10^{6} UFC/mL.

O inóculo de leveduras e bactéria foi assim constituído, nas fermentações com diferentes combinações de micro-organismos:

- cultura pura PE-2: 40 mL de massa celular ressuspendida em meio de fermentação;

- cultura mista PE-2 + rugosa, ou PE-2 + *L. fermentum*: 20 mL de massa celular, de cada micro-organismo, ressuspendida em meio de fermentação;

- cultura mista PE-2 + rugosa + *L. fermentum*: 13-14 mL de massa celular, de cada micro-organismo, ressuspendida em meio de fermentação.

3.3.3 Teste de fermentação com ciclo único

Em erlemeyer de 500 mL foram adicionados 160 mL de meio de caldo de cana ou melaço 16° Brix estéril, pH 4,5, com solução de sais (10 mL/L de meio). Em seguida, adicionou-se 40 mL de inóculo e incubou-se em estufa a 30 ºC, em condições de semi-aerobiose (frascos tampados com algodão), por 48 horas. A fermentação foi realizada em ciclo único e em duplicata.

3.3.4 Análises

Foram coletadas amostras de 1 mL no início dos testes fermentativos (tempo zero) para a quantificação dos micro-organismos. A cada 12 horas, até 48 horas, foram retirados 15 mL, dos quais 1 mL foi utilizado para a quantificação dos micro-organismos, e o restante foi centrifugado a 580 g por 5 minutos, sendo a massa celular descartada. O sobrenadante foi analisado quanto ao teor alcóolico e açúcares redutores totais.

3.3.4.1 Quantificação de micro-organismos

As amostras de 1 mL coletadas foram diluídas em solução salina, sendo espalhados 100 µL de cada diluição em meio YPD com cloranfenicol e tetraciclina. As placas foram incubadas a 30 ºC por 48-72 horas. A seguir foram contadas as colônias, discriminando-se entre colônias mucosas (PE-2) e rugosas, nas fermentações com culturas mistas de leveduras. Para avaliação do crescimento de *L. fermentum,* quando necessário, o meio utilizado foi o MRS com nistatina, sendo as placas incubadas a 35ºC por 48 a 72 horas. Os resultados foram expressos em UFC/mL.

3.3.4.2 Açúcares redutores totais (ART)

Para a quantificação de açúcares redutores totais utilizou a metodologia de Miller (1959). Inicialmente, para a hidrólise da sacarose, pipetou-se 1 mL de cada amostra

do sobrenadante para balões volumétricos de 100 mL, em seguida adicionou-se 30 mL de água destilada e 2,5 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado e homogeneizou-se. Os balões foram levados para banho-maria a 65 °C por 15 minutos. As amostras foram resfriadas em água corrente e em seguida adicionou-se 2,8 mL de NaOH 12 mol/L e completou-se o volume do balão até o menisco com água destilada. Retirou-se 1 mL de cada solução preparada transferindo-se para tubos de ensaio, e neste adicionou-se 1 mL da solução estoque de ADNS e 1 mL de água destilada, totalizando um volume de 3 mL. As amostras foram submetidas ao banho térmico (água fervente) por 5 minutos, os tubos em seguida foram resfriados em água corrente e receberam 5 mL de água destilada, perfazendo um total de 8 mL. Homogeneizou-se por exatos 5 segundos em vortex e realizou-se a leitura da absorbância a 540 nm em espectrofotômetro digital (Thermo® Biomate 3). O mesmo procedimento foi feito utilizando-se água ao invés da amostra para se obter o branco da reação, que foi utilizado para calibrar o aparelho.

A quantidade de açúcares redutores totais (ART) foi obtida através de uma curva padrão de glicose, pesando-se 1,2 g de glicose previamente seca em dessecador de sílica gel por 7 dias e depois colocada em estufa a 70°C durante 2 horas e novamente levada ao dessecador para ser resfriada. A glicose foi transferida cuidadosamente para um balão volumétrico de 200 mL, completando-se o volume com água destilada. Alíquotas de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 mL desta solução foram transferidas com pipeta graduada de 10 mL, para balões volumétricos de 100 mL, completando-se o volume também com água destilada. Cada mL dessas soluções, considerando-se a diluição, continha, respectivamente, 0,12; 0,24; 0,36; 0,48; 0,60; 0,72; 0,84; 0,96; 1,08; 1,20 mg de glicose. Para a leitura da absorbância a 540 nm, realizou-se o mesmo procedimento anterior. A partir da concentração de glicose e da respectiva absorbância, efetuou-se a regressão linear e determinou-se a correlação (R^2). O cálculo da quantidade de açúcares redutores totais foi realizado da seguinte forma:

$$\text{ART (mg/mL)} = \frac{A_{540\ nm} + 0{,}0589 \times \text{diluição amostra}}{0{,}7445} \qquad (R^2 = 0{,}9998)$$

3.3.4.3 Teor alcoólico

Para a análise do teor alcoólico, procedeu-se a destilação de 10 mL das amostras centrifugadas em microdestilador TE-012 (Tecnal) e posteriormente determinou-se o teor alcoólico através da densidade alcoólica obtida em densímetro digital DMA-45 (Anton Paar), conforme Amorim (1997). Os dados de densidade foram transformados em g de álcool/100mL, de acordo com as tabelas de conversão.

3.3.5 Cálculo de eficiência fermentativa

Para calcular a eficiência fermentativa utilizou-se a fórmula baseada no cálculo estequiométrico teórico de Gay-Lussac (51,11 g de etanol/100 g de glicose) a seguir:

$$\text{Eficiência fermentativa (\%)} = \frac{\text{Etanol} / (\text{ART}_{\text{inicial}} - \text{ART}_{\text{final}})}{0{,}511} \times 100$$

Foram utilizados os dados de etanol, ART inicial e ART final em g/100 mL, para cada período analisado durante a fermentação, calculando-se ao final, a eficiência fermentativa média (dos 4 períodos de tempo) para cada fermentação.

3.3.6 Análise estatística

Os resultados dos testes fermentativos (eficiência fermentativa) foram submetidos à análise de variância, e no caso de diferença significativa, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância, utilizando-se o software *Statistica*.

3.4 Resultados e Discussão

Nas fermentações realizadas com culturas puras de leveduras, pode-se verificar que a linhagem PE-2 apresentou uma eficiência fermentativa maior em substrato de caldo de cana 16 °Brix quanto comparada com as linhagens rugosas. Comparando-se os resultados obtidos no período de 12 horas, tempo geralmente utilizado pelas

usinas para completar a fermentação, a eficiência fermentativa da PE-2 foi o dobro da linhagem rugosa 36 e mais que o triplo das linhagens 07 e 52 (Figura 1C). Para os demais períodos de tempo, essa diferença diminuiu, confirmando o resultado obtido por REIS et al. (2013), que demonstraram em seu trabalho que as linhagens rugosas de *S. cerevisiae* possuem velocidade mais lenta de fermentação.

O teor alcoólico na fermentação com a linhagem PE-2 foi sempre superior ao das demais linhagens de *S. cerevisiae* (as quais não diferiram entre si), Figura 1A. No entanto, não houve diferença no teor de ART residual do caldo (o consumo foi similar entre as linhagens estudadas, Figura 1B), o que explica a mais baixa eficiência fermentativa apresentada pelas linhagens rugosas. Com exceção da linhagem rugosa 07, as demais linhagens rugosas (36 e 52) apresentaram aumento no número de UFC ao longo do tempo, enquanto a linhagem PE-2 só teve aumento do número de UFC em 48 horas (Figura 1D).

Nas fermentações realizadas com a levedura PE-2 contaminadas com as linhagens rugosas ou *L. fermentum*, verificou-se o impacto negativo das contaminações na produção de etanol.

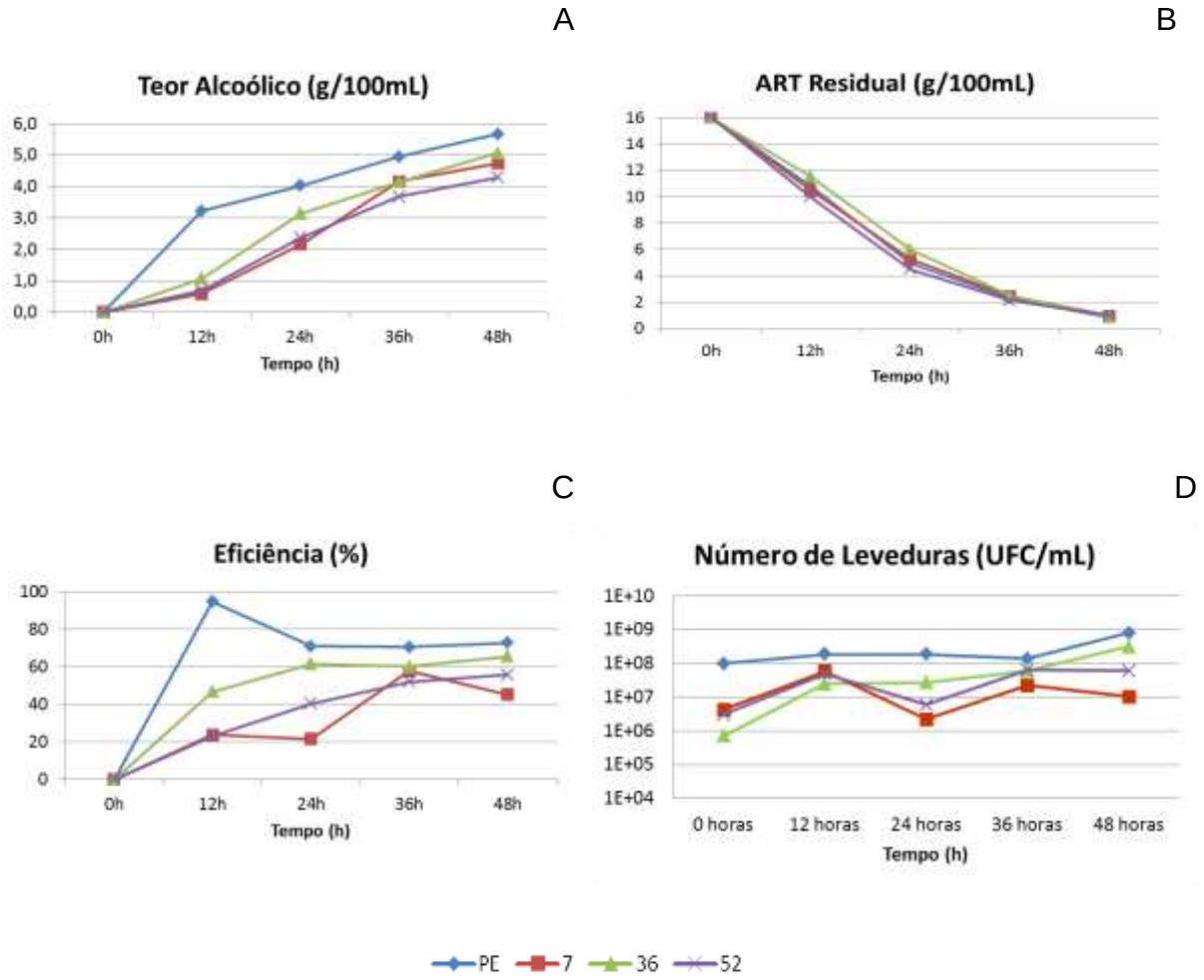


Figura 1 - Teor alcoólico (g/100 mL), ART residual (g/100 mL), eficiência fermentativa (%) e número de leveduras (UFC/mL) nas fermentações com culturas puras das linhagens de *S. cerevisiae* PE-2, e rugosas (07, 36 e 52) em meio de caldo de cana 16 º Brix, pH 4,5, em ciclo único de fermentação, durante 48 horas, a 30 ºC

Nas primeiras 12 horas com mosto de caldo de cana 16 °Brix, observou-se uma eficiência de 94,7 % com a levedura PE-2 (Figura 1C) e nas mesmas condições, introduzindo o micro-organismo contaminante, essa eficiência caiu para 60% quando se inoculou a levedura rugosa 07, 40% com a rugosa 36, 30% com o *L. fermentum* e 20% com a rugosa 52. Ao longo de 48 horas de fermentação, a eficiência fermentativa nas fermentações contaminadas não atingiu os valores obtidos na fermentação conduzida com a cultura pura de PE-2 (Figura 1C e 2C).

.

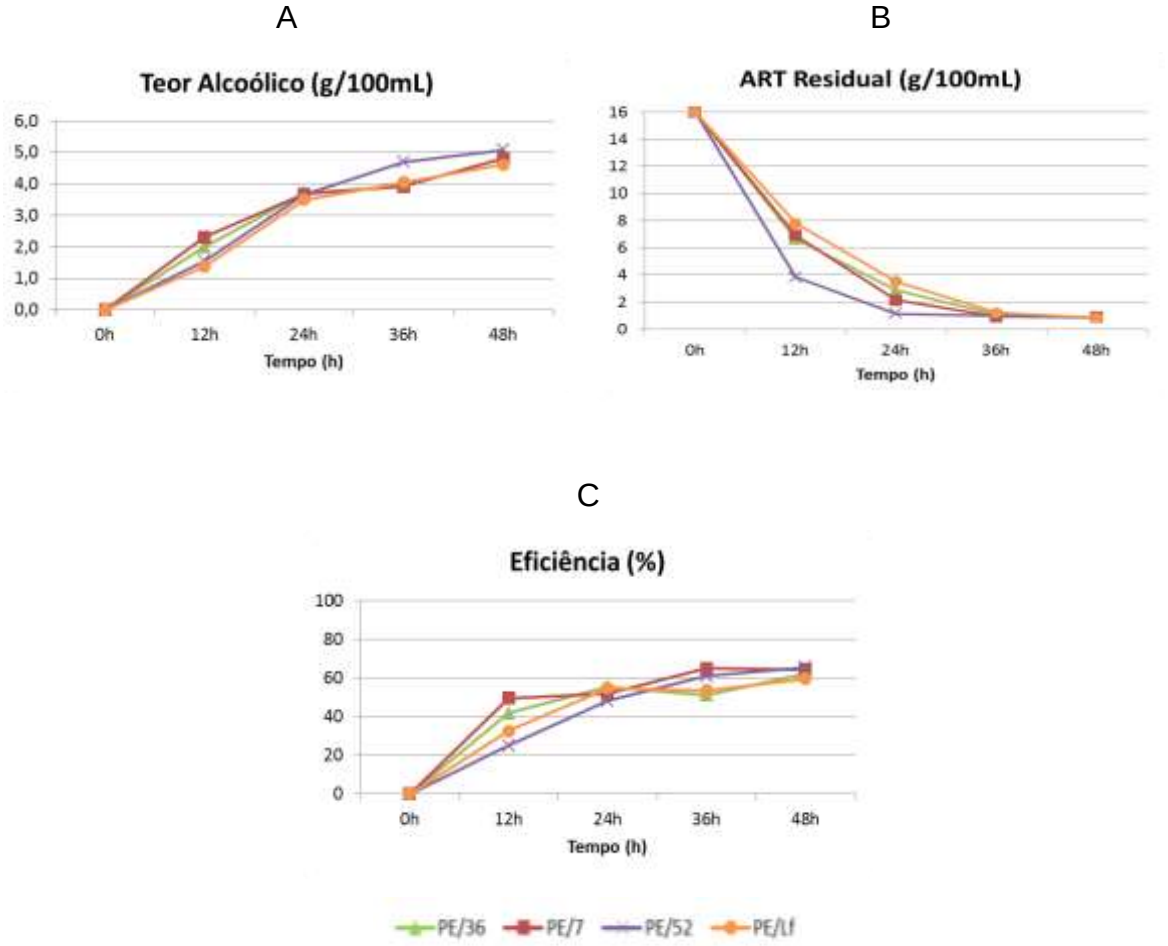


Figura 2 - Teor alcoólico (g/100 mL), ART residual (g/100 mL) e eficiência fermentativa das fermentações conduzidas pela linhagem de *S. cerevisiae* PE-2 e contaminadas com as linhagens rugosas (07, 36 e 52) ou *L. fermentum*, em meio de caldo de cana 16 º Brix, pH 4,5 em ciclo único de fermentação, durante 48 horas, a 30 ºC

Em relação ao crescimento dos micro-organismos durante o período de 48 horas, pode-se observar que em todas as fermentações o número de UFC do contaminante (levedura ou bactéria) não superou o número de UFC da PE-2. Cabe ressaltar que o número inicial de UFC da PE-2 foi de 10^8 UFC/mL enquanto para os contaminantes foi de ~10^6 UFC/mL. Tanto a levedura do processo quanto o contaminante apresentaram aumento no número de UFC ao longo do tempo (Figuras 3A e 3B), com algumas variações, porém para a levedura rugosa 52 o número final de UFC em 48 horas foi igual ao inicial (Figura 3C). Houve crescimento também da bactéria *L. fermentum* na fermentação com a levedura PE-2 (Figura 3D).

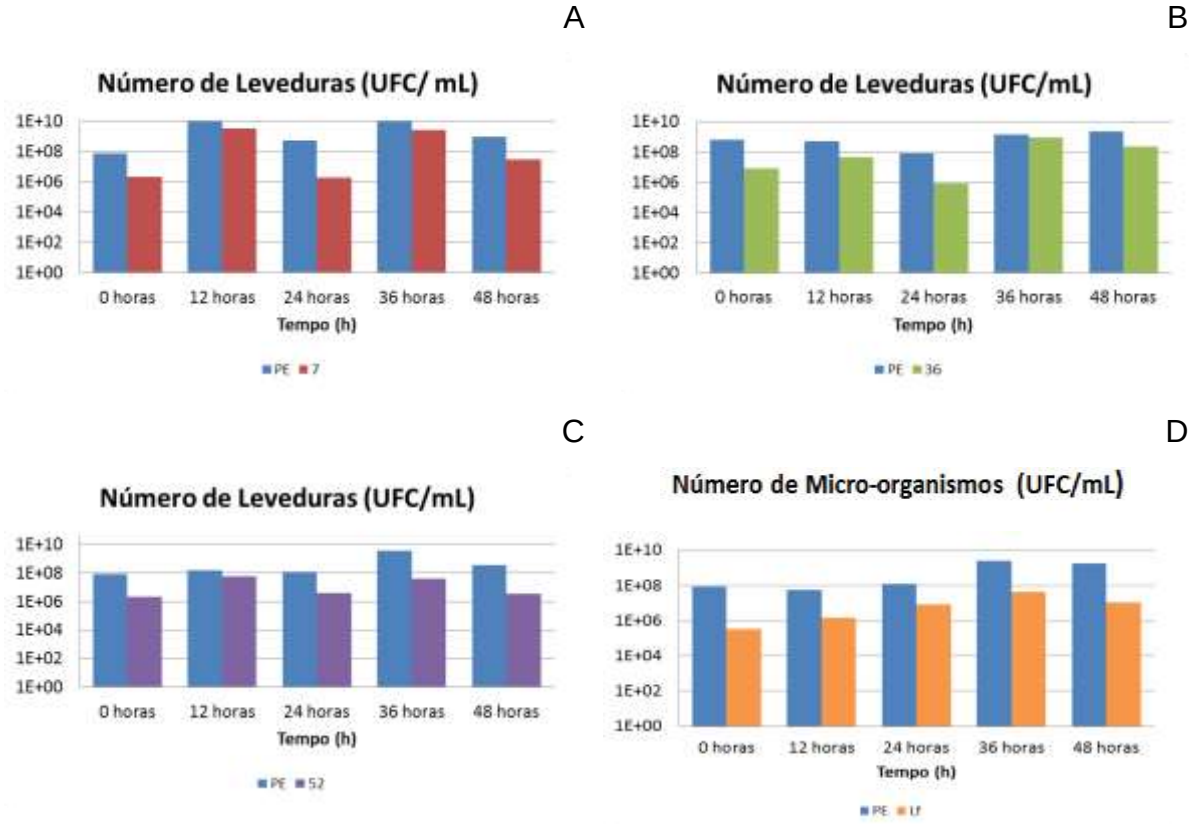


Figura 3 - Número de micro-organismos (UFC/mL) nas fermentações conduzidas pela linhagem *S. cerevisiae* PE-2 e contaminadas com as linhagens rugosas (7, 36 e 52) ou *L. fermentum* em meio de caldo de cana 16 ºBrix, pH 4,5 em ciclo único de fermentação, durante 48 horas, a 30 ºC

A Figura 4 demonstra os resultados das fermentações contaminadas com dois micro-organismos, a levedura rugosa e a *L. fermentum* (PE-2 + 36 + *L. fermentum*; PE-2 + 07 + *L. fermentum*; PE-2 + 52 + *L. fermentum*) em mosto de caldo. Comparando com a fermentação em que somente a levedura rugosa foi inoculada como contaminante (Figura 2), a introdução da bactéria no processo trouxe uma queda ainda maior na produção de etanol. Houve uma queda de cerca de 10% quando a bactéria foi inoculada com a linhagem rugosa 7 ou 52; e de cerca de 40% quando foi inoculada com a linhagem 36, em 48 horas de fermentação (Figura 2A e 4A).

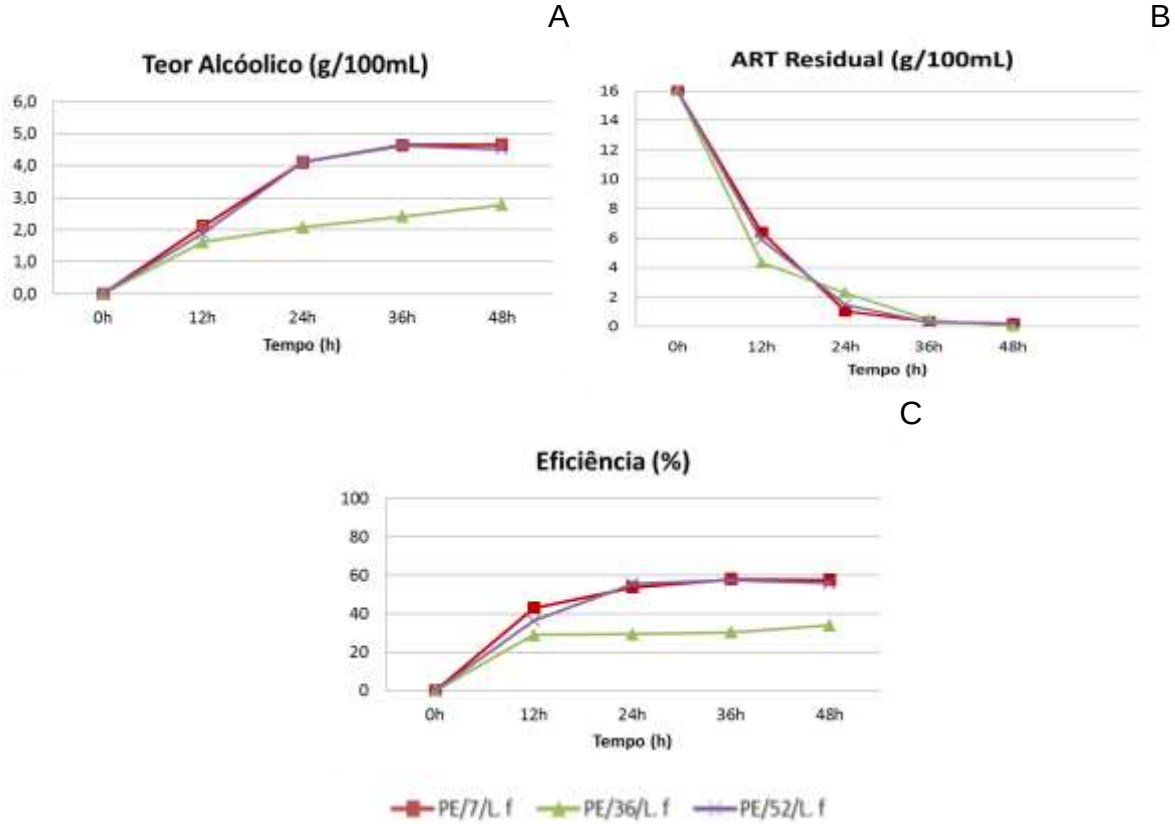


Figura 4 - Teor alcoólico (g/100 mL), ART residual (g/100 mL) e eficiência fermentativa das fermentações conduzidas pela linhagem de *S. cerevisiae* PE-2 e contaminadas com as linhagens rugosas (07, 36 e 52) e *L. fermentum*, em meio de caldo de cana 16 ºBrix, pH 4,5 em ciclo único de fermentação, durante 48 horas, a 30 ºC

Em 12 horas de fermentação, quando adicionado *L. fermentum*, a eficiência fermentativa caiu de 60 para 40% quando inoculada também a levedura rugosa 07, de 40 para 30% com a levedura rugosa 36, e subiu de 20 para 40% com a levedura 52. Após 12 horas, a eficiência aumentou para cerca de 60% para as fermentações contaminadas com as leveduras rugosas 7 e 52, enquanto com a levedura rugosa 36, a eficiência permaneceu por volta de 30%. Ao final de 48 horas, não há diferenças na eficiência comparando-se as fermentações contaminadas com as leveduras rugosas, na presença ou ausência da bactéria (Figura 4C).

A Figura 5 mostra o número de micro-organismos (UFC/ mL) ao longo de 48 horas de fermentação e pode-se observar que em todas as fermentações, a variação no número de UFC da levedura PE-2 foi menor do que a variação no número de UFC dos contaminantes, comparando-se 0 e 48 horas de fermentação.

A Figura 6 traz os resultados da eficiência fermentativa média (%) para todas as fermentações dispostas de forma comparativa com a fermentação conduzida unicamente com a levedura do processo (PE-2) para mosto de caldo. Verificou-se

que a contaminação com as linhagens rugosas (07, 36 e 52) ocasionou um decréscimo significativo na eficiência fermentativa (Figuras 6A, 6B e 6C). Efeito semelhante foi verificado quando a fermentação foi contaminada com a bactéria *L. fermentum*. O efeito da contaminação com a linhagem rugosa e bactéria foi evidente quando se utilizou a linhagem rugosa 36, cuja fermentação apresentou uma eficiência fermentativa inferior às outras combinações (Figura 6B). Ocorreu uma potencialização do efeito adverso da contaminação pela rugosa quando a bactéria foi introduzida na fermentação.

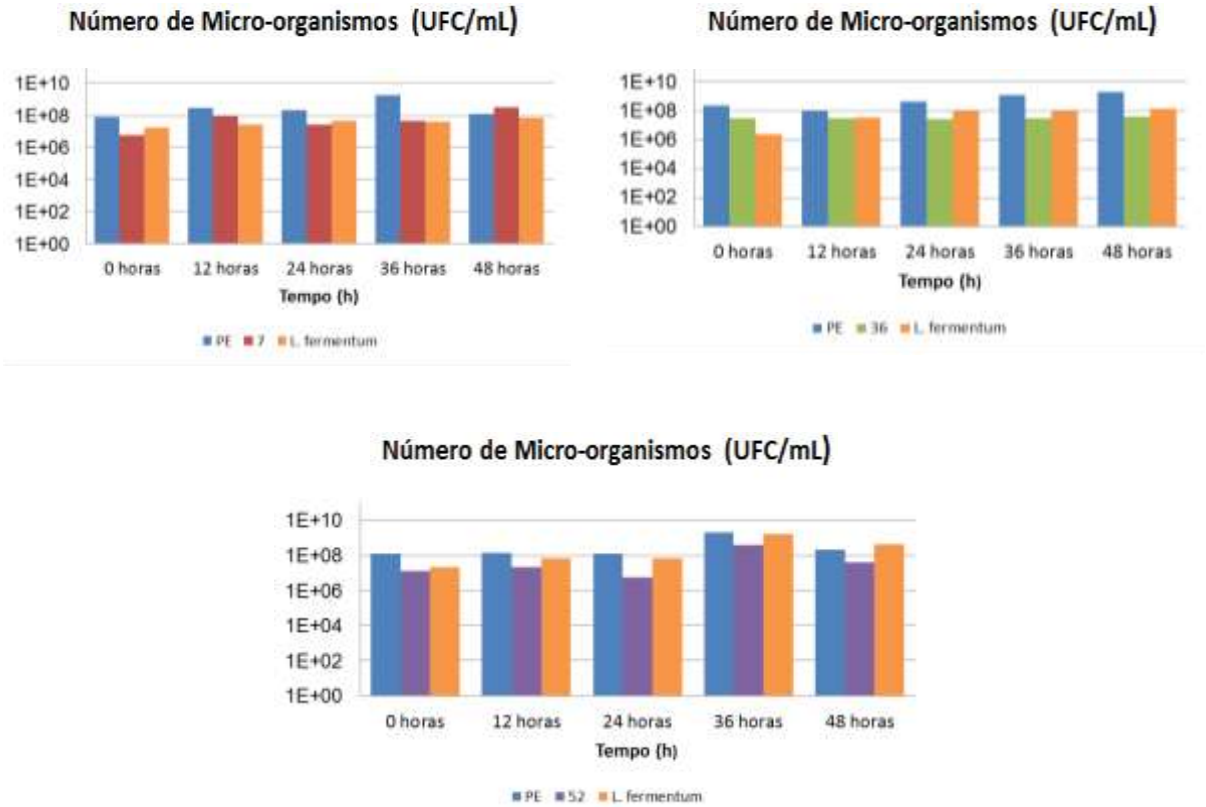


Figura 5 - Número de micro-organismos (UFC/mL) nas fermentações conduzidas pela linhagem *S. cerevisiae* PE-2 e contaminadas com as linhagens rugosas (7, 36 e 52) e *L. fermentum* em meio de caldo de cana 16 ºBrix, pH 4,5 em ciclo único de fermentação, durante 48 horas, a 30 ºC

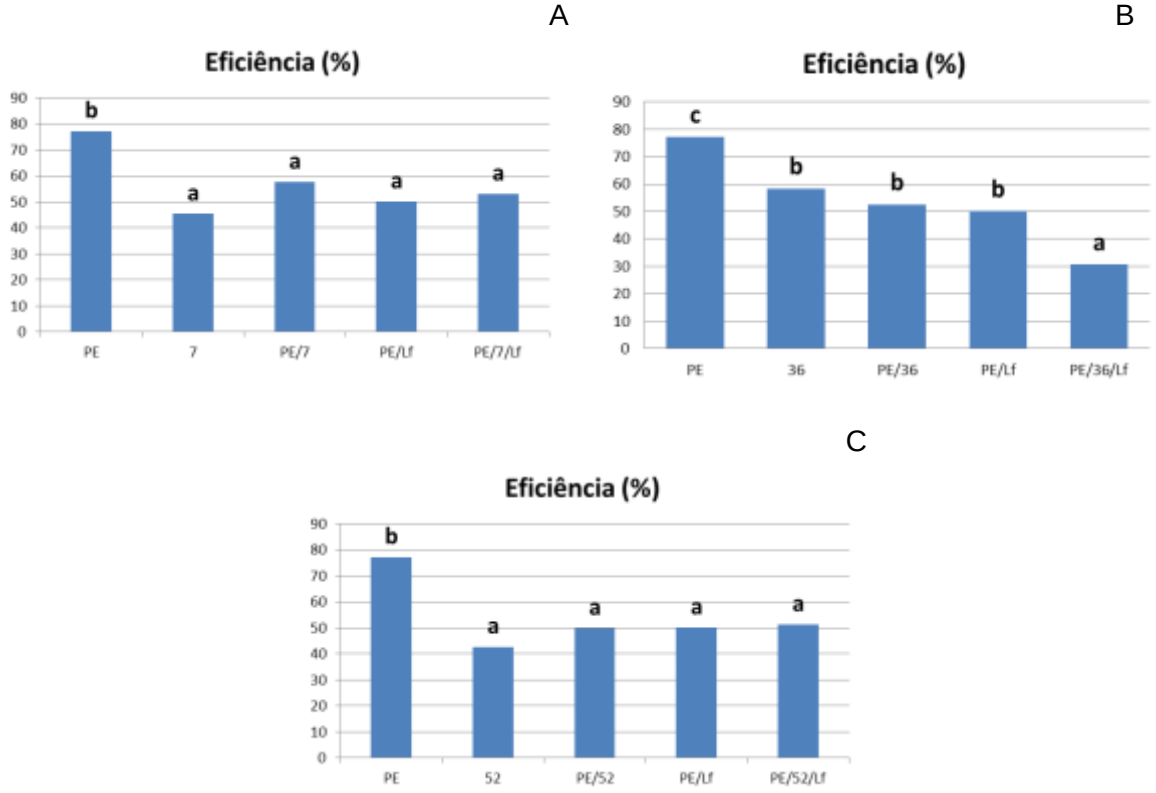


Figura 6 - Eficiência fermentativa média (%) das fermentações conduzidas pelas linhagens de *S. cerevisiae* (PE-2 e ou leveduras rugosas 07, 36 e 52), contaminadas ou não com *L. fermentum,* em meio de caldo de cana 16 ºBrix, pH 4,5 em ciclo único de fermentação, durante 48 horas, a 30 ºC. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey a 5%

Foram também realizadas fermentações de ciclo único conduzidas pela levedura PE-2 contaminadas com leveduras rugosas e ou *L. fermentum* utilizando mosto de melaço. Pode-se destacar que nesse substrato, a eficiência fermentativa decaiu bastante para a linhagem PE-2 quando comparada com mosto de caldo de cana (94,7%, Figura 1C), sendo de 33,4% nas primeiras 12 horas (Figura 7C). Isso pode ser justificado devido a vários compostos presentes em mostos a partir de melaço (compostos fenólicos) que apresentam ação antimicrobiana, e podem afetar o desempenho das leveduras (TOSETO, 2008).

O'Connor e Rubino (1991) relataram que o fenol e seus derivados apresentam diversos tipos de ação bactericida. Em altas concentrações, estes compostos penetram e rompem a parede celular, precipitando as proteínas celulares. Entretanto, em baixas concentrações, os fenóis e seus derivados inativam o sistema de enzimas essenciais. Martin e Jonsson (2003) compararam a resistência de onze cepas (industrial e laboratório) de *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces* a

inibidores da fermentação utilizando hidrolisados lignocelulósicos. Os autores prepararam um coquetel inibidor, em diferentes concentrações, contendo dois ácidos alifáticos, dois formaldeídos e dois compostos fenólicos. Concluíram que dentro de uma mesma espécie, existe uma cepa que era mais resistente ao coquetel inibidor, tendo uma redução no rendimento em etanol de 10% em presença do coquetel inibidor na concentração de 100%, enquanto que a cepa mais sensível não produziu etanol na presença de 25% do coquetel inibidor. No entanto, as linhagens rugosas (07, 36 e 52) apresentaram eficiência fermentativa similar em ambos os substratos (Figura 1C e 7C).

Verificou-se também que as linhagens de leveduras cresceram mais em melaço que em caldo, com exceção da linhagem rugosa 52 (Figuras 1D e 7D). O consumo de ART foi mais rápido em melaço que em caldo para todas as linhagens (Figura 7B). Este resultado pode sugerir que o melaço, por possuir maior teor de açúcar redutor – glicose e frutose - que o caldo (Tabela 1), proporcione maior crescimento (aumento no número de UFC) em detrimento à fermentação, o que acaba influenciando a eficiência fermentativa.

Quando o substrato utilizado foi o melaço, não houve diferença entre as fermentações conduzidas pela levedura PE-2 e contaminadas ou não com as leveduras rugosas, com valores próximos a 50% de eficiência. Quando a contaminação foi com *L. fermentum,* a eficiência fermentativa foi inferior (Figura 8C). Com estes resultados, pode-se verificar que o substrato pode influenciar o desenvolvimento das contaminações, uma vez que houve diferença nos resultados da fermentação não contaminada entre caldo e melaço, apresentando valores menores de teor alcoólico em melaço. A eficiência fermentativa das fermentações contaminadas foi menor em melaço que em caldo (Figura 8C).

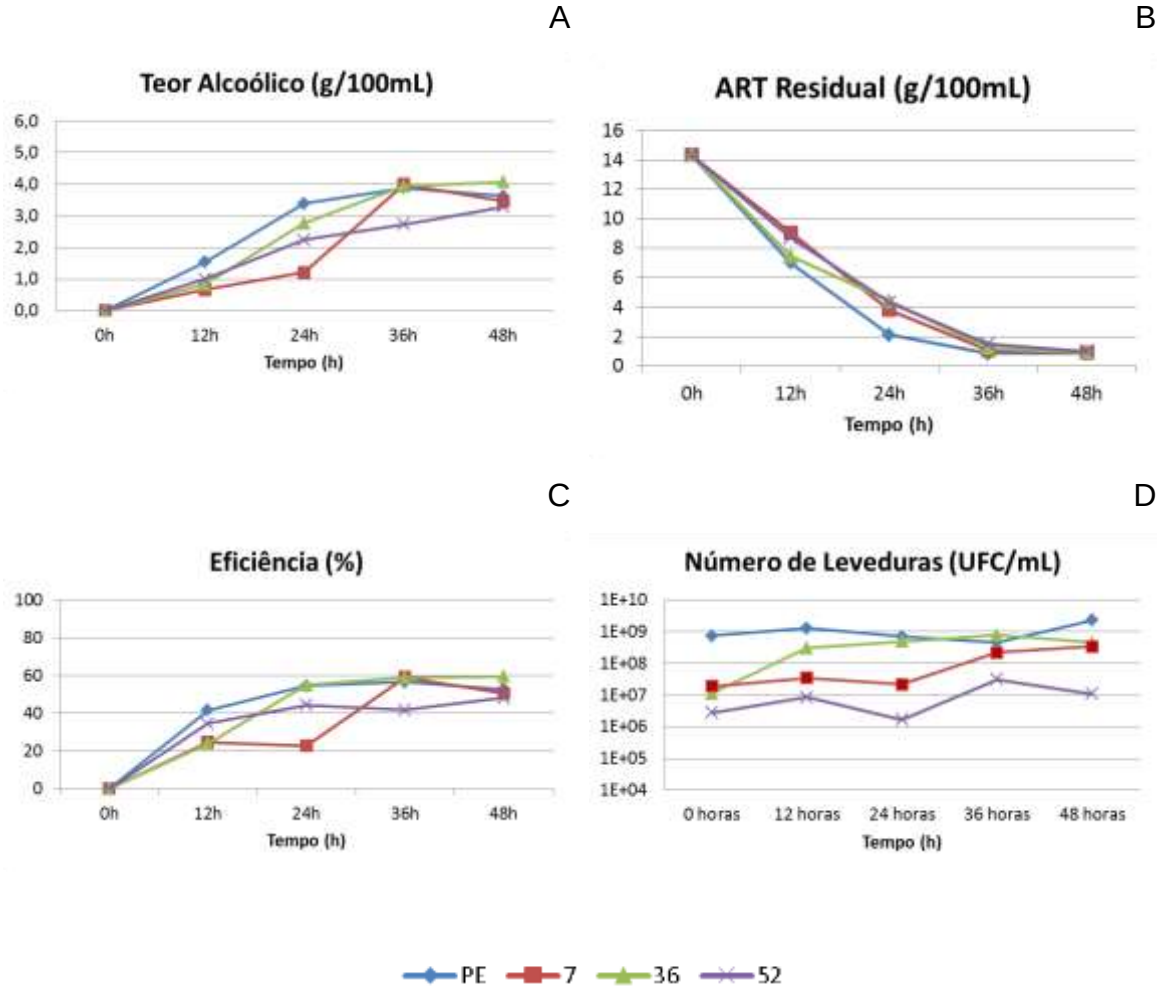


Figura 7 - Teor alcoólico (g/100 mL), ART residual (g/100 mL), eficiência fermentativa (%) e número de leveduras (UFC/mL) nas fermentações com culturas puras das linhagens de *S. cerevisiae* PE-2, e rugosas (07, 36 e 52) em meio de melaço 16 ºBrix, pH 4,5, em ciclo único de fermentação, durante 48 horas, a 30 ºC

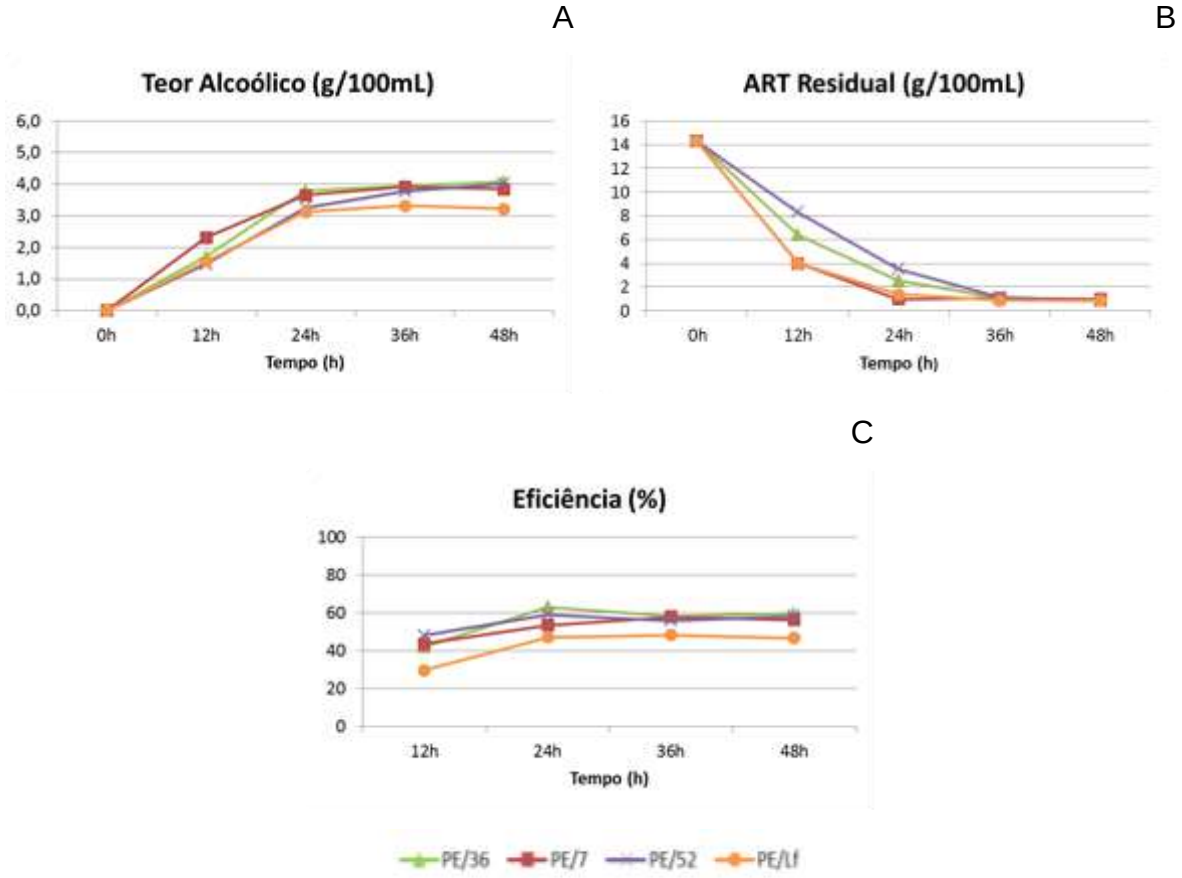


Figura 8 - Teor alcoólico (g/100 mL), ART residual (g/100 mL) e eficiência fermentativa das fermentações conduzidas pela linhagem de *S. cerevisiae* PE-2 e contaminadas com as linhagens rugosas (07, 36 e 52) ou *L. fermentum*, em meio de melaço 16 ºBrix, pH 4,5 em ciclo único de fermentação, durante 48 horas, a 30 ºC

Os resultados dos plaqueamentos se encontram na Figura 9. De uma forma geral, as leveduras cresceram bem em substrato de melaço, destacando-se também a bactéria *L. fermentum*, a qual apresentou maior crescimento em melaço que em caldo de cana (Figura 3D).

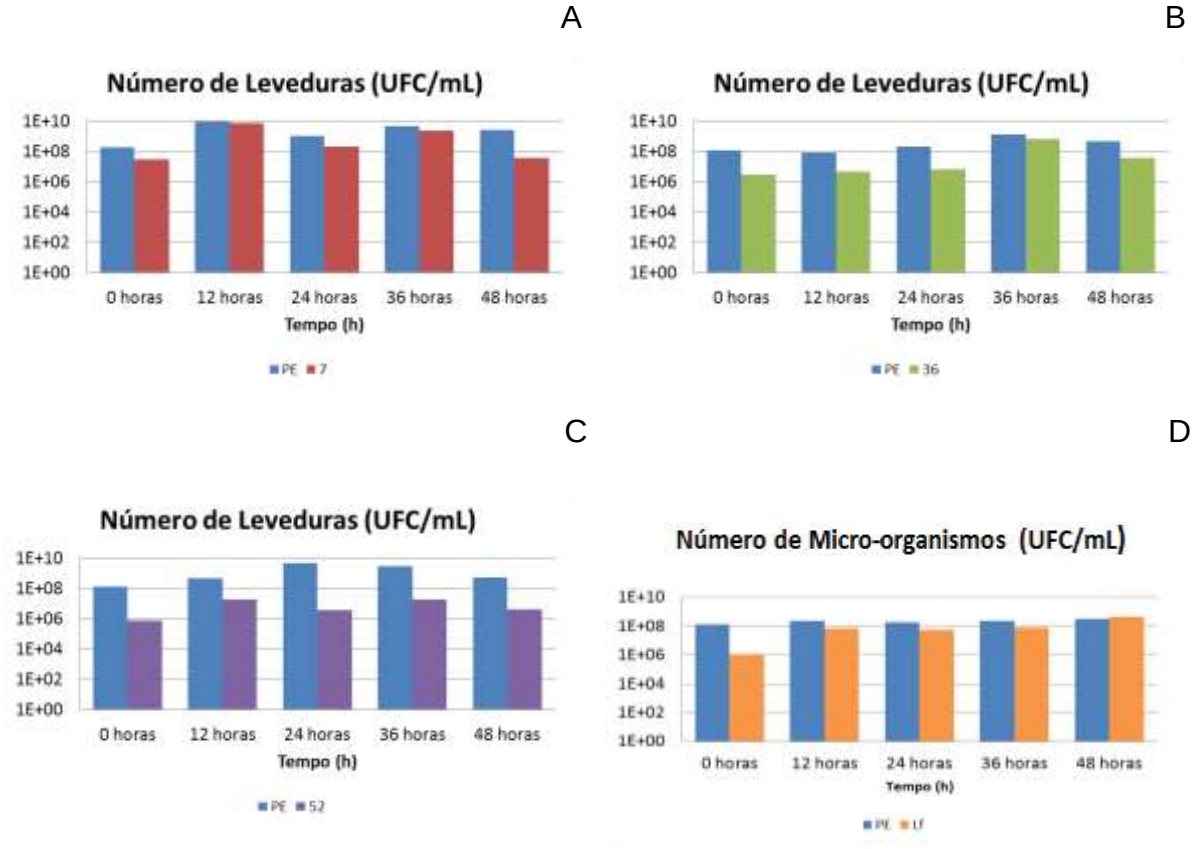


Figura 9 - Número de micro-organismos (UFC/mL) nas fermentações conduzidas pela linhagem *S. cerevisiae* PE-2 e contaminadas com as linhagens rugosas (7, 36 e 52) ou *L. fermentum* em meio de melaço 16 ºBrix, pH 4,5 em ciclo único de fermentação, durante 48 horas, a 30 ºC

A Figura 10 demonstra os resultados das fermentações contaminadas com dois micro-organismos, a levedura rugosa e a *L. fermentum* (PE-2 + 36 + *L. fermentum*; PE-2 + 07 + *L. fermentum*; PE-2 + 52 + *L. fermentum*) em mosto de melaço. Não há diferenças na produção de álcool e eficiência fermentativa entre as fermentações contaminadas com as leveduras rugosas e *L. fermentum*, ao final de 48 horas de fermentação. Com a levedura 36, a produção de etanol foi mais lenta, mas não houve diferença ao final do tempo de fermentação em relação às demais fermentações (Figura 10C).

Quanto ao crescimento (Figura 11), não houve diferença no crescimento das leveduras e bactéria em caldo e melaço. Todas as linhagens de micro-organismos cresceram durante as 48 horas de fermentação, destacando-se a bactéria *L. fermentum*, a qual cresceu mais em melaço que em caldo (Figura 5D e 11D).

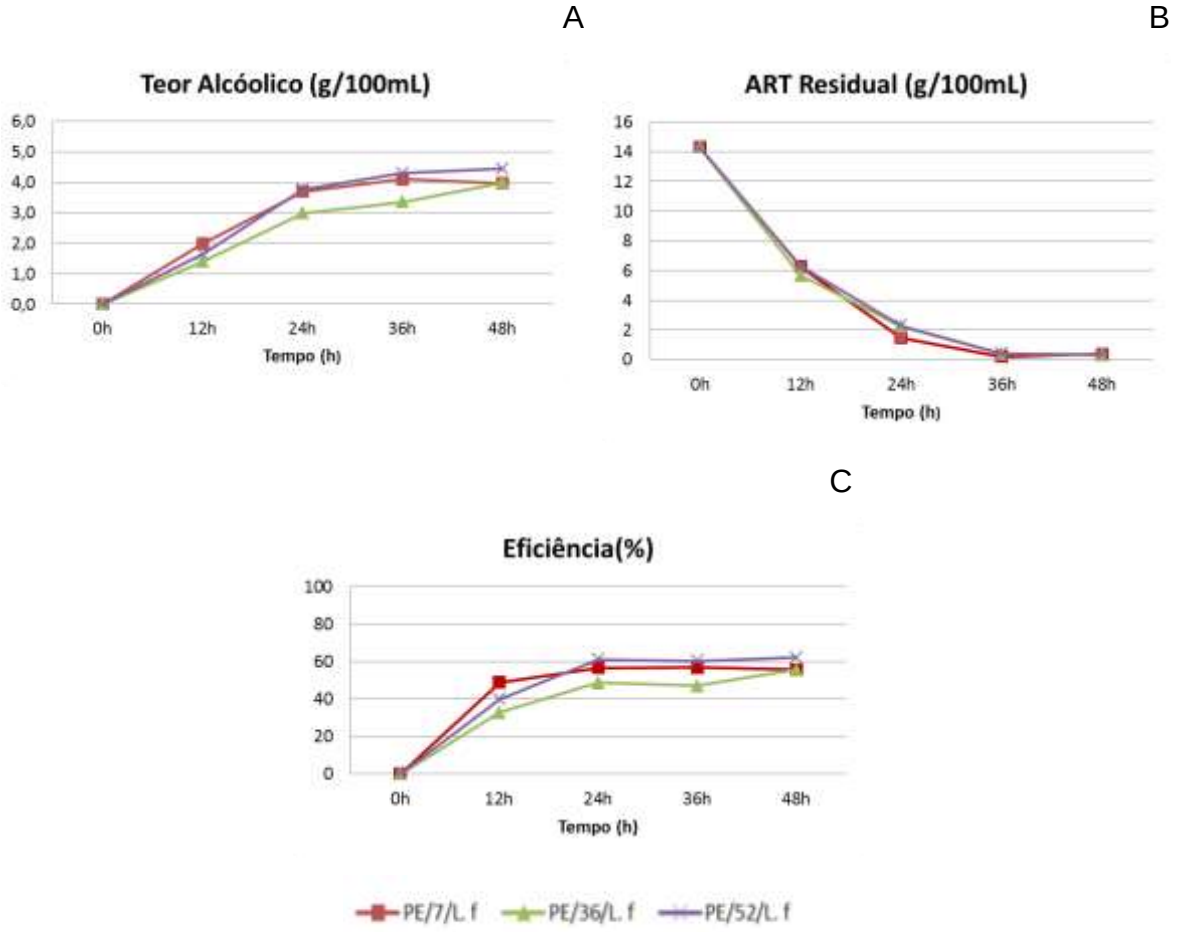


Figura 10 - Teor alcoólico (g/100 mL), ART residual (g/100 mL) e eficiência fermentativa das fermentações conduzidas pela linhagem de *S. cerevisiae* PE-2 e contaminadas com as linhagens rugosas (07, 36 e 52) e *L. fermentum*, em meio de melaço 16 º Brix, pH 4,5 em ciclo único de fermentação, durante 48 horas, a 30 ºC

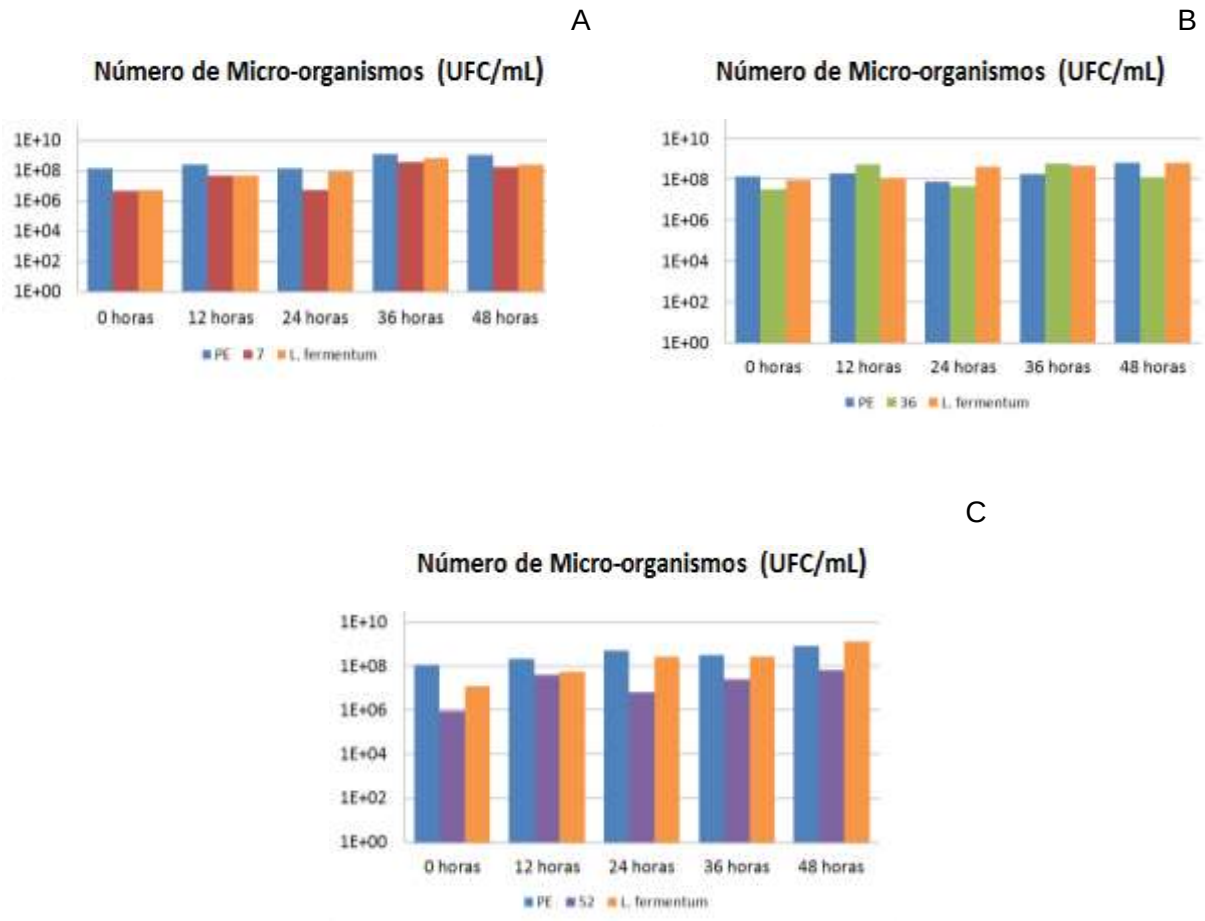


Figura 11 - Número de micro-organismos (UFC/mL) nas fermentações conduzidas pela linhagem *S. cerevisiae* PE-2 e contaminadas com as linhagens rugosas (7, 36 e 52) e *L. fermentum* em meio de melaço 16 ºBrix, pH 4,5 em ciclo único de fermentação, durante 48 horas, a 30 ºC

Não se verificou diferença significativa na eficiência fermentativa entre as fermentações contaminadas e não contaminada, utilizando mosto de melaço (Figura 12). A levedura do processo teve um desempenho fermentativo muito inferior em melaço quando comparado com o caldo. Com as linhagens rugosas este efeito não foi tão significativo, de forma que as contaminações com leveduras rugosas e ou *L. fermentum* apresentaram maior impacto sobre o rendimento fermentativo quando o substrato foi caldo e não melaço.

Pelos resultados obtidos verificou-se que há um efeito diferenciado do substrato sobre as fermentações quando em situação de contaminação por leveduras rugosas e ou *L. fermentum*. É preciso investigar a razão pela qual a levedura PE-2 não teve um desempenho fermentativo satisfatório em melaço, o que pode ser também atribuído à quantidade e tipo de fonte de nitrogênio presente no melaço. Em caldo, está presente o nitrogênio amoniacal, porém, em melaço a fonte de nitrogênio

parece não ser esta (VASCONCELOS, 1987).

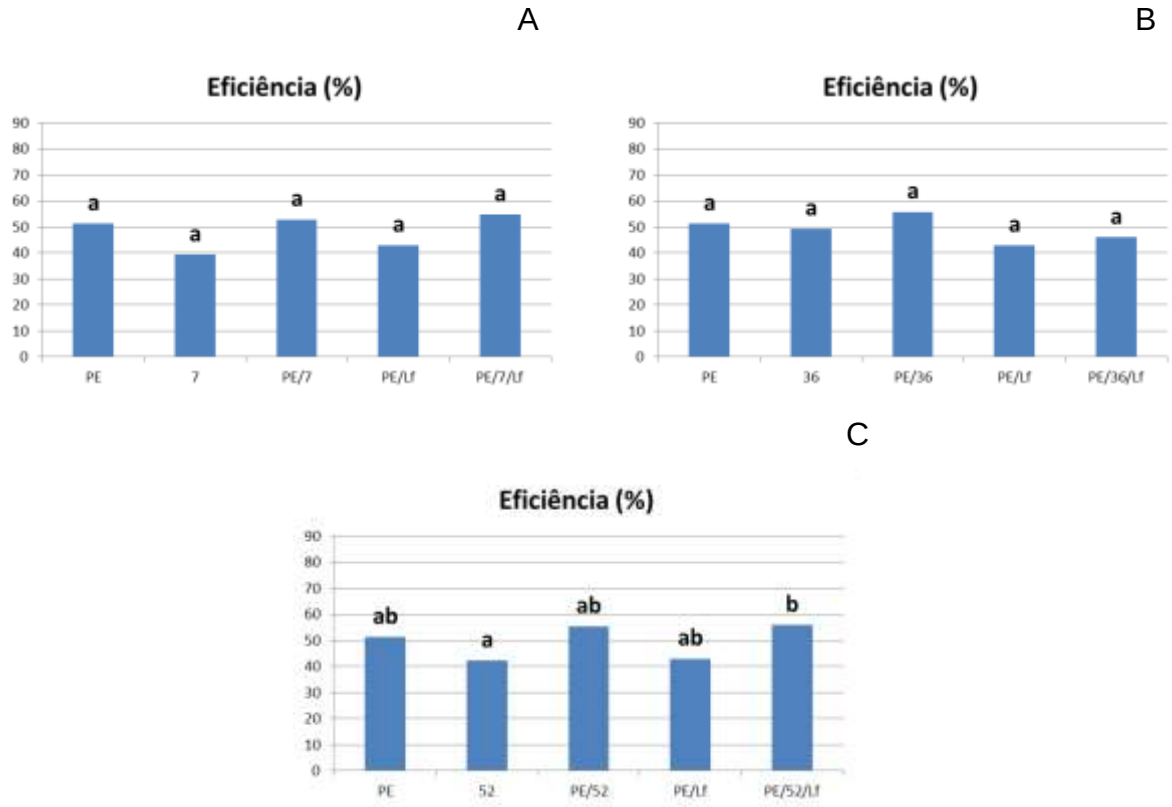


Figura 12 - Eficiência fermentativa média (%) das fermentações conduzidas pelas linhagens de *S. cerevisiae* (PE-2 e ou leveduras rugosas 07, 36 e 52), contaminadas ou não com *L. fermentum,* em meio de melaço 16 ºBrix, pH 4,5 em ciclo único de fermentação, durante 48 horas, a 30 ºC. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey a 5%

Quanto à bactéria *L. fermentum*, estudos apontaram o efeito prejudicial à fermentação, reduzindo o rendimento alcoólico e a viabilidade de *S. cerevisiae* (OLIVA-NETO; YOKOYA, 1994; NARENDRANATH et al., 1997; THOMAS et al., 2001). Uma possível explicação para o efeito deletério desta bactéria na fermentação é o fato dela ser heterofermentativa (BASSO et al., 2014), convertendo glicose em ácido lático, etanol e gás carbônico. No presente trabalho não foi verificada a diminuição no número de UFC da levedura do processo quando a fermentação estava contaminada por *L. fermentum*. Ambas se desenvolveram normalmente independentemente da presença da outra. A manutenção da população em níveis elevados, uma vez que foram utilizadas altas concentrações iniciais dos contaminantes (10^6-10^7 UFC/mL), pode ter desviado açúcar para outros fins que não o da produção de etanol, impactando o rendimento fermentativo.

Os resultados obtidos em caldo e melaço para cada uma das fermentações realizadas, contaminadas ou não com as leveduras *S. cerevisiae* rugosas e *L. fermentum*, foram dispostos de forma comparativa na Figura 13, com relação ao parâmetro eficiência fermentativa. Pode-se observar que tanto a contaminação com a levedura rugosa quanto com a bactéria *L. fermentum* teve prejuízo à fermentação; que o substrato teve influência sobre a fermentação e o desenvolvimento das contaminações, pois as fermentações contaminadas com as leveduras rugosas tiveram eficiência mais alta em melaço que em caldo, com exceção da contaminação com a linhagem rugosa 7; que as fermentações contaminadas com *L. fermentum* apresentaram menor eficiência em melaço; e que o efeito da contaminação conjunta da bactéria com a levedura rugosa dependeu da linhagem de levedura rugosa utilizada e do substrato, sendo mais prejudicial à fermentação a contaminação da levedura rugosa 36 associada à *L. fermentum,* em ambos os substratos. Dessa forma, verificou-se que o tipo de substrato interferiu com o desenvolvimento das contaminações por leveduras rugosas associadas ou não à *L. fermentum.*

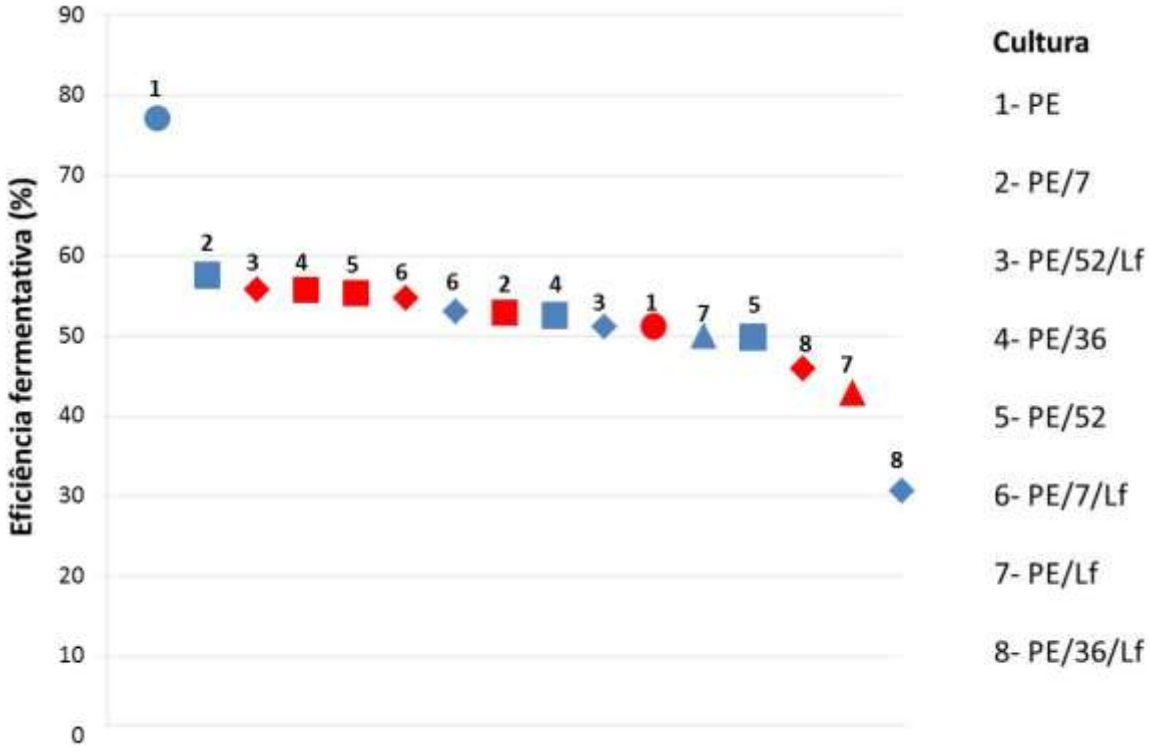


Figura 13 - Comparação entre os valores de eficiência fermentativa média (%) obtidos nas fermentações conduzidas com a levedura industrial PE-2 (círculo) e contaminadas com as leveduras rugosas 7, 36 e 52 (quadrado) ou com a bactéria *L. fermentum* (triângulo), ou com ambas (losango), em substrato caldo de cana (em azul) e melaço (em vermelho). Os valores de eficiência foram dispostos em ordem decrescente, da esquerda para a direita

3.5 Conclusões

O substrato de fermentação, caldo de cana ou melaço, teve influência sobre a fermentação e o desenvolvimento das contaminações, pois as fermentações contaminadas com as leveduras rugosas tiveram eficiência mais alta em melaço que em caldo, com exceção da contaminação com a linhagem rugosa 7. As fermentações contaminadas com *L. fermentum* apresentaram menor eficiência em melaço, e nas fermentações contaminadas com ambos os micro-organismos (levedura rugosa e bactéria), somente verificou-se diminuição significativa na eficiência fermentativa com a linhagem rugosa 36, em ambos os substratos. Verificou-se que o tipo de substrato interferiu com o desenvolvimento das contaminações por leveduras rugosas associadas ou não à *L. fermentum.*

Referências

AMORIM, H.V. **Introdução à bioquímica da fermentação alcoólica**. Araras: IAA/ Coordenadoria Regional Sul, 1997. 95p.

AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; OLIVEIRA, J.V.D.; BUCKERIDGE, M.S.; GOLDNAM, G.H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.91, p.1267-1275, 2011.

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

CEBALLOS-SCHIAVONE, C.H.M. **Tratamento térmico do caldo de cana-de-açúcar visando a redução de contaminantes bacteriano- *Lactobacillus*- na produção de etanol e eficiência de tratamento do fermento por etanol.** 2009. 177p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” USP, Piracicaba, 2009.

LIMA, M.C.S.; SILVA, F.L.A.; LEITE, A.L.; SANTOS, F.J.A.L.; SILVA, A.C.P.; BARBOSA-NETO, A.G.; BRASILEIRO, B.T.R.V. Influência do reciclo de fermento na capacidade fermentescível de melaço. In: I CONICBIO / II CONABIO / VI SIMCBIO (v.2) Universidade Católica de Pernambuco - Recife – PE, 2013. 1142

MARQUES, A.S. **Estudo da influência da complementação de nutrientes no mosto sobre o processo de fermentação alcoólica em batelada.** 2008. 95p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió-AL, 2008.

MARTIN, C.; JONSSON, L.J. Comparison of the resistance of industrial and laboratory strains of *Saccharomyces* and *Zygosaccharomyces* to lignocelluloses derived fermentation inhibitors. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.32, p.386-395, 2003.

MEZAROBA, S.; MEGUETTI, C.C.; GROFF, A.M. Processos de produção do açúcar de cana e os possíveis reaproveitamentos dos subprodutos e resíduos resultantes do sistema. In: ENCONTRO DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO AGROINDUSTRIAL, 4., 2010. Campo Mourão-PR. **Anais...** Campo Mourão-PR: FECILCAM. 2010. 115p.

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

NARENDRANATH, N.V.; HYNES S.H.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. Effects of *Lactobacillum* on yeast catalyzed ethanol fermentations. **Applied and Environmental Microbiology,** Bayreuth**,** v.63, p.4158-4163, 1997.

OLIVA-NETO; P.; YOKOYA, F. Evoluation of bacterial contamination in fed-batch alcoolic fermentation process. **World Journal of Microbiology and Biotechology,** Hull, v.10, p.697-699, 1994.

O'CONNOR, D.O.; RUBINO, J.R. Phenolic compounds. In: BLOCK, S.S. (Ed.). **Disinfection, Sterilization and Preservation**. 4 th ed. Philadelphia/London: Lea & Febiger, 1991. p.204-224.

PEREIRA, L.F.; LUCATTI, E.; BASSO, L.C.; MORAIS JR, M.A. The fermentation of sugarcane molasses by *Dekkera bruxellensis* and the mobilization of reserve carbohydrates. **Antonie van Leeuwenhoek,** Dordrecht, v.105, n.3, p.481-489, 2014.

SOUZA, C.S. **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae***. 2009. 136p.Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto Butantan-Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo, 2009.

REIS, V.R.; BASSI, A.P.;G.; SILVA, J.C.G.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts exhibiting rough colonies and pseudohyphal morphology with respect to alcoholic fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology,** São Paulo, v.44, n.4, p.1121-1131, 2013.

THOMAS, K.C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Effect of *Lactobacilli* on yeast growth, viability in batch and semi continuous alcoholic fermentation of corn mash. **Journal of Applied Microbiology,** Oxford, v.90, n.3, p.819-828, 2001.

TOSETTO, G.M. **Comportamento de linhagens industriais de Saccharomyces frente a compostos inibitórios presentes no melaço de cana-de-açúcar na produção de bioetanol.** 2008. [s.n]. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, 2008.

VASCONCELOS, J.N. Influência da complementação de nutrientes nitrogenados e fosfatados sobre o processo de fermentação alcoólica industrial**. Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v.4, 5 /6, n.105, p.41– 48, 1987.

VENTURINI FILHO, W.G.; BRUNELLI, L.T.; TONIATO, J.; NOJIMOTO, T.; NOVAES, F.V. Método simples para quantificar o metabolismo aeróbio e anaeróbio de levedura alcoólica. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v.31, n.2, p.227-236, 2013.

4 EFEITO DO TRATAMENTO CELULAR SIMPLES E COMBINADO BASEADO EM BAIXO PH E ETANOL PARA O CONTROLE DO CRESCIMENTO DE LEVEDURAS SELVAGENS *Saccharomyces cerevisiae* E DA BACTÉRIA *Lactobacillus fermentum*

Resumo

Uma das principais preocupações na indústria sucro-alcooleira é combater os micro-organismos contaminantes, representados pelas bactérias e leveduras que se instalam no processo e causam queda no rendimento. O objetivo desse trabalho foi propor modificações no tratamento ácido do fermento, realizado entre os ciclos fermentativos na indústria, para o controle do crescimento de linhagens rugosas de *Saccharomyces cerevisiae* e da bactéria *Lactobacillus fermentum*, em comparação com a levedura *S. cerevisiae* do processo (PE-2). Foram avaliados a adição de etanol à solução ácida (pH 2,0), o abaixamento do pH da solução ácida e um tratamento com metabissulfito de potássio (200 mg/L, pH 4,5) sobre o número de UFC das leveduras e bactéria. Não houve um tratamento único capaz de controlar todas as linhagens rugosas testadas. Para a linhagem rugosa 52, a adição de 13% de etanol ao tratamento ácido (pH 2,0), foi a melhor opção de controle do crescimento. Para a levedura 07, a sugestão foi de abaixamento do pH do tratamento ácido de 2,0 para 1,5 para o controle do crescimento da levedura rugosa. A levedura PE-2 foi pouco afetada pelos tratamentos acima indicados, mostrando haver um efeito seletivo do tratamento ácido combinado ou não com etanol sobre as linhagens rugosas. A bactéria *L. fermentum* teve seu crescimento afetado em todas as condições testadas. Nenhum dos tratamentos utilizados teve efeito sobre a linhagem rugosa 36.

Palavras-chave: Tratamento ácido; Metabissulfito; Etanol

Abstract

A major concern in the ethanol industry is fighting the contaminating microorganisms, represented by bacteria and yeasts that are installed in the process and cause decrease in the ethanol yield. The aim of this study was to propose changes in the acid treatment of yeast, applied between the fermentation cycles in the industry, to control the growth of rough strains of *Saccharomyces cerevisiae* and the bacteria *Lactobacillus fermentum*, compared with the industrial strain of *S. cerevisiae* (PE -2). The addition of ethanol to the acid solution (pH 2.0), the lowering of the pH of the acid solution and a treatment with potassium metabisulphite (200 mg/L, pH 4.5) over the CFU of the yeasts and bacteria were evaluated. There was not a single treatment capable of controlling the growth of all microorganisms. For the rough yeast strain 52, adding 13% ethanol to the acid treatment (pH 2.0 was the best option to control growth. For the rough yeast strain 7, the suggestion was the decrease of the pH of the acid treatment from 2.0 to 1.5 to control the growth of the rough yeast. The industrial strain PE-2 was little affected by the treatments above, showing a selective effect of the acid treatment combined or not with ethanol over the rough yeast strains. The bacteria *L. fermentum* bacteria had its growth affected in all conditions tested. None of the treatments had effect on the rough yeast strain 36.

Keywords: Acid treatment; Metabisulphite; Ethanol

4.1 Introdução

A contaminação por micro-organismos é um fato comprovado na maioria das usinas produtoras de álcool do país, nas quais o problema pode ser agravado em razão do processo utilizado, que fornece as condições ideais de desenvolvimento desses micro-organismos. As pesquisas aplicadas à fermentação alcoólica tem se concentrado, preferencialmente, em problemas relativos às contaminações bacterianas, permanecendo as infecções por leveduras selvagens (leveduras que não foram inoculadas na fermentação), pouco estudadas e conhecidas.

Se para o controle da contaminação bacteriana é possível a utilização de agentes antimicrobianos, o mesmo não pode ser dito em relação às leveduras selvagens ou “invasoras”. As linhagens rugosas de *S. cerevisiae* que apresentam pseudohifas são difíceis de serem manejadas quando presentes nas dornas de fermentação. A procura por características/fatores que permitam atingir somente um dos biótipos, preservando o outro, é um trabalho difícil. Reis (2011), estudando a resistência ao estresse por temperatura, pH, etanol e concentração de açúcar, em linhagens de *S. cerevisiae* que apresentam colônias mucosas ou colônias rugosas, verificou que as linhagens mucosas tiveram maior resistência à acidez do meio, enquanto as linhagens rugosas foram mais resistentes às concentrações elevadas de etanol e açúcar. Alterações na etapa do tratamento do fermento, o qual é baseado em baixo pH, poderiam levar a um efeito seletivo sobre as linhagens rugosas de *S. cerevisiae,* sem afetar consideravelmente a levedura de processo.

O objetivo principal desse trabalho foi propor alterações no tratamento do fermento a fim de controlar o crescimento da levedura contaminante (linhagens rugosas) sem afetar a levedura do processo. As alterações estudadas foram o abaixamento do pH do tratamento ácido (normalmente em torno de 2,0), a adição de etanol à solução ácida ou utilização de metabissulfito de potássio em substituição ao tratamento ácido, dependendo da resposta apresentada pelas linhagens testadas.

4.2 Revisão Bibliográfica

O potencial hidrogeniônico do meio é um fator muito importante para a produção etanólica, tanto para o crescimento da levedura, taxa de fermentação e formação de produtos, quanto para o controle da contaminação bacteriana (ALVES, 1994). As bactérias são menos resistentes ao pH baixo e tem menor velocidade de crescimento que as leveduras em tal situação. Ceballos-Schiavone (2009) realizou testes com diferentes valores de pH (2,5 e 6,0) e concentrações de etanol (15, 20, 25, 30 e 35%) com o intuito de controlar diferentes espécies de *Lactobacillus*, verificando que essas bactérias se mostraram sensíveis às concentrações superiores a 20% (v/v) de etanol, não sendo observado efeitos negativos sobre as células de leveduras quando utilizadas as concentrações de 20 a 25% (v/v). Em pH 2,5, concentração de 20% v/v e 90 minutos de tratamento, a contagem da bactéria foi próxima de zero (36 UFC/mL), chegando a zero em 120 minutos. Para o pH 6,0, os valores de contagem chegaram próximo de zero (0,77 UFC/mL) em concentração de 25% v/v no tempo de 90 minutos, também chegando a zero a 120 minutos.

Enquanto que para as bactérias láticas o pH ideal é na faixa de 6,0, a levedura *S. cerevisiae* apresenta um bom rendimento na produção alcoólica em pH acima de 3,8 (KANDLER; WEISS, 1986). A compreensão do efeito inibitório de vários agentes, como pH, etanol e sulfito no metabolismo de *S. cerevisiae* durante a fermentação etanólica é extremamente necessário para melhorar a tecnologia de produção. Também se faz importante entender como esses fatores inibidores afetam o metabolismo dessa linhagem sinergisticamente, já que isso ocorre em escala industrial. O pH e a acidez podem afetar a bomba de prótons e outras funções celulares, tais como a absorção de nutrientes. O sulfito pode ter um efeito inibitório sobre o metabolismo de consumo de açúcar e o etanol, pode tornar-se tóxico para a célula de levedura (OLIVA-NETO et al., 2013).

Segundo Cooney (1981), as linhagens de *S. cerevisiae* toleram ampla variação de pH, crescendo entre os limites de 2,5 a 8,5. O valor ótimo de pH para essa levedura aproxima-se de 4,5. O pH interno das células de *S. cerevisiae* mostra-se relativamente independente do pH externo, mantendo-se entre 5,8 e 6,3, mesmo quando o pH do meio varia entre 3,0 a 7,0 (JONES; PAMMENT; GREENFIELD, 1981). Segundo Souza, Trópia e Brandão (2001), a enzima H+-ATPase da membrana plasmática de *S. cerevisiae* controla um importante processo fisiológico.

Por meio da bomba de prótons, tal enzima regula o pH intracelular e promove a força motora para a absorção de nutriente. Uma característica marcante desta enzima é o fato desta ser ativada em presença de glicose, causando acidificação interna e aumentando o nível de sua atividade em células de leveduras (BECHER DOS PASSOS et al., 1992; SOUZA; TRÓPIA; BRANDÃO, 2001). A levedura para evitar que seu meio interno se torne muito ácido, libera H+ para o meio externo através da ativação de H+ -ATPase, além de absorver K+ e aminoácidos básicos, excretar ácidos orgânicos e liberar gás carbônico (COOTE; KIRSOP, 1976). A H+ -ATPase plasmática sofre alterações conformacionais em função do H+ (BLANPAIN et al., 1992), assim, em pH igual a 4,0 a atividade da enzima é triplicada, dobrando a afinidade por ATP, porém sem causar mudanças no pH ótimo, 6,0 (ERASO; GANCEDO, 1987).

O sulfito de sódio no processo industrial é incorporado ao melaço-de-cana na faixa de 200 a 700 mg/L (OLIVA-NETO; YOKOYA, 2001), formando algumas vezes mostos com até 300 mg SO_2/L, especialmente quando envolve a presença de caldo sulfitado da fábrica de açúcar. O tratamento com sulfito é a maneira mais comum de prevenir a deterioração do mosto de uva na vinificação, pois a levedura *S. cerevisiae* é particularmente resistente a esta substância. O metabissulfito de potássio (MBP) é um aditivo comum utilizado na indústria de alimentos, sendo que em soluções aquosas, ocorre um equilíbrio complexo de acordo com a sua concentração, pH e temperatura (FAVERO; RIBEIRO; AQUINO, 2011). Segundo a literatura, o dióxido de enxofre é uma substância muito reativa e sua ação inibitória está diretamente relacionada com o pH, já que se caracteriza por duas constantes de dissociação. Entre os valores de pH mais baixos, coexistem as formas bissulfito (HSO^{-3}) e dióxido de enxofre (SO_2), com pK1 = 1,77, enquanto entre valores de pH 5,0 e 9,0, há uma composição mista de bissulfito e sulfito (SO_3^{-2}), sendo o pK2 = 6,9. Uma vez que o pH da fermentação é baixo, na faixa ácida, parte do sulfito encontra-se na forma mais tóxica (SO_2) na ausência de oxigênio. O SO_2 é transportado para o interior da célula, entretanto, converte-se nas outras duas formas, devido o ambiente interno ser caracterizado por valor de pH próximo a 6 (CARR; PATRICIA; SPARKS, 1976; CARTWRIGHT, 1989).

Bassi et al. (2015) avaliaram o efeito da adição de metabissulfito de potássio sobre *S. cerevisiae* e *Dekkera bruxellensis* no processo fermentativo durante a fermentação em reciclos fermentativos. Adicionando-se 250 mg/L de metabissulfito

na fermentação, houve um controle do crescimento de *D. bruxellensis* quando comparado com a população de *D. bruxellensis* em co-cultura sem a adição do produto, onde ocorreu um aumento significativo de 100 vezes nos dois últimos ciclos de 12 horas de fermentação.

O etanol pode tornar-se tóxico para a célula de levedura (GHOOSE; TYAGI, 1979; BEAVEN; CHARPENTIER; ROSE, 1982). A tolerância a altas concentrações de etanol é dependente da linhagem, sendo que para a maioria das linhagens tolerantes, a concentração máxima de etanol que permite o crescimento é de 10% p/v (JONES; PAMMENT; GREENFIELD, 1981). Segundo Zech; Gorisch (1995), a invertase de *S. cerevisiae* sofre inativação de até 100% quando submetida a altas concentrações de álcool (acima de 8% v/v).

O lugar de ação do etanol é na parte fosfolipídica das membranas, onde se liga no interior hidrofóbico causando enrijecimento, e conseqüentemente, acarretando distúrbios dos sistemas de transportes (LOUREIRO-DIAS; PEINADO, 1982). Além disso, diminui a capacidade de seletividade da membrana plasmática, permitindo a saída de constituintes celulares e a entrada passiva de prótons, reduzindo assim, o potencial de membrana e por fim interferindo em todos os sistemas que requeiram força protomotiva. Tal descontrole celular acaba resultando em deficiências nutricionais, o que intensifica a inibição alcoólica (INGRAM, 1985). Bassi et al. (2013) testaram um tratamento combinado pH 2,0 e 13% etanol no controle de *Dekkera bruxelensis* e concluíram que o tratamento não afetava a levedura PE-2, mas significativamente inibia o desenvolvimento da levedura contaminante.

Verificar o efeito do baixo pH associado ou não com etanol e o efeito do metabissulfito de potássio sobre as linhagens rugosas de *S. cerevisiae* e bactéria *L. fermentum*, é portanto, o objetivo principal desse trabalho, procurando modificar a etapa do tratamento celular realizado entre os ciclos de fermentação visando o controle do crescimento dos contaminantes e o mínimo efeito sobre a levedura do processo.

4.3 Material e Métodos

4.3.1 Micro-organismos

Foram utilizadas as seguintes linhagens de *S. cerevisiae:* PE-2 como levedura de processo, e as linhagens rugosas 07, 36 e 52 (CCT7789, CCT7788 e CCT7787, respectivamente) além da linhagem da bactéria *L. fermentum* CCT5852 (ATCC 19255). As linhagens pertencem ao banco de culturas do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM), CCA/UFSCar – *Campus* de Araras.

4.3.2 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado da seguinte forma: em erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de multiplicação (caldo de cana 4° Brix), foram colocadas duas alçadas dos micro-organismos separadamente. Os frascos foram levados ao agitador a 30°C e 160 rpm por 12 horas. Em seguida, o material foi centrifugado por cinco minutos a 3400 rpm, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas uma vez com água destilada estéril. Após a lavagem, as células foram ressuspendidas em água e foi realizada a quantificação através da densidade ótica em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm, utilizando-se uma curva padrão correlacionando UFC/mL X Absorbância para cada micro-organismo, padronizando-se em ~10^8-10^9 UFC/mL (Anexo 1).

4.3.3 Tratamento celular baseado em baixo pH

Um volume de 5 mL de massa celular foi ressuspendido em solução de ácido sulfúrico esterilizada (pH 1,0, 1,5 ou 2,0), em um volume final de 50 mL em erlenmeyers de 125 mL. Os frascos (em duplicata) foram levados ao agitador a 30 °C, 160 rpm por 2 horas. Em seguida as células foram separadas da solução ácida por centrifugação, lavadas com água destilada estéril duas vezes e inoculadas em meio de caldo de cana 4 ºBrix, incubação a 30 °C e 160 rpm por 8 horas.

Foram retiradas amostras da massa celular antes e após o tratamento das células, e 8 horas após a inoculação das células tratadas em meio de caldo de cana. As células foram lavadas em água destilada e a análise da viabilidade celular foi

realizada por plaqueamento das amostras em meio YPD para a contagem de *S. cerevisiae* (distinguindo entre colônias mucosas e rugosas) e meio MRS para *L. fermentum.* As placas foram incubadas a 30 ^{o}C por 72 horas (leveduras) e 35 °C por 72 horas (bactéria), para contagem do número de UFC/mL.

A solução ácida foi preparada adicionando-se ácido sulfúrico à água destilada até obtenção do pH desejado, monitorando-se os valores de pH em pH-metro digital. Em seguida, um volume de 45 mL da solução foi transferido para erlenmeyers de 125 mL, sendo a seguir esterilizados em autoclave.

Os experimentos foram realizados com as culturas puras das leveduras *S. cerevisiae* e da bactéria *L. fermentum*.

4.3.4 Tratamento celular combinado (baixo pH + etanol)

O mesmo procedimento foi repetido para cada micro-organismo separadamente, porém utilizando-se solução de ácido sulfúrico pH 2,0 acrescido de 13%, 15% ou 17% de etanol (v/v).

Em sequência, repetiu-se o mesmo procedimento com solução ácida pH 2,0 + 13% etanol (v/v), porém em 5 ciclos sucessivos de tratamento e recuperação em meio de caldo de cana. Para este teste foram utilizadas as linhagens PE-2, rugosas e *L. fermentum* em co-culturas, na proporção de 1:1:1 (v/v/v).

Para as linhagens rugosas 07 e 36, foram também realizados experimentos com solução ácida pH 1,5 + 13% de etanol (v/v), em 5 ciclos sucessivos de tratamento e recuperação em meio de caldo de cana, com co-culturas (PE + rugosa + bactéria).

A retirada das amostras e a análise de viabilidade celular foram realizadas conforme descrito no ítem anterior.

4.3.5 Tratamento celular com metabissulfito de potássio

Um volume de 5 mL de massa celular foi ressuspendido em solução esterilizada de metabissulfito de potássio em concentração final de 200 mg/L, em um volume final de 50 mL em erlenmeyers de 125 mL. Os frascos (em duplicata) foram levados ao agitador a 30 °C, 160 rpm por 2 horas. Em seguida as células foram separadas da solução de metabissulfito por centrifugação, lavadas com água destilada estéril duas vezes e inoculadas em meio de caldo de cana 4 ºBrix, incubação a 30°C e 160

rpm por 8 horas, em 5 ciclos sucessivos de tratamento e recuperação em meio de caldo de cana.

Para este teste foi utilizada a co-cultura das linhagens PE-2, rugosa 36 e *L. fermentum*, na proporção de 1:1:1 (v/v/v).

A retirada das amostras e a análise de viabilidade celular foram realizadas conforme descrito no ítem anterior.

A solução de metabissulfito de potássio foi preparada pesando-se 0,5 g do produto e acrescentando-se 10 mL de água destilada estéril (pH 4,5). Essa solução foi esterilizada em filtro seringa com membrana de porosidade 0,45 µm, e adicionada a 90 mL de água destilada estéril (pH 4,5), com concentração final de 5000 mg/L de metabissulfito de potássio. Um volume de 2 mL dessa solução estoque foi adicionada à 43 mL de água destilada estéril (pH 4,5), constituindo a solução de tratamento das células (concentração final de 200 mg/L em um volume final de 50 mL, após adição da massa celular).

4.3.6 Análise estatística

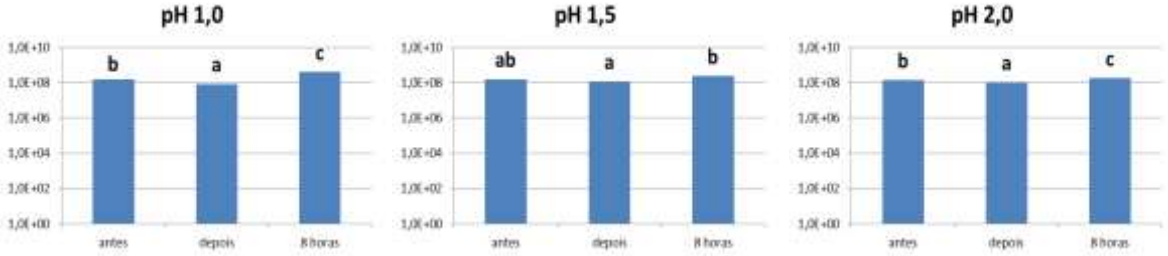
Os resultados de cada teste, para cada levedura, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e no caso de diferença significativa, as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância, utilizando-se o software Statistica. Foram comparados os resultados do número de UFC/mL (transformados em $\log_{10}$) antes e depois do tratamento celular e depois de 8 horas de crescimento em caldo de cana, nos experimentos de ciclo único.

4.4 Resultados e Discussão

Os resultados dos testes realizados em três diferentes valores de pH estão apresentados na Figura 1. Em pH 2,0, o qual é normalmente utilizado na indústria para o tratamento do fermento, nenhuma das linhagens de leveduras teve o crescimento afetado, mostrando aumento significativo no número de UFC ao final do período de recuperação em caldo de cana, por 8 horas (Figuras 1C, 1F, 1I e 1L). A bactéria *L. fermentum* teve diminuição significativa no número de UFC após o tratamento celular em pH 2,0, apresentando aumento após o crescimento em caldo de cana, porém não houve recuperação do número inicial de UFC (Figura 10).

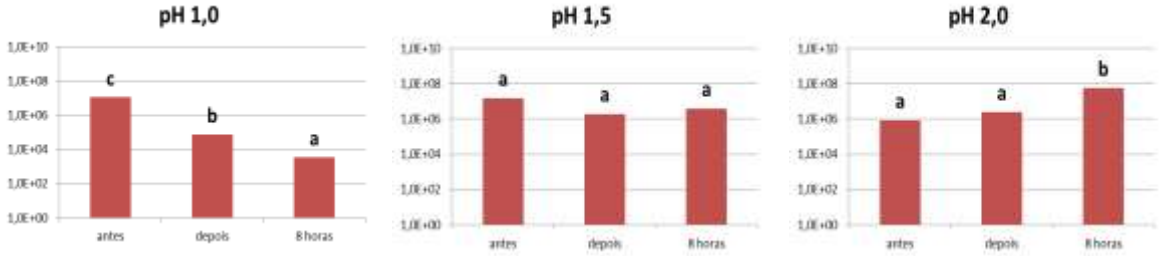
PE-2

A B C



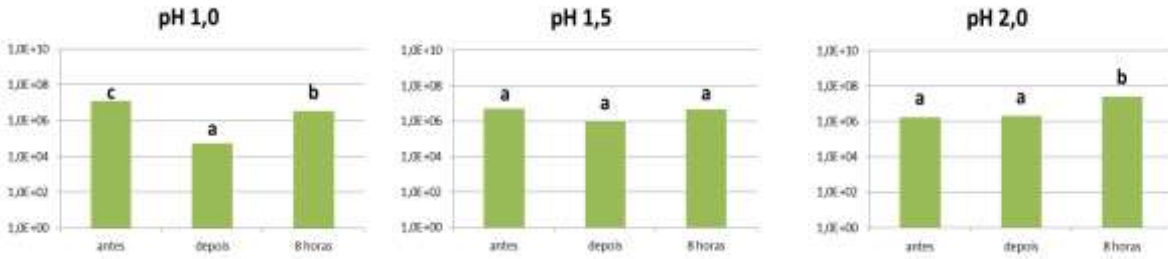
.**Rugosa Linhagem 7**

D E F



Rugosa Linhagem 36

G H I



Rugosa Linhagem 52

J K L

Bactéria *L. fermentum*

M N O

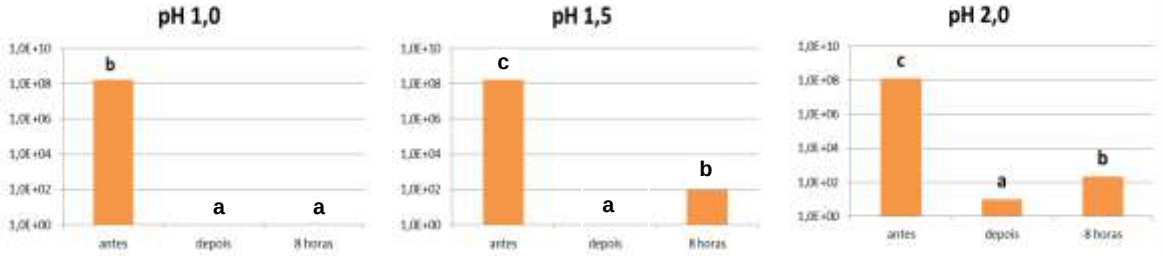


Figura 1 - Número de UFC/mL de linhagens de *S. cerevisiae* PE-2, rugosas (07, 36 e 52), e da bactéria *L. fermentum*, submetidas ao tratamento com solução de ácido sulfúrico em diferentes valores de pH (1,0, 1,5 e 2,0), a 30 ^{0}C, por 2 horas, a 160 rpm. A análise do número de colônias foi realizada **antes** do tratamento ácido, **depois** do tratamento ácido e após **8 horas** de incubação das células tratadas em meio de caldo de cana 4 ºBrix, a 30 ^{0}C, 160 rpm. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey

Em pH 1,5, as linhagens rugosas não apresentaram diminuição significativa no número de UFC após o tratamento, no entanto, não houve aumento no número de UFC após o crescimento em caldo de cana, como aconteceu no tratamento com pH 2,0 (Figuras 1B, 1E, 1H e 1K) . Com *L. fermentum,* não foi possível obter contagem de UFC após o tratamento celular em pH 1,5, mas houve contagem após o período de crescimento em caldo de cana (Figura 1N). Provavelmente o tratamento ácido com pH 1,5 levou as células de *L. fermentum* ao estado de VNBC (*Viable but not culturable*), o qual é normalmente descrito para micro-organismos em situação de estresse (como elevada concentração osmótica, falta de nutrientes e temperatura elevada). Nessas situações a célula perde a culturabilidade, mas permanece viável e potencialmente capaz de crescer novamente em meio sem o fator estressante (OLIVER, 2005).

O tratamento celular em pH 1,0 diminuiu significativamente o número de UFC das linhagens rugosas, mas não afetou a viabilidade da levedura PE-2. O número de

UFC ao final do período de 8 horas de crescimento em caldo de cana não foi significativamente semelhante ao número de UFC inicial para as leveduras rugosas (Figuras 1A, 1D, 1G e 1J). Nesse valor de pH, as células de *L. fermentum* perderam completamente a viabilidade (Figura 1M).

Em resumo, o decréscimo do pH de 2,0 para 1,0 durante o tratamento celular realizado entre os ciclos fermentativos poderia ser utilizado para controlar o crescimento das linhagens rugosas de *S. cerevisiae* sem afetar a levedura do processo. No entanto, um valor de pH tão baixo quanto 1,0 não seria viável nas condições industriais, tanto por causa do custo do ácido quanto pelos efeitos causados pelo ácido nos equipamentos. Segundo Dorta (2006), a utilização de pH muito baixo no tratamento com ácido sulfúrico diminuiu a viabilidade, brotamento celular, concentração de biomassa da levedura, rendimento e produtividade etanólicos, aumentando o teor de proteína residual, açúcares residuais e a atividade de H+ - ATPase.

Esse resultado estimulou uma investigação quanto à aplicação de um tratamento combinado baseado em baixo pH (maior que 1,0) e etanol, por exemplo, a fim de controlar o crescimento destas linhagens contaminantes. Desta forma, optou-se por trabalhar com pH 2,0, que é o valor normalmente utilizado na indústria, adicionando-se concentrações de etanol a partir de 13%. A determinação deste valor foi baseada em experimentos anteriores que mostraram que o tratamento combinado de pH 2,0 e 13% etanol não afetou a levedura PE-2, mas significativamente afetou o desenvolvimento da levedura contaminante *D. bruxellensis* (BASSI et al., 2013).

Os resultados obtidos utilizando-se três níveis de tratamentos combinados (pH 2,0 + 13% etanol, pH 2,0 + 15% etanol e pH 2,0 + 17% etanol) estão apresentados na Figura 2, 3 e 4, respectivamente. Utilizando-se solução ácida pH 2,0 com 13% de etanol, não se observou nenhuma diminuição no número de UFC/mL após a aplicação do tratamento para todas as leveduras, apenas para a bactéria *L. fermentum* (Figura 2). Este resultado também se repetiu para o tratamento ácido pH 2,0 com 15% de etanol (Figura 3).

No tratamento ácido pH 2,0 + 17% etanol, nenhuma das leveduras alcançou o valor inicial de UFC após a recuperação em caldo de cana por 8 horas (Figura 4), influenciando significativamente a viabilidade celular

De acordo com Souza (2009), o crescimento celular de leveduras não é inibido em concentrações de álcool inferiores a 26 g/L, mas é inibido totalmente quando a

concentração de álcool atinge 68,5 g/L no meio de fermentação. Nos nossos experimentos, além da concentração superior de etanol (130 a 170 g/L), há o efeito combinado do baixo pH, com possível efeito sinergístico sobre as células.

O etanol não se concentra no interior da célula de *S. cerevisiae* (GUIJARRO e LAGUNAS, 1984 apud CARTWRIGHT et al., 1989), mas sim na parte fosfolipídica das membranas, onde se liga no interior hidrofóbico causando enrijecimento, e conseqüentemente, acarretando distúrbios dos sistemas de transportes (LOUREIRO-DIAS; PEINADO, 1982).

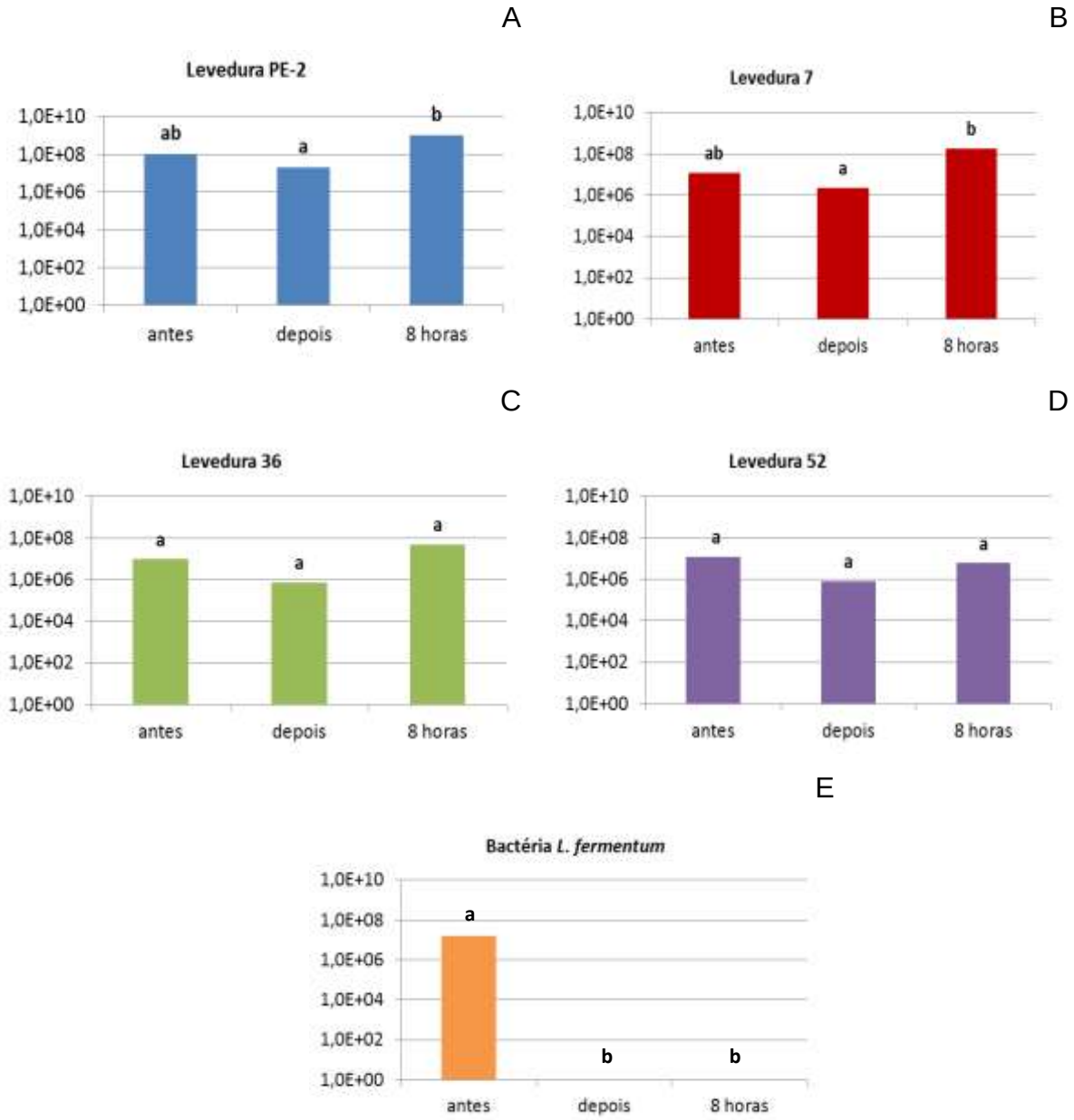


Figura 2 - Número de UFC/mL de linhagens de *S. cerevisiae* PE-2, rugosas (07, 36 e 52), e da bactéria *L. fermentum*, submetidas ao tratamento com solução de ácido sulfúrico pH 2,0 adicionada de 13% de etanol (v/v), a 30 ^{0}C, por 2 horas, a 160 rpm. A análise do número de colônias foi realizada **antes** do tratamento ácido, **depois** do tratamento ácido e após **8 horas** de incubação das células tratadas em meio de caldo de cana 4 ºBrix, a 30 ^{0}C, 160 rpm. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey

Além disso, diminui a capacidade de seletividade da membrana plasmática, permitindo a saída de constituintes celulares e a entrada passiva de prótons, reduzindo assim, o potencial de membrana e por fim interferindo em todos os sistemas que requeiram força protomotiva. Tal descontrole celular acaba resultando em deficiências nutricionais, o que intensifica a inibição alcoólica (INGRAM, 1985).

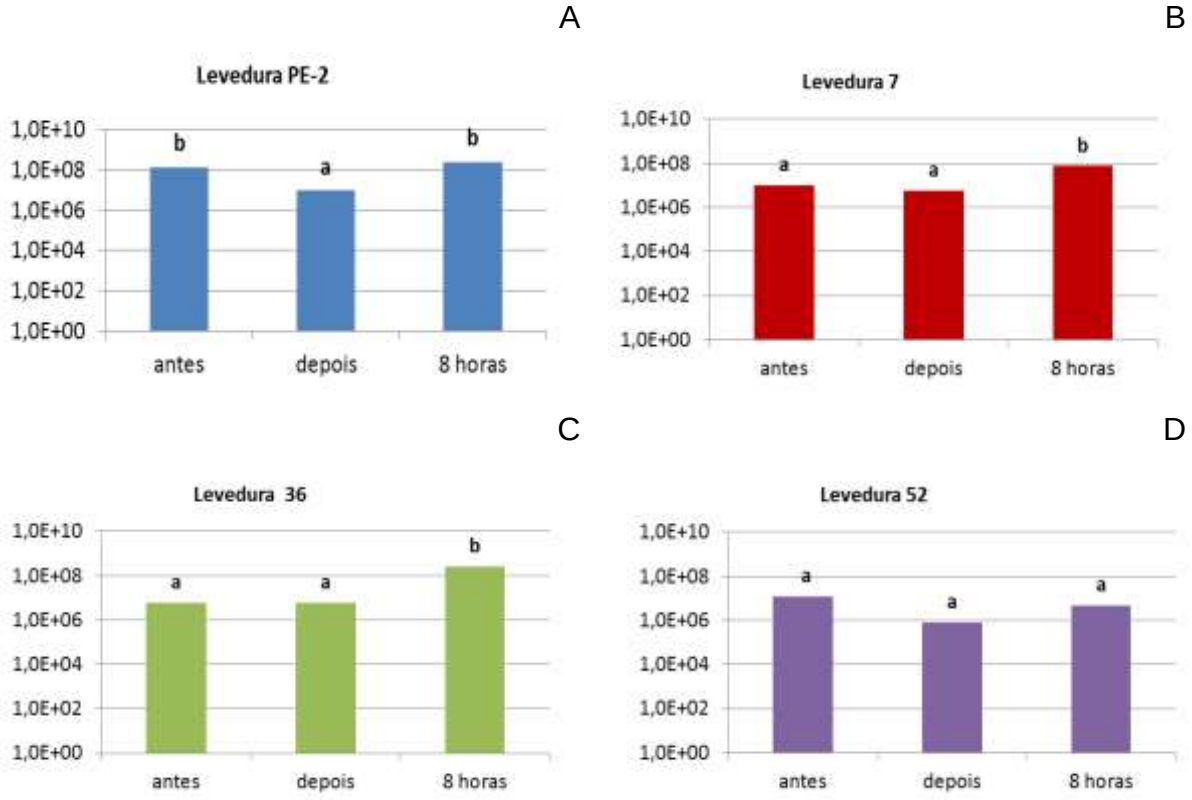


Figura 3 - Número de UFC/mL de linhagens de *S. cerevisiae* PE-2, rugosas (07, 36 e 52), e da bactéria *L. fermentum*, submetidas ao tratamento com solução de ácido sulfúrico pH 2,0 adicionada de 15% de etanol (v/v), a 30 ^{0}C, por 2 horas, a 160 rpm. A análise do número de colônias foi realizada **antes** do tratamento ácido, **depois** do tratamento ácido e após **8 horas** de incubação das células tratadas em meio de caldo de cana 4 ºBrix, a 30 ^{0}C, 160 rpm. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey

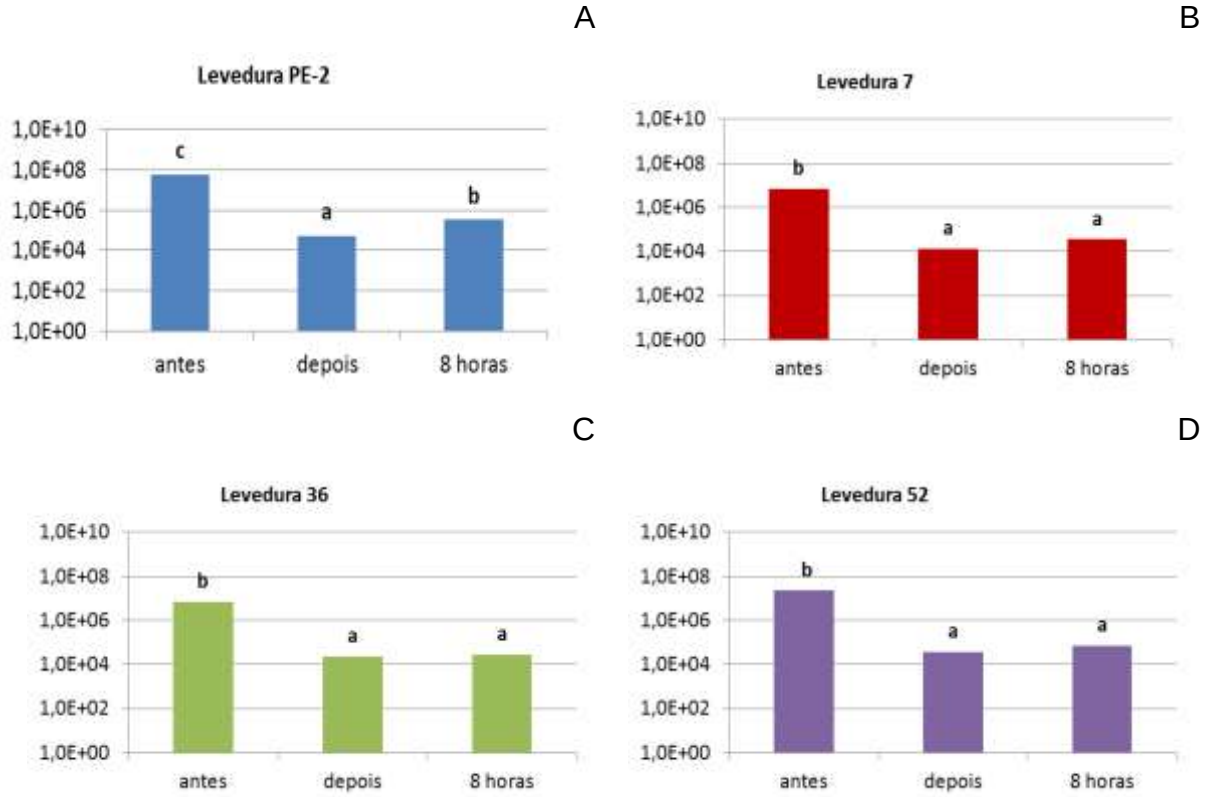


Figura 4 - Número de UFC/mL de linhagens de *S. cerevisiae* PE-2, rugosas (07, 36 e 52), e da bactéria *L. fermentum*, submetidas ao tratamento com solução de ácido sulfúrico pH 2,0 adicionada de 17% de etanol (v/v), a 30 ^{0}C, por 2 horas, a 160 rpm. A análise do número de colônias foi realizada **antes** do tratamento ácido, **depois** do tratamento ácido e após **8 horas** de incubação das células tratadas em meio de caldo de cana 4 ºBrix, a 30 ^{0}C, 160 rpm. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey

O uso combinado do ácido sulfúrico + etanol pode ter intensificado esses danos. Nunes et al. (1991) verificaram que a adição de ácido sulfúrico e de bactericidas, seja qual for a quantidade, é inadequada e inoportuna passando, então, a ter a função de destruidor de leveduras e enzimas. Esta adição causa muitas reações químicas que resultam no desequilíbrio do importante sistema de enzima-substrato no meio de fermentação.

Quanto à bactéria *L. fermentum*, não foram detectadas células viáveis após o tratamento tampouco após o período de recuperação, mesmo no tratamento pH 2,0 + 13% etanol (Figura 2E). Desta forma, não foram realizados os testes com concentrações maiores de etanol em solução ácida.

Em resumo, de uma forma geral, os tratamentos utilizados tiveram o mesmo efeito sobre as leveduras rugosas quanto sobre a levedura de processo, ou seja, o tratamento que teve maior influência sobre o crescimento das rugosas foi também o

tratamento que mais afetou a PE-2. Em vista destes resultados, cujos experimentos foram realizados em um único ciclo de tratamento-recuperação, seguiu-se um ensaio em que foram avaliados cinco ciclos sucessivos de tratamento-recuperação, na menor concentração de etanol avaliada (pH 2,0 + 13% etanol), desta vez utilizando-se uma cultura mista dos três micro-organismos: levedura PE-2, levedura rugosa e bactéria *L. fermentum*. O crescimento de cada micro-organismo foi avaliado separadamente por plaqueamento em meios de cultura. Os resultados estão apresentados na Figura 5, 6 e 7.

No sistema de ciclos de tratamento e recuperação, verificou-se um comportamento diferenciado das linhagens rugosas em comparação com a linhagem do processo. Analisando-se as Figuras 5A, 6A e 7A, verificou-se que a levedura PE-2 não foi afetada pelo tratamento pH 2,0 + 13% de etanol quando em cultura mista com as linhagens rugosas 07, 36 e 52, além de *L. fermentum*, respectivamente. Porém para as linhagens rugosas 07 e 36 (Figuras 5B e 6B), o resultado não foi tão eficiente como ocorreu para a linhagem rugosa 52 (Figura 7B). As linhagens 07 e 36 ao final do 5° ciclo apresentaram o mesmo número de células do início do teste, mostrando que o tratamento utilizado não conseguiu reduzir a população de leveduras rugosas. A bactéria foi totalmente controlada com este tratamento já no primeiro ciclo, em todas as co-culturas avaliadas (Figuras 5C, 6C e 7C). Como as linhagens rugosas também são *S. cerevisiae,* a busca por um tratamento com ação seletiva sobre as linhagens não é tarefa fácil, pois este teria que controlar o contaminante sem prejudicar a levedura de processo (PE-2).

Para a levedura rugosa 52, a partir do terceiro ciclo, o número de UFC ficou sempre abaixo do inicial, com um decréscimo significativo de 3 ciclos log comparando-se o número inicial de UFC no primeiro ciclo e ao final da recuperação em caldo de cana no quinto ciclo (Figura 7B). Dessa forma, o tratamento combinado pH 2,0 + 13% etanol poderia ser utilizado para controle da levedura rugosa 52 e da bactéria *L. fermentum*, sem prejuízo à levedura do processo.

Em trabalhos realizados por Bassi et al. (2013), utilizando o mesmo tratamento celular para uma linhagem de *D. bruxellensis* em condições de crescimento e fermentação, foi obtido um decréscimo significativo na viabilidade celular desse contaminante, enquanto a levedura PE-2 foi ligeiramente afetada.

Della Bianca et al. (2013) avaliaram a cinética de crescimento da linhagem PE-2 e da levedura de panificação, incubando-as em pH 1,5 e observando uma

sobrevivência maior da linhagem PE-2, indicando que a lavagem com ácido sulfúrico exerce uma pressão seletiva sobre os micro-organismos ali presentes.

Foi realizado um novo teste de tratamento celular utilizando-se pH 1,5 + 13% etanol com a finalidade de controlar o crescimento das linhagens rugosas 07 e 36, que não apresentaram decréscimo no número de UFC/mL no tratamento pH 2,0 + 13% etanol. Tanto a levedura de processo (PE-2) quanto as leveduras rugosas (07 e 36) não suportaram este tratamento, sendo que após o 2° ciclo de tratamento, todas as leveduras estavam mortas (dados não apresentados).

Sendo assim, optou-se por realizar outro teste com pH 1,5, sem adição de etanol e com 5 ciclos de tratamento para as leveduras rugosa 07 e 36. Embora o tratamento ácido com pH 1,5 não tenha tido efeito significativo sobre a redução do número de UFC das leveduras rugosas (Figura 1E e 1H) com um ciclo de tratamento, havia a possibilidade de que 5 ciclos de tratamento poderiam resultar no controle do crescimento das leveduras 07 e 36. Os resultados destes testes encontram-se nas Figuras 8 e 9.

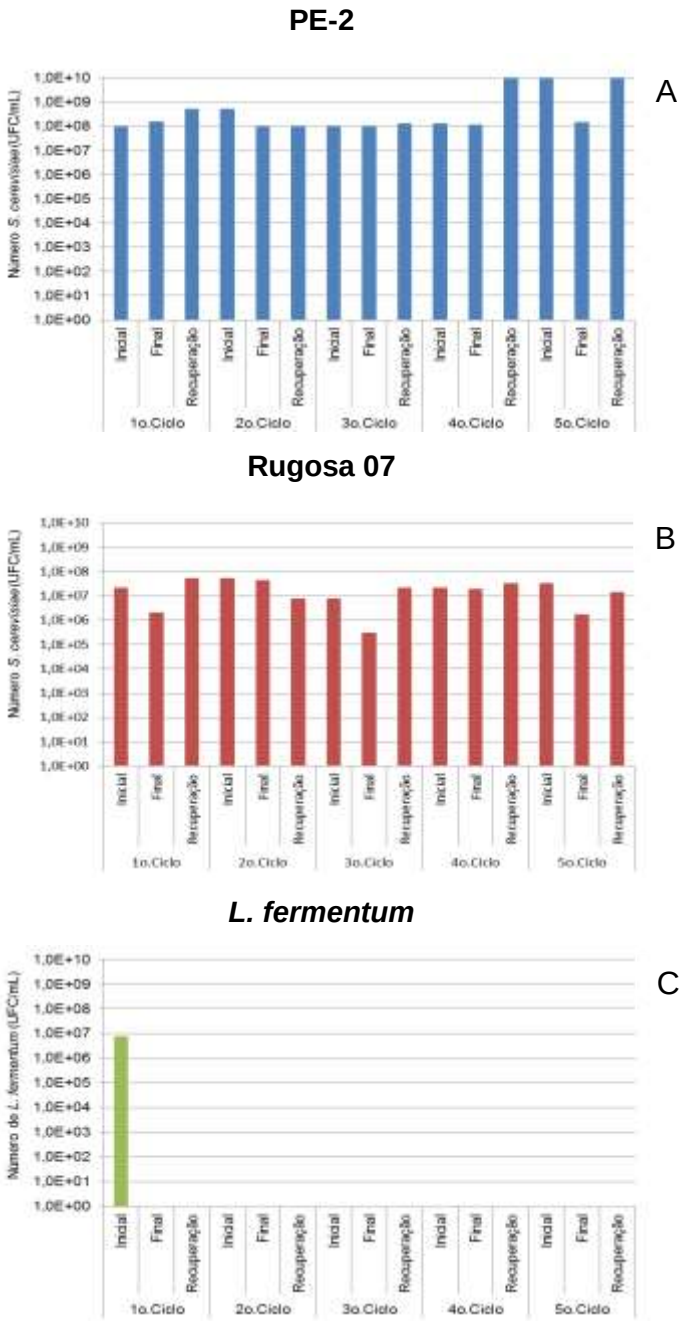


Figura 5 - Número de UFC/mL durante os ciclos sucessivos de tratamento com solução de ácido sulfúrico (pH 2,0) e etanol (13% v/v), a 30 ^{0}C, por 2 horas, a 160 rpm, com a cultura mista de *S. cerevisiae* PE-2 + rugosa 07 + *L. fermentum*. Legenda: *inicial:* contagem de colônias antes do tratamento; *Final:* contagem de colônias após o tratamento; *Recuperação*: contagem de colônias após 8 horas de incubação das células tratadas em meio caldo de cana 4 ^{0} Brix, incubação a 30 ^{0}C, 160 rpm

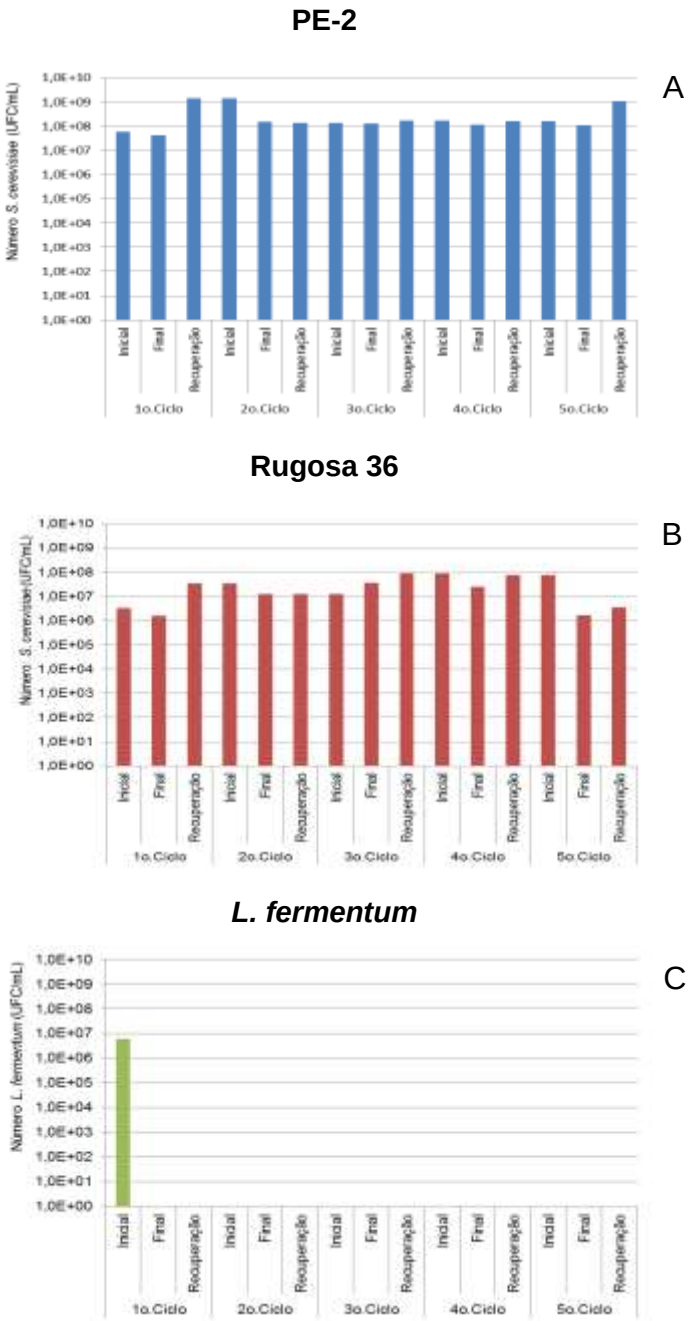


Figura 6 - Número de UFC/mL durante os ciclos sucessivos de tratamento com solução de ácido sulfúrico (pH 2,0) e etanol (13% v/v), a 30 ^{0}C, por 2 horas, a 160 rpm, com a cultura mista de *S. cerevisiae* PE-2 + rugosa 36 + *L. fermentum*. Legenda: *inicial:* contagem de colônias antes do tratamento; *Final:* contagem de colônias após o tratamento; *Recuperação*: contagem de colônias após 8 horas de incubação das células tratadas em meio caldo de cana 4^{0} Brix, incubação a 30^{0}C, 160 rpm

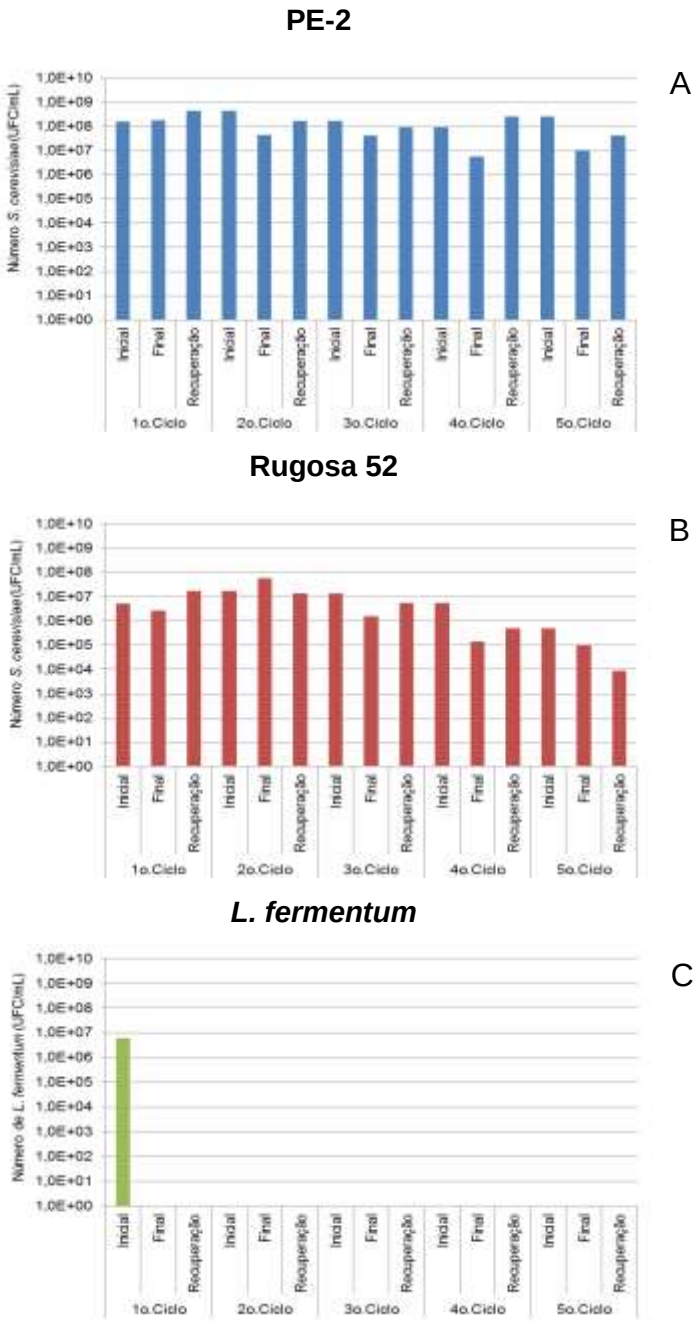
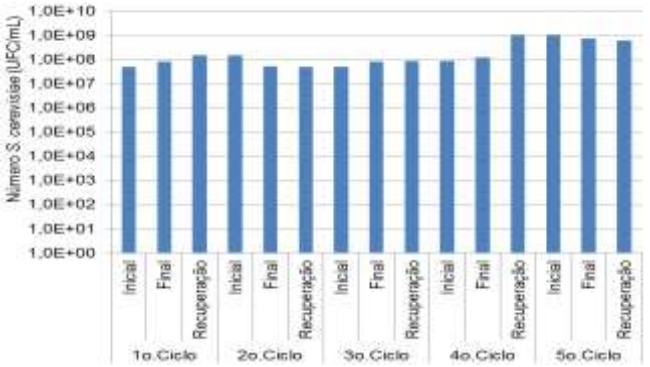


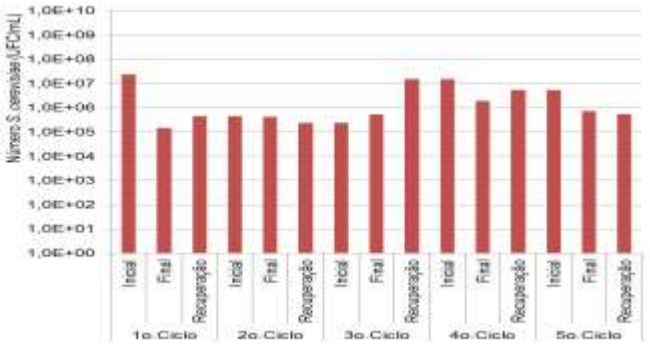
Figura 7 - Número de UFC/mL durante os ciclos sucessivos de tratamento com solução de ácido sulfúrico (pH 2,0) e etanol (13% v/v), a 30 ^{0}C, por 2 horas, a 160 rpm, com a cultura mista de *S. cerevisiae* PE-2 + rugosa 52 + *L. fermentum*. Legenda: *inicial:* contagem de colônias antes do tratamento; *Final:* contagem de colônias após o tratamento; *Recuperação*: contagem de colônias após 8 horas de incubação das células tratadas em meio caldo de cana 4^{0} Brix, incubação a 30^{0}C, 160 rpm

PE-2



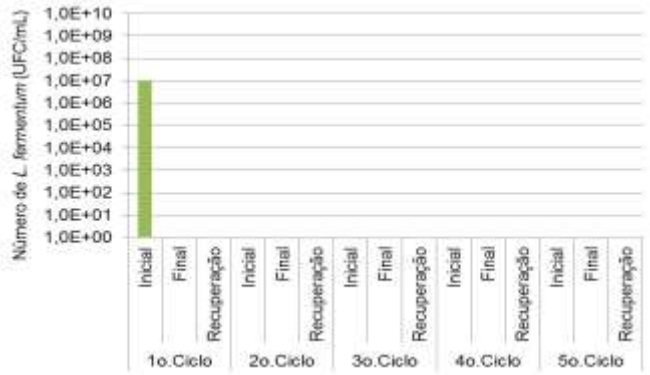
A

Rugosa 07



B

L. fermentum



C

Figura 8 - Número de UFC/mL durante os ciclos sucessivos de tratamento com solução de ácido sulfúrico pH 1,5, a 30 ^{0}C, por 2 horas, a 160 rpm, com a cultura mista de *S. cerevisiae* PE-2 + rugosa 07 + *L. fermentum*. Legenda: *inicial:* contagem de colônias antes do tratamento; *Final:* contagem de colônias após o tratamento; *Recuperação*: contagem de colônias após 8 horas de incubação das células tratadas em meio caldo de cana 4^{0} Brix, incubação a 30^{0}C, 160 rpm

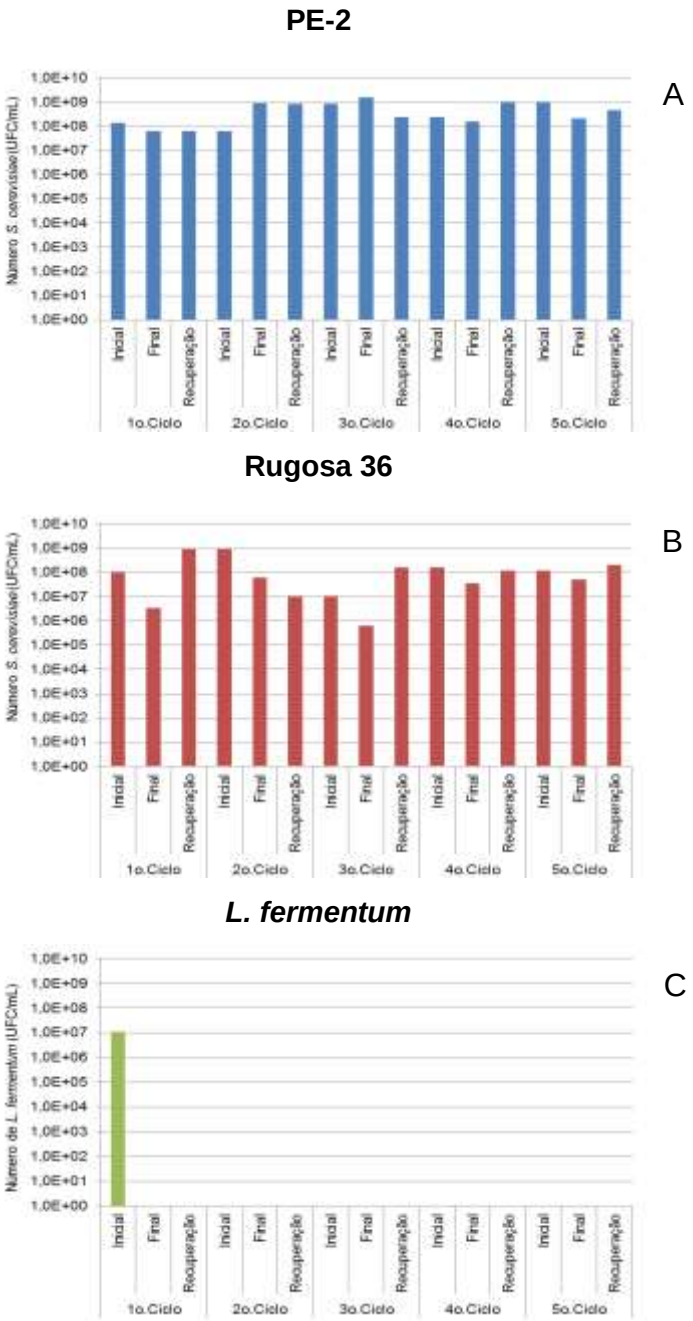


Figura 9 - Número de UFC/mL durante os ciclos sucessivos de tratamento com solução de ácido sulfúrico pH 1,5, a 30 ^{0}C, por 2 horas, a 160 rpm, com a cultura mista de *S. cerevisiae* PE-2 + rugosa 36 + *L. fermentum*. Legenda: *inicial:* contagem de colônias antes do tratamento; *Final:* contagem de colônias após o tratamento; *Recuperação*: contagem de colônias após 8 horas de incubação das células tratadas em meio caldo de cana 4^{0} Brix, incubação a 30^{0}C, 160 rpm

A levedura PE-2 não foi afetada pelo tratamento proposto (pH 1,5), sendo que o número de UFC aumentou quanto comparado com o início do teste (Figura 8A). Para a linhagem rugosa 07, o resultado foi mais positivo, pois após o primeiro ciclo de tratamento, a população permaneceu abaixo do inicial até o 3° ciclo, recuperando

no 4° ciclo, porém voltando a ficar abaixo cerca de 1 ciclo log no 5° ciclo, diferente do número inicial de UFC (Figura 8B).

No entanto, para a levedura rugosa 36, verificou-se que o tratamento ácido com pH 1,5 não teve nenhum efeito, pois embora tenha havido uma queda no número de UFC desta levedura nos ciclos iniciais, após o 4º ciclo o número se igualou ao inicial (Figura 9B).

A bactéria *L. fermentum* teve o crescimento totalmente controlado logo no primeiro ciclo de tratamento, com perda total de viabilidade (Figuras 8C e 9C).

Carvalho (2014) realizou teste de crescimento com a linhagem 36 em meio YPD contendo 0, 100, 200 e 400 mg/L de metabissulfito de potássio, por 48 horas e obteve uma redução de crescimento dessa linhagem nas condições testadas. Diante disso, na tentativa de se conseguir controlar a linhagem rugosa 36, foi realizado um novo teste de ciclos de tratamento-recuperação em caldo de cana, utilizando metabissulfito de potássio na concentração de 200 mg/L, em pH 4,5. O teste não foi realizado em solução com pH 2,0, pois trabalho anterior indicou uma forte redução na atividade fermentativa da linhagem PE-2 nessa condição (BASSI et al., 2015).

O resultado deste teste encontra-se na Figura 10, onde se pode verificar que o metabissulfito de potássio não afetou a linhagem PE-2, mas também não foi capaz de afetar o crescimento da linhagem rugosa 36, sendo mais uma vez controlada apenas a bactéria *L. fermentum*. Em trabalho realizado por Bassi et al. (2015) avaliando a adição de metabissulfito de potássio no crescimento de leveduras em co-culturas de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis*, utilizando de 200 a 400 mg/L, observou-se que o metabissulfito de potássio foi eficaz para controlar o crescimento desse contaminante, sem afetar a levedura *S. cerevisiae*.

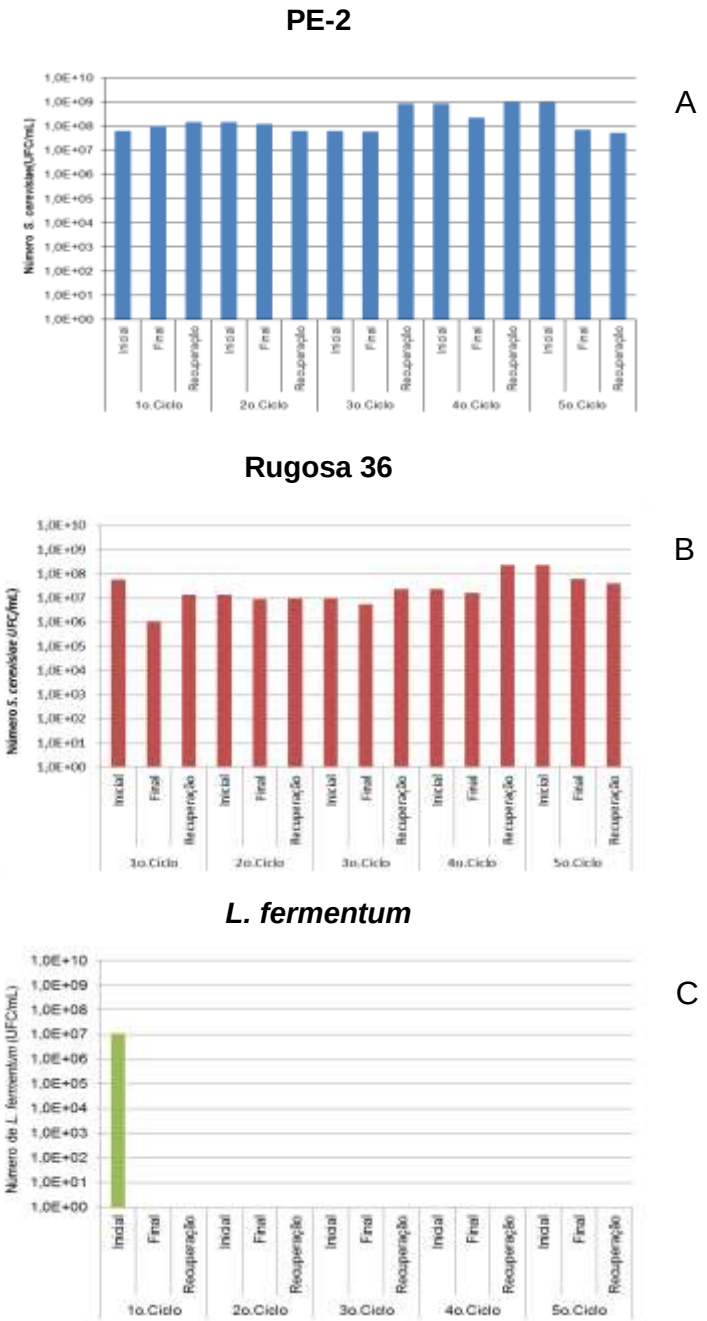


Figura 10 - Número de UFC/mL durante os ciclos sucessivos de tratamento com solução de metabissulfito de potássio 200 mg/L (pH 4,5), a 30 ^{0}C, por 2 horas, a 160 rpm, com a cultura mista de *S. cerevisiae* PE-2 + rugosa 36 + *L. fermentum*. Legenda: *inicial:* contagem de colônias antes do tratamento; *Final:* contagem de colônias após o tratamento; *Recuperação*: contagem de colônias após 8 horas de incubação das células tratadas em meio caldo de cana 4^{0} Brix, incubação a 30^{0}C, 160 rpm

Reis (2011), avaliando a diversidade genética das linhagens rugosas aqui estudadas por microssatélites, verificaram que a linhagem rugosa 36 ficou bem próxima geneticamente à linhagem PE-2, inclusive com as mesmas características de resistência a estresses. Dessa forma, qualquer tipo de tratamento para o controle

de crescimento dessa linhagem rugosa provavelmente afetaria também a levedura de processo PE-2.

4.5 Conclusões

Não houve um tratamento único capaz de controlar todas as linhagens rugosas testadas. Para a linhagem rugosa 52, a adição de 13% de etanol ao tratamento ácido (pH 2,0), foi a melhor opção de controle do crescimento. Para a levedura 07, a sugestão foi de abaixamento do pH do tratamento ácido para 1,5 para o controle do crescimento da levedura rugosa. A levedura PE-2 foi pouco afetada pelos tratamentos acima indicados, mostrando haver um efeito seletivo do tratamento ácido combinado ou não com etanol sobre as linhagens rugosas. A bactéria *L. fermentum* teve seu crescimento afetado em todas as condições testadas. Nenhum dos tratamentos utilizados teve efeito sobre a linhagem rugosa 36.

Referências

ALVES, D.M.G. **Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica**.1994.199p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” USP, Piracicaba, 1994.

BASSI, A.P.G.; PARALUPPI, A.L; REIS, V.R.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Potassium metabisulphite as a potential biocide against *Dekkera bruxellensis* in fuel ethanol fermentations. **Letters in Applied Microbiology,** Oxford**,** v.60, n.3, p.248-258, 2015.

BASSI, A.P.; SILVA, J.G.; REIS, V.R.; CECCATO-ANTONINI, S.R. 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 Journal of Microbiology and Biotechnology,** Hull**,** v.29, n.9, p.1661-1676, 2013.

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

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

BLANPAIN, J.P.; RONJAT, M.; SUPPLY, P.; DUFOUR, J.P.; GOFFEAU, A.; DUPONT, Y. The yeast plasma membrane H+ _ATPase. **The Journal of Biological Chemistry**, Nashville, v.267, n.6, p.3735-3740, 1992.

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

CARTWRIGHT, C.P.; ROSE, A.H.; CALDERBANK, J.; KEENAN, M.H.J. Solute transport. In: ROSE, A.H. (Ed.) **The Yeasts.** New York: Academic Press, 1989. v.3, p. 55- 56,

CARVALHO, I.G.B. **Avaliação da competitividade de leveduras selvagens *Saccharomyces cerevisiae* isoladas da fermentação alcoólica**. Araras: UFSCar, 2014. 40p. (Relatório)

CEBALLOS-SCHIAVONE, C.H.M. **Tratamento térmico do caldo de cana-de-açucar visando a redução de contaminantes bacterianos *Lactobacillus* na pradução de etanol e eficiência de tratamento do fermento.** 2009. 177p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”; Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

COONEY, C.L. Growth of microorganisms. In: REHM, H.J.; REED, G. (Ed.).**Biotechnology:** Microbial fundamentals. Weinheim: Verlag Chemie,1981. 73p.

COOTE, N.; KIRSOP, B.H. Factors responsible for the decrease in pH during beer fermentations. **Journal of the Institute of Brewing,** London, v.82, p.149-156, 1976.

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

DORTA, C. **Sinergismo entre sulfito, ácido lático, pH e etanol na fermentação alcoólica de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e M-26.** 2006**.** 144p. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista “ Júlio de Mesquita Filho” . Rio Claro, SP, 2006.

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

FAVERO, D.M.; RIBEIRO C. da S.G.; AQUINO A.D. Sulfitos: Importância na indústria alimentícia e seus possíveis malefícios a população. **Segurança Alimentar e Nutricional,** Campinas, v.18, n.1, p.11-20, 2011.

GHOOSE, T.K.; TYAGI, R.D. Rapid ethanol fermentation of celulose hydrolysate: batch versus continous systems. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.21, p.1387-1400, 1979.

INGRAM, L.O. Adaptation of membrane lipids to alcohols. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology,** Oxford, v.35B, p.235-238,1985.

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

KANDLER, O.; WEISS, N. Regular nonsporing Gram positive rods. In: BERGEY, D.H. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Willians and Wilkins, 1986. v.2, p.1208-1234.

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

NUNES, M.A.; SOUTO, A; ALVES DINIS, N.C.; QUEIROZ, R.M. de; VIEIRA DE MEDEIROS, L.N. BRITO DE OLIVEIRA, J.P. Processo de eliminação do ácido sulfúrico e outros bactericidas do sistema de fermentação alcoólica Melle-Boinot. Álcool não corrosivo. **Álcool e Açúcar**, São Paulo, v.4, n.22, p.39-50, 1991.

OLIVA-NETO, P.; DORTA, C.; CARVALHO, A.F.A.; LIMA V.M.G.; SILVA, D.F. The Brazilian technology of fuel ethanol fermentation—yeast inhibition factors and new perspectives to improve the technology," In: MENDEZ-VILAS, A. (Ed.) **Materials and Processes for Energy:** Communicating Current Research and Technological Developments, , v. 1 Badajoz, Spain: Formatex,2013. p. 371–379.

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

OLIVER, J.D. Viable but nonculturable state in bacteria. **Journal of Microbiology,** Daejeon, v.43, p.93-100, 2005.

REIS, V.R. **Caracterização de linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de processos fermentativos para produção de etanol.** 2011. 81p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2011.

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

ZECH, M.; GÖRISCH, H. Invertase from *Saccharomyces cerevisiae*: reversible ativation by components of industrial molasses media. **Enzyme and Microbial Technology,** New York, **,** v.17, p.41-46, 1995.

5 EFEITO DO TRATAMENTO COMBINADO BAIXO pH + ETANOL PARA O CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO POR LEVEDURAS SELVAGENS *Saccharomyces cerevisiae E Lactobacillus fermentum* EM FERMENTAÇÃO COM RECICLO CELULAR EM DIFERENTES SUBSTRATOS

Resumo

O controle das contaminações por leveduras selvagens *Saccharomyces cerevisiae* requer atenção especial, pois não se conhecem substâncias que possam afetar as linhagens selvagens sem prejudicar a levedura do processo. Nesse sentido, em decorrência de resultados anteriores que apontaram uma sensibilidade diferencial ao tratamento celular baixo pH + etanol pelas leveduras *S. cerevisiae* rugosas, este trabalho avaliou o efeito do tratamento celular baseado em baixo pH (2,0) + etanol (13% v/v) para o controle da contaminação por levedura *S. cerevisiae* rugosa *e* bactéria *L. fermentum* em fermentação com reciclo celular em diferentes substratos**.** Foram feitas fermentações puras com a linhagem PE-2 e fermentações contaminadas com a levedura rugosa e ou *L. fermentum* em meios de caldo de cana e melaço 16 °Brix, pH 4,5, submetidas a tratamento (ou não) das células em solução de ácido sulfúrico pH 2,0 + 13% etanol, por 2 horas, a 30°C entre os ciclos fermentativos, em 6 ciclos de fermentação (C1 a C6) em batelada, com duração de 9 horas cada. A presença dos contaminantes nas fermentações etanólicas resultou em queda no rendimento fermentativo, sendo este decréscimo mais agravante quanto presente a levedura rugosa do que a bactéria *L. fermentum*. A presença da bactéria *L. fermentum* na fermentação também contaminada com a levedura rugosa não potencializou o efeito negativo sobre a produção de etanol. Não houve diferença entre os substratos caldo e melaço quando se comparou as fermentações com e sem tratamento pH + etanol. A diferença na produção de etanol ocorreu apenas quando se comparou fermentações com tratamento e sem tratamento dentro do mesmo substrato, pois se verificou que o tratamento proposto afetou o metabolismo fermentativo da linhagem PE-2. A viabilidade da levedura de processo não foi afetada em ambos os substratos. O tratamento proposto conseguiu controlar a bactéria *L. fermentum*, causando morte celular, porém para a levedura rugosa utilizada foi verificado apenas um pequeno decréscimo de sua população inicial.

Palavras-chave: Tratamento celular; Substrato; Etanol

Abstract

The control of the contamination by wild strains of *Saccharomyces cerevisiae* requires special attention because there are no known substances that could affect wild strains without damaging the industrial yeast strain. In this sense, due to the previous results that showed a differential sensitivity to the cell treatment low pH + ethanol by the rough yeast strains of *S. cerevisiae*, this study evaluated the effect of a cell-based treatment at low pH (2.0) + ethanol (13% v/v) for the control of contamination by rough *S. cerevisiae* yeasts and *L. fermentum* bacteria in fermentation with cell recycle in different substrates. Fermentations were conducted with pure PE-2 strain and contaminated with rough yeast (strain 52) and or *L. fermentum* in sugar cane juice and molasses media 16 ° Brix, pH 4.5, subjected to the treatment (or not) of the cells in solution of sulfuric acid pH 2.0 + 13% ethanol for

2 hours at 30 °C between the six batch fementative cycles, with a duration of 9 hours each. The presence of contaminants in ethanolic fermentations resulted in a decrease in the fermentation yield, which was most serious when the rough yeast than *L. fermentum* was present. The presence of the bacteria in the fermentation also contaminated with the rough yeast did not potentialize the negative effect on ethanol production. There was no difference between the substrates when comparing the fermentations with and without treatment pH + ethanol. The difference in the ethanol production occurred only when comparing fermentations with and without treatment within the same substrate, because the proposed treatment affected the fermentative metabolism of PE-2 strain. The viability of PE-2 was not affected in both substrates. The proposed treatment could control the *bacteria L. fermentum*, causing cell death, but for the rough yeast strain used was, only a small decrease of its original population was observed.

Keywords: Cell treatment; Substrate; Ethanol

5.1 Introdução

No processo industrial de produção de etanol o fermento é multiplicado no início da safra e segue-se com esta massa de levedura até o final da mesma. A cada término de fermentação, o vinho é centrifugado, ocorrendo a separação da levedura do líquido fermentado. Este líquido é levado para a destilaria e o creme de levedura para a etapa de tratamento ácido, que tem por finalidade eliminar os micro-organismos contaminantes. O reciclo celular tem por objetivo reduzir custos na reposição do fermento, melhorar as condições de operação e adaptar as leveduras às condições fermentativas. Porém, da mesma forma que se recicla a levedura de processo, os contaminantes podem ser reciclados também, iniciando a nova fermentação. Com intuito de controlar esta contaminação, o creme de levedura é enviado para as cubas, onde será diluído e tratado adicionando-se ácido sulfúrico. O pH do meio é acidificado em torno de 2,0-2,5, permanecendo em agitação de uma a três horas, em seguida retornando para a dorna de fermentação .

A lavagem do fermento com ácido sulfúrico é eficiente para o controle de bactérias, sendo o principal método de controle da floculação do fermento. Porém, para as leveduras selvagens este tratamento não tem efeito significativo, tornando-se muito difícil a eliminação dessas leveduras dos processos fermentativos.

Trabalhos anteriores mostraram que o tratamento combinado de pH 2,0 e 13% etanol não afetaram a levedura PE-2, mas significativamente afetou o desenvolvimento da levedura contaminante *Dekkera bruxellensis* (BASSI et al., 2013). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento

combinado baixo pH + etanol para o controle da contaminação por levedura *S. cerevisiae* rugosa e *L. fermentum* em fermentação com reciclo celular em diferentes substratos, caldo e melaço. Optou-se por trabalhar com pH 2,0, que é o valor normalmente utilizado na indústria, adicionando-se etanol na concentração de 13%, como otimizado em experimentos descritos no capítulo anterior.

5.2 Revisão Bibliográfica

Há várias maneiras de se conduzir a fermentação. Atualmente, a maior parte da produção industrial de álcool em grande escala ocorre em processos fermentativos em batelada e contínuos com circulação do fermento. Segundo Amorim (2005), 85% das unidades produtoras de etanol do país funcionam em sistema de batelada, e somente 15% em sistema contínuo. Outra característica das fermentações para a produção de etanol no Brasil é o tipo de mosto, que pode ser constituído de caldo de cana, melaço diluído ou uma mistura de ambos (AMORIM et al., 2011). O caldo de cana-de-açúcar se constitui em ótimo substrato para o crescimento de muitos micro-organismos, em função dos teores de nutrientes orgânicos e inorgânicos, e apresenta alta atividade de água e pH favoráveis (CEBALLOS-SCHIAVONE, 2009). O nitrogênio na forma amoniacal (NH^{4+}) é encontrado no mosto proveniente do caldo de cana, e sua concentração influi sobre o brotamento e a taxa de multiplicação da levedura (TOSETTO, 2008).

O melaço é um subproduto da produção do açúcar, frequentemente utilizado como substrato para a produção de etanol (JIMENEZ; BORJA; MARTÍN, 2004). Segundo Codistil (1978) apud Vasconcelos (1987), o melaço apresenta uma concentração de nutrientes bem mais elevada do que os mostos de caldo de cana, porém não apresenta o nitrogênio em forma adequada para as leveduras, podendo inclusive comprometer a qualidade do álcool.

A contaminação por micro-organismos é um fato comprovado na maioria das usinas produtoras de álcool do país, nas quais o problema pode ser agravado em razão do processo utilizado, que fornece as condições ideais de desenvolvimento da população desses micro-organismos (ALTHERTUM et al., 1984).

A biodiversidade bacteriana nas dornas de fermentação é grande, predominando as bactérias láticas (BASSO et al., 2008). As espécies *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus plantarum* são comuns nas dornas de fermentação para a produção de

etanol. Um total de 489 isolados de bactérias láticas (LAB) foi obtido a partir de quatro destilarias em 2007 e 2008 por Lucena et al. (2010). A abundância de LAB nos tanques de fermentação variou entre 6,0 x 10^5 e 8,9 x 10^8 UFC/mL. Em caldo de cana bruto, os números variaram entre 7,4 x 10^7 e 6,0 x 10^8 UFC/mL. A maior parte das LAB isoladas pertenciam ao gênero *Lactobacillus*, de acordo com perfis de enzima de restrição do RNAr . Uma variedade de espécies de *Lactobacillus* foi encontrada durante todo o processo de produção de etanol, mas as espécies mais frequentemente observadas no final da época de colheita foram *L. fermentum* e *L. vini*. Os diferentes padrões de rep-PCR indicam a co-ocorrência de populações distintas da espécie *L. fermentum e L. vini*, sugerindo uma grande diversidade intra-específica. Isolados representativos de ambas as espécies apresentaram capacidade de crescer em meio contendo até 10% de etanol, sugerindo seleção de etanol bactérias tolerantes ao longo do processo.

Thomas, Hynes e Ingledew (2001) pesquisaram o efeito da cultura mista de *S. cerevisiae* com *L. fermentum* durante 6 reciclos de fermentação em batelada com mosto a base de milho e relataram que a presença da bactéria ocasionou decréscimo na produção de etanol, aumento do desvio de carboidratos para a produção de glicerol e ácido lático e queda acentuada da viabilidade da levedura. Estas bactérias são tradicionalmente classificadas em dois subgrupos metabólicos, de acordo com a via utilizada para metabolizar açúcares hexose: homo- e heterofermentativo (KANDLER, 1983).

As bactérias homofermentativas, através da via Embden-Meyerhof convertem 1 mol de hexoses em 2 moles de ácido lático e não fermentam pentoses ou glucanato. As heterofermerntativas convertem 1 mol de hexoses em 1 mol de CO_2, 1 mol de etanol ou ácido acético, e 1 mol de acido lático através da via 6-fosfoglucanato. As pentoses são convertidas a ácido lático e acético (CHERUBIN, 2003).

Basso et al. (2014) estudaram os efeitos de *L. plantarum,* pertencente ao grupo das homofermentativas, e de *L. fermentum,* representante do grupo das heterofermentativas, sobre o desempenho fermentativo da levedura CAT-1 no processo de produção de etanol. Quando foram inoculados números iguais de leveduras e bactérias, a bactéria homofermentativa foi mais prejudicial para a levedura de processo do que a heterofermentativa. No entanto, nas condições das unidades industriais, alta densidade celular e curto tempo de fermentação, a estirpe

heterofermentativa foi mais prejudicial que a homofermentativa, ocasionando menor rendimento na produção de etanol e produção de glicerol.

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

Com intuito de conter a contaminação bacteriana, as unidades produtoras de etanol realizam um tratamento no fermento com ácido sulfúrico. Em trabalhos realizados por Souza e Mutton (2004), foi observada uma redução de 44,3% da contaminação microbiana em função do tempo e do vigor desse tratamento. Este meio acidificado torna-se também um fator de seleção da população de levedura no processo. Apenas as cepas que melhor se desenvolvem em meios com valores de pH dentro desta faixa são capazes de dominar o processo (ANDRIETTA; ANDRIETA; STUPIELLO, 2011).

Se para bactérias o tratamento com ácido sulfúrico tem eficiência, o mesmo não pode ser observado para leveduras selvagens. Bassi et al. (2013), com o intuito de controlar a levedura *D. bruxelensis*, estudaram um tratamento com pH 2,0 + 13 % de etanol e verificou-se decréscimo em sua população. Esses mesmos autores também verificaram o efeito do metabissulfito de potássio (200 a 400 mg/L) no crescimento de leveduras em co-culturas de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis*, observando que o metabissulfito foi eficaz para controlar o crescimento desse contaminante, porém houve prejuízo para o rendimento fermentativo (BASSI et al., 2015).

Reis et al. (2013), estudando o controle de leveduras rugosas, verificaram que a eficiência fermentativa em fermentações mistas dessas leveduras com a PE-2 foi similar à fermentação não contaminada, devido à utilização de tratamento ácido, pH 1,5, em sistema de batelada com reciclo celular. No entanto, a utilização de pH 1,5 em escala industrial não é desejável, tanto pelo aumento do custo (maior volume de ácido) como pelos problemas operacionais decorrentes da utilização de valor tão baixo de pH. A proposta do presente trabalho é de manter o pH do tratamento ácido

em 2,0, como é normalmente utilizado, e acrescentar etanol, que está disponível na própria unidade de produção, e assim avaliar o desenvolvimento das contaminações por levedura rugosa e *L. fermentum*, tanto em caldo quanto em melaço.

5.3 Material e Métodos

5.3.1 Micro-organismos utilizados

Foram utilizadas as seguintes linhagens de *S. cerevisiae:* PE-2 como levedura de processo e a linhagem rugosa 52 (CCT7787), além da linhagem da bactéria *L. fermentum* CCT5852 (ATCC 19255). As linhagens pertencem ao banco de culturas do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM), CCA/UFSCar – *Campus* de Araras e foram armazenadas em meio YPD a 4°C.

5.3.2 Preparo do inóculo

A fermentação iniciou-se com o preparo do inóculo das leveduras, separadamente, que ocorreu em duas fases. Na primeira fase, a de pré-inóculo, a levedura foi transferida para uma placa de Petri com meio de reativação YPD (em p/v: 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose e 2% ágar) e posteriormente incubada a 30 ºC por 48 horas. Na segunda fase, para obtenção do inóculo, foram transferidas duas alçadas de células da placa de Petri para erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de multiplicação (caldo de cana ou melaço 4 ^{o}Brix, pH 5,0, com solução de sais na proporção de 10 mL/L). A solução de sais foi preparada da seguinte forma: dissolveu-se 50 g de sulfato de amônio, 20 g de fosfato monobásico de potássio, 10 g de sulfato de magnésio, 1 g de sulfato de zinco e 1 g de sulfato de manganês em 500 mL de água destilada, completando-se o volume para 1000 mL. A solução foi esterilizada em autoclave e armazenada a 4 ^{o}C.

Os frascos foram mantidos em incubadora a 30 ºC, sob agitação de 160 rpm, por 24 horas, a fim de se obter a quantidade de massa úmida necessária para a fermentação.

Após a última lavagem, os tubos foram pesados em balança analítica para estimativa do peso da massa úmida no total. Utilizou-se a proporção de 10 g de massa úmida/ litro de meio de fermentação, sendo necessários, portanto, 0,5 g de

massa úmida/ frasco de fermentação, para experimentos feitos em duplicata, ou seja, 0,25 g de massa úmida de cada levedura. Essa massa foi ressuspendida em meio de fermentação (caldo de cana ou melaço 16 ^{o}Brix, pH 4,5, com solução de sais na proporção de 10 mL/L). O número inicial de leveduras na fermentação foi de ~10^8 UFC/mL para PE-2 e ~10^6 UFC/mL para a levedura rugosa.

O inóculo da bactéria *L. fermentum* foi preparado da mesma maneira que para levedura, em duas etapas. Inicialmente, a bactéria foi crescida em meio MRS (peptona proteose: 10,0 g/L; extrato de carne: 10,0 g/L; extrato de levedura: 5,0 g/L; dextrose: 20,0 g/L; polisorbato 80: 1,0 g/L; citrato de amônia: 2,0 g/L; acetato de sódio: 5,0 g/L; sulfato de magnésio: 0,10 g/L; sulfato de manganês: 0,05 g/L; fosfato dipotássico: 2,0 g/L; agar: 12,0 g/L), e incubada a 35 ºC por 48 horas. Posteriormente, a bactéria foi transferida para meio de multiplicação e incubada a 35 ºC, sob agitação de 160 rpm, por 24 horas. Os frascos foram centrifugados e a massa celular foi ressuspendida em meio de fermentação. O número inicial de bactéria na fermentação foi em torno de 10^6 UFC/mL.

O inóculo de leveduras e bactéria foi assim constituído, nas fermentações com diferentes combinações de micro-organismos:

- cultura pura PE-2: 5 mL de massa celular ressuspendida em meio de fermentação;

- cultura mista PE-2 + rugosa, ou PE-2 + *L. fermentum*: 2,5 mL de massa celular, de cada micro-organismo, ressuspendida em meio de fermentação;

- cultura mista PE-2 + rugosa + *L. fermentum*: 1,6-1,7 mL de massa celular, de cada micro-organismo, ressuspendida em meio de fermentação.

5.3.3 Teste fermentativo com reciclo e tratamento das células

A fermentação foi realizada em Erlenmeyers de 125 mL contendo 45 mL de mosto de caldo de cana–de- açúcar ou melaço 16 ºBrix esterilizado, pH 4,5 e solução de sais, em estufa a 30 ºC, em condições de semi-aerobiose (frascos tampados com algodão). A cada 9 horas, o conteúdo dos frascos foi centrifugado a 3400 rpm por 5 minutos, sendo a massa celular tratada com solução de ácido sulfúrico, pH 2,0 e 13% de etanol (v/v), por 2 horas, em agitador a 30 ºC. Após o tratamento, as células foram lavadas duas vezes em água destilada e ressuspendidas em meio de fermentação, iniciando-se novo ciclo fermentativo.

Foram realizados seis ciclos fermentativos de 9 horas cada, realizando-se o tratamento do fermento a cada reciclo. Foram também realizadas fermentações nas mesmas condições, porém sem tratamento celular entre os reciclos.

5.3.4 Análises

Foram coletadas amostras de 1 mL no início dos testes fermentativos (C0) e ao final dos ciclos 3 (C3) e 6 (C6), para a quantificação dos micro-organismos. O conteúdo total do frasco foi em seguida centrifugado a 3400 rpm por 5 minutos, sendo a massa celular submetida ou não ao tratamento celular e inoculada em novo meio de fermentação. O sobrenadante foi analisado quanto ao teor alcóolico, glicerol e açúcares redutores totais.

5.3.4.1 Quantificação de micro-organismos

As amostras de 1 mL coletadas foram diluídas em solução salina, sendo espalhados 100 µL de cada diluição em meio YPD. As placas foram incubadas a 30 ºC por 48-72 horas. A seguir foram contadas as colônias, discriminando-se entre colônias mucosas (PE-2) e rugosas (linhagem 52), nas fermentações com culturas mistas. Para avaliação do crescimento de *L. fermentum,* quando foi o caso, o meio utilizado foi o MRS, sendo as placas incubadas a 35 ºC por 48 a 72 horas. Os resultados foram expressos em UFC/mL.

5.3.4.2 Açúcares redutores totais (ART)

Para a quantificação de açúcares redutores totais utilizou a metodologia de Miller (1959). Inicialmente, para a hidrólise da sacarose, pipetou-se 1 mL de cada amostra do sobrenadante para balões volumétricos de 100 mL, em seguida adicionou-se 30 mL de água destilada e 2,5 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado e homogeneizou-se. Os balões foram levados para banho-maria a 65 °C por 15 minutos. As amostras foram resfriadas em água corrente e em seguida adicionou-se 2,8 mL de NaOH 12 mol/L e completou-se o volume do balão até o menisco com água destilada. Retirou-se 1 mL de cada solução preparada transferindo-se para tubos de ensaio, e neste adicionou-se 1 mL da solução estoque de ADNS e 1 mL de água destilada, totalizando um volume de 3 mL. As amostras foram submetidas ao

banho térmico (água fervente) por 5 minutos, os tubos em seguida foram resfriados em água corrente e receberam 5 mL de água destilada, perfazendo um total de 8 mL. Homogeneizou-se por exatos 5 segundos em vortex e realizou-se a leitura da absorbância a 540 nm em espectrofotômetro digital (Thermo® Biomate 3). O mesmo procedimento foi feito utilizando-se água ao invés da amostra para se obter o branco da reação, que foi utilizado para calibrar o aparelho.

A quantidade de açúcares redutores totais (ART) foi obtida através de uma curva padrão de glicose, pesando-se 1,2 g de glicose previamente seca em dessecador de sílica gel por 7 dias e depois colocada em estufa a 70°C durante 2 horas e novamente levada ao dessecador para ser resfriada. A glicose foi transferida cuidadosamente para um balão volumétrico de 200 mL, completando-se o volume com água destilada. Alíquotas de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 mL desta solução foram transferidas com pipeta graduada de 10 mL, para balões volumétricos de 100 mL, completando-se o volume também com água destilada. Cada mL dessas soluções, considerando-se a diluição, continha, respectivamente, 0,12; 0,24; 0,36; 0,48; 0,60; 0,72; 0,84; 0,96; 1,08; 1,20 mg de glicose. Para a leitura da absorbância a 540 nm, realizou-se o mesmo procedimento anterior. A partir da concentração de glicose e da respectiva absorbância, efetuou-se a regressão linear e determinou-se a correlação (R^2). O cálculo da quantidade de açúcares redutores totais foi realizado da seguinte forma:

$$\text{ART (mg/mL)} = \frac{A_{540\ nm} + 0{,}0589 \times \text{diluição amostra}}{0{,}7445} \qquad (R^2 = 0{,}9998)$$

Foram também analisadas 5 amostras de caldo e melaço quanto à concentração de açúcar redutor (AR) e ART pelo método acima. Para determinação de AR, as amostras não foram previamente hidrolisadas com ácido.

5.3.4.3 Teor alcoólico

Para a análise do teor alcoólico, procedeu-se a destilação de 10 mL das amostras centrifugadas em microdestilador TE-012 (Tecnal) e posteriormente determinou-se o teor alcoólico através da densidade alcoólica obtida em densímetro digital DMA-45 (Anton Paar), conforme Amorim (1997). Os dados de densidade

foram transformados em g de álcool/100mL, de acordo com as tabelas de conversão.

5.3.4.4 Glicerol

A quantidade de glicerol foi determinada no sobrenadante das amostras coletadas nos ciclos fermentativos. Pipetou-se 900 µL de água destilada e 100 µL da amostra em um eppendorf (diluição de 10X). A concentração de glicerol foi determinada por meio do Kit Triglicérides GOD-PAD LaborLab. Foi realizada a leitura da absorbância a 505 nm em espectrofotômetro digital (Thermo® Biomate 3) e a quantidade de glicerol foi expressa em g/100mL.

5.3.5 Cálculo de eficiência fermentativa

Para calcular a eficiência fermentativa utilizou-se a fórmula baseada no cálculo estequiométrico teórico de Gay-Lussac (51,11 g de etanol/100 g de glicose) a seguir:

$$\text{Eficiência fermentativa (\%)} = \frac{\text{Etanol} / (\text{ART}_{\text{inicial}} - \text{ART}_{\text{final}})}{0{,}511} \times 100$$

Foram utilizados os dados de etanol, ART inicial e ART final em g/100 mL, para cada ciclo de cada fermentação, calculando-se ao final, a eficiência fermentativa média (dos 6 ciclos) para cada fermentação.

5.3.6 Análise estatística

Os resultados de eficiência fermentativa foram submetidos à análise de variância, e no caso de diferença significativa, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância, utilizando-se o software Statistica.

5.4 Resultados e Discussão

Foram selecionadas a levedura PE-2, a levedura 52 (representante das linhagens com colônias rugosas) e a bactéria *L. fermentum* para a realização da

fermentação com reciclo celular (seis ciclos de 9 horas), com e sem tratamento do fermento em pH 2,0 + 13% de etanol. A opção por essa linhagem rugosa deveu-se aos resultados apresentados em trabalhos anteriores de caracterização genética (REIS, 2011) e de avaliação das condições do tratamento do fermento para controle da contaminação, conforme descrito no capítulo anterior.

Foram realizadas fermentações com cultura pura da levedura PE-2 e fermentações com cultura mistas da PE-2 e contaminantes (PE-2/52, PE-2/L. fermentum) e (PE-2/52/*L. fermentum*) utilizando caldo de cana e melaço. Primeiramente foram apresentados os resultados das fermentações com mosto de caldo de cana (Figura 1) e posteriormente os resultados das fermentações com melaço.

Analisando-se a Figura 1, verificou-se que a linhagem PE-2 apresentou uma maior produção de etanol quando comparada com as fermentações com os contaminantes, tanto nas fermentações com tratamento quanto naquelas sem tratamento, em caldo de cana. Comparando-se apenas o último ciclo fermentativo (C6), observou-se nas fermentações sem tratamento, a seguinte ondem decrescente de produção de etanol, PE-2 > PE+Lf > PE+Lf+52 > PE+52. A produção de etanol foi menor nas fermentações contaminadas com a levedura rugosa do que com a bactéria. O perfil apresentado pela levedura de colônia rugosa, como fermentação mais lenta, e consequentemente baixa eficiência fermentativa, têm sido frequentemente relatado em casos de contaminação por este biótipo de levedura (CECCATO-ANTONINI; PARAZZI, 1996; REIS et al., 2013). A morfologia celular destas leveduras, com as células agrupadas em cachos ou flocos, dificulta o contato com o meio e os nutrientes, ocasionando uma fermentação mais lenta. A presença dessa levedura na fermentação conduzida pela linhagem industrial PE-2 tem, portanto, influência na produção de etanol e no rendimento fermentativo.

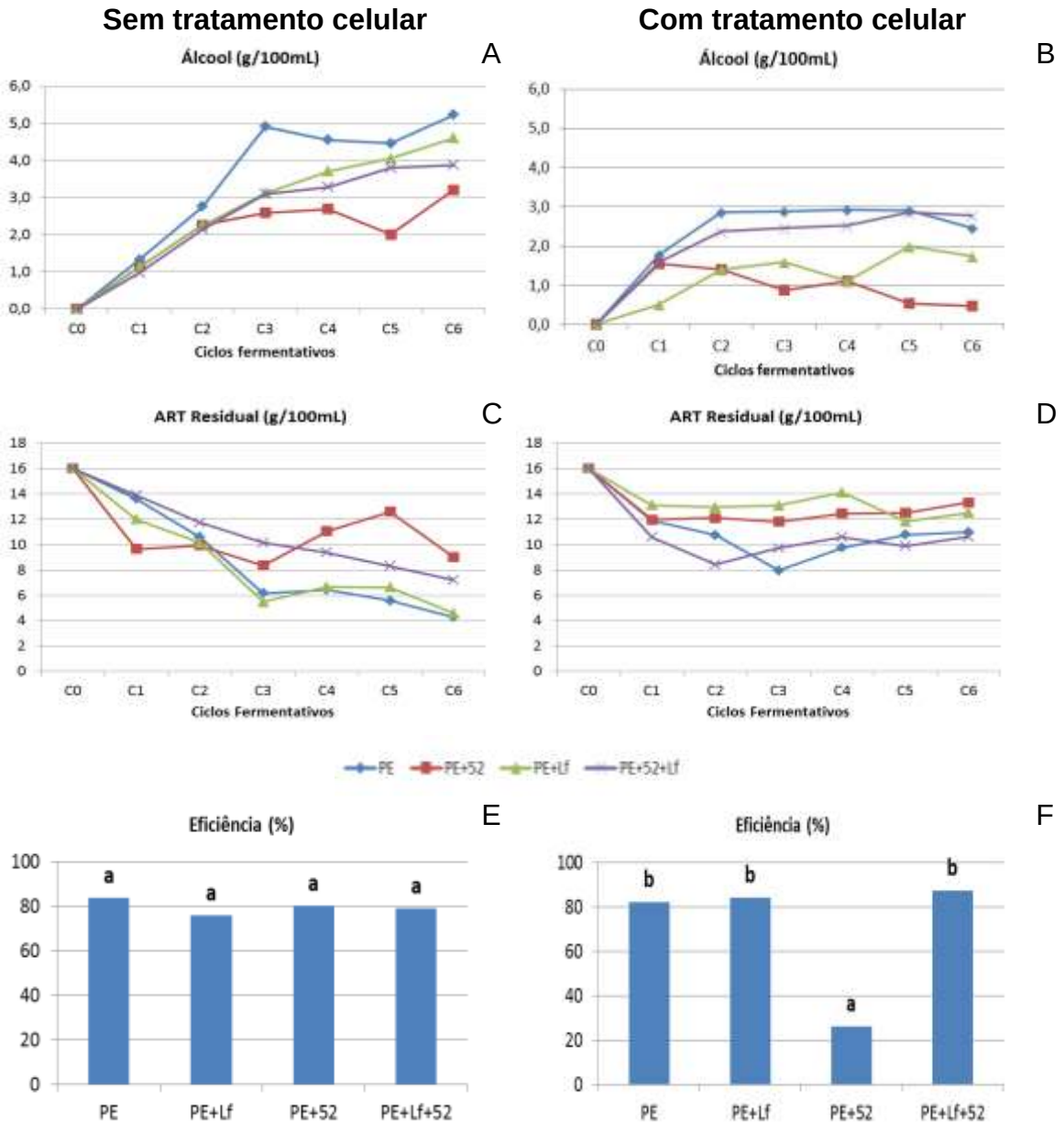


Figura 1 - Teor alcoólico (g/100 mL), ART residual (g/100 mL) e eficiência fermentativa média (%) nas fermentações conduzidas pela linhagem PE-2 e contaminadas com a linhagem rugosa 52 e ou *L. fermentum* (Lf), em meio de caldo de cana 16 ºBrix, pH 4,5, submetidas a tratamento (ou não) das células em solução de ácido sulfúrico pH 2,0 + 13% etanol, por 2 horas, a 30 ºC entre os ciclos fermentativos, ao final de 6 ciclos de fermentação (C1 a C6) em batelada, com duração de 9 horas. C0 refere-se aos resultados no início do 1º. ciclo fermentativo. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey a 5%

No entanto, quando se analisa o último ciclo (C6) das fermentações com tratamento ácido + etanol, obteve-se na fermentação com a cultura mista da rugosa + *L. fermentum*, uma produção de etanol muito próxima da fermentação com cultura pura da PE-2 (Figura 1B). Este fato pode ser justificado devido ao impacto causado

pelo tratamento proposto ao metabolismo da linhagem PE-2, de forma que os resultados de produção de etanol decaíram aos níveis da fermentação contaminada. Houve também uma maior sobra de açúcar nas fermentações com tratamento comparando-se com as fermentações sem tratamento celular (Figura 1D).

Quanto à eficiência fermentativa, foi detectada diferença significativa apenas na eficiência da fermentação PE + rugosa em relação às demais fermentações, as quais não diferiram entre si (Figura 1F).

A Figura 2 traz os resultados das contagens em placas para as linhagens PE-2, rugosa e para o *L. fermentum*. Nas fermentações sem tratamento, de uma forma geral, a levedura PE-2 não teve seu crescimento prejudicado pela presença do contaminante, apresentando o mesmo perfil de crescimento durante os ciclos fermentativos (Figura 2A, 2C, 2E e 2G). Nas fermentações com tratamento celular, em cultura mista com a levedura rugosa 52, observou-se que a levedura do processo teve um decréscimo no número de colônias do inicio para o 3º ciclo (7,30 X 10^7 para 9,90 X 10^6 UFC/mL, Figura 2D), o qual se manteve até o último ciclo fermentativo. A linhagem rugosa apresentou também queda no número de colônias, quando se compara o ciclo inicial com o final (6,60 X 10^6 para 2,85 X 10^5 UFC/mL, Figura 2D).

O tratamento celular proposto controlou o crescimento de *L. fermentum*, pois não foram detectadas colônias da bactéria ao longo dos ciclos seguintes de fermentação (Figura 2F e 2H).

Com o tratamento celular, houve uma queda de 2 ciclos log no número de colônias da levedura PE-2 ao final do 3º ciclo fermentativo quando em cultivo com a bactéria (Figura 2F), provavelmente em decorrência da morte bacteriana, liberando substâncias inibidoras à levedura. Ao final do 6º ciclo fermentativo, o número de células foi recomposto ao valor inicial (Figura 2F). No entanto, quando a levedura PE-2 foi cultivada juntamente com a bactéria e a levedura rugosa, a queda no número de colônias foi muito menor. A levedura rugosa também teve seu crescimento afetado (Figura 2B, 2D e 2H). O tratamento celular foi eficiente para controlar a contaminação por *L. fermentum*, de forma que não houve prejuízo à fermentação pelo efeito da contaminação, em termos de eficiência fermentativa (Figura 1F).

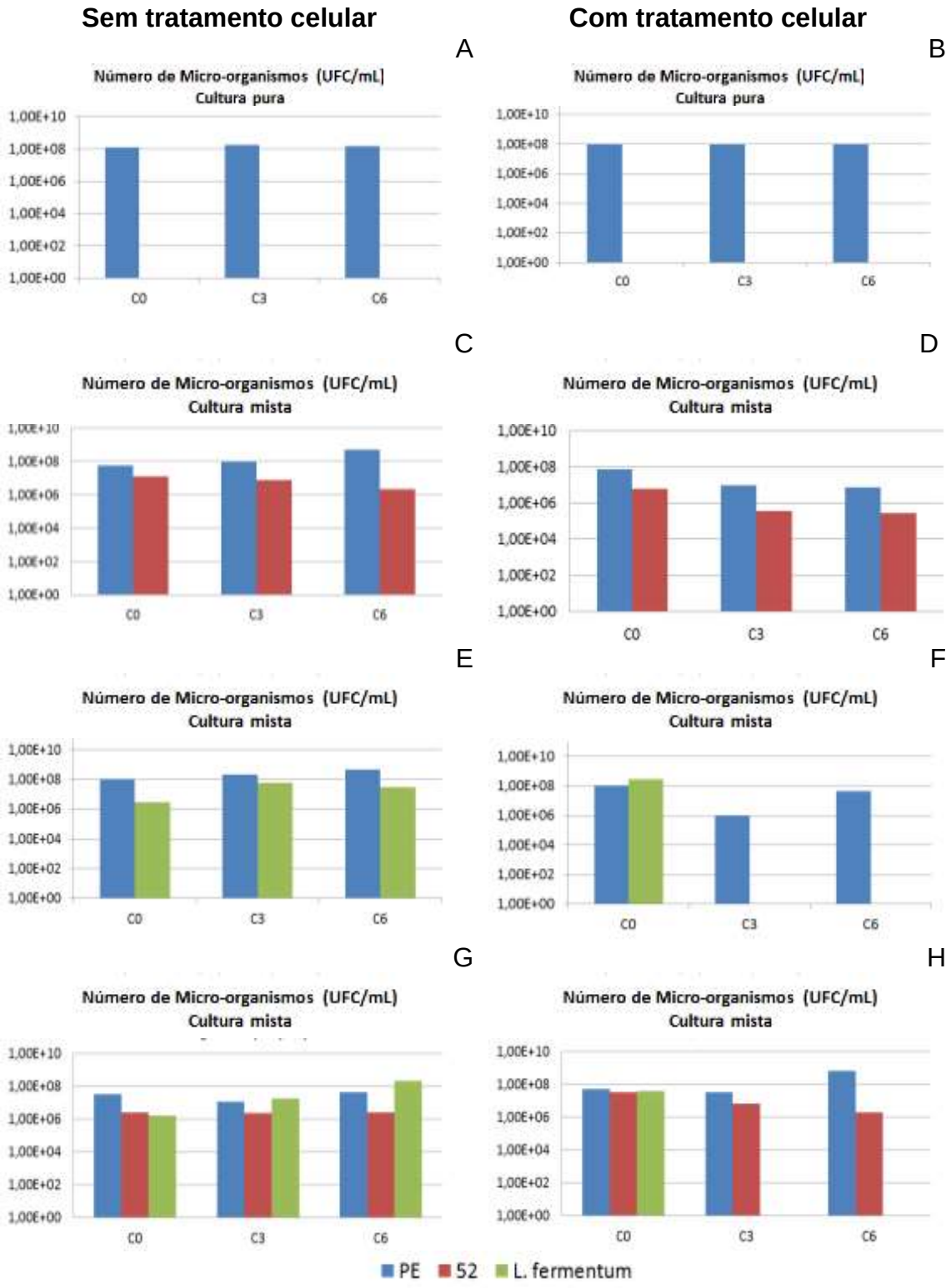


Figura 2 - Número de micro-organismos (UFC/mL) nas fermentações conduzidas pela linhagem PE-2 e contaminadas com a linhagem rugosa 52 e ou *L. fermentum* (Lf), em meio de caldo de cana 16 ºBrix, pH 4,5, submetidas a tratamento (ou não) das células em solução de ácido sulfúrico pH 2,0 + 13% etanol, por 2 horas, a 30 ^{o}C entre os ciclos fermentativos, ao final dos ciclos 3 (C3) e 6 (C6) de fermentação em batelada, com duração de 9 horas. C0 refere-se aos resultados no início do 1º. ciclo fermentativo

Ceballos-Schiavone (2009) realizou testes com diferentes valores de pH (2,5 e 6,0) e concentrações de etanol (15, 20, 25, 30 e 35%) com o intuito de controlar diferentes espécies de *Lactobacillus*, verificando que essas bactérias se mostraram sensíveis as concentrações superiores à 20% (v/v) de etanol, não sendo observados efeitos negativos sobre as células de leveduras quando utilizadas as concentrações de 20 a 25% (v/v). Em pH 2,5, concentração de 20% v/v e 90 minutos de tratamento, a contagem da bactéria diminuiu consideravelmente, chegando a zero em 120 min.

Nos experimentos realizados com ciclos de tratamento celular seguido de crescimento em caldo de cana 4 ^{o}Brix (resultados apresentados no capítulo anterior), a levedura rugosa 52 teve um decréscimo de 3 ciclos log na sua população, comparando-se o número inicial de UFC no primeiro ciclo e ao final da recuperação no quinto ciclo de tratamento. No entanto, as condições testadas neste capítulo são diferentes das condições testadas anteriormente (condições de crescimento X condições de fermentação).

Os resultados das fermentações com melaço estão apresentados na Figura 3. No último ciclo fermentativo, ocorreu uma diferença na ordem decrescente de produção de etanol a partir de melaço, para as diferentes fermentações sem tratamento celular (PE-2 > PE+Lf > PE+52 > PE+Lf+52), comparando-se com o caldo (PE-2 > PE+Lf > PE+Lf+ 52 > PE+52). Com ambos os substratos, houve uma redução na produção de etanol nas fermentações contaminadas com *L. fermentum*, comprovando o efeito negativo causado por esse tipo de micro-organismo (Figuras 1 e 3). Basso et al. (2014) relataram que a contaminação bacteriana traz graves consequências econômicas para os produtores de etanol, pois o carbono do açúcar é desviado da formação do etanol, para a produção de ácido lático e outros compostos.

Os estudos realizados Basso et al. (2014), simulando condições de unidades produtoras de etanol no Brasil, onde prevalecem altas densidades celulares e tempo curto de fermentação, mostraram que as bactérias heterofermentativas (como a *L. fermentum*) foram mais prejudiciais do que as homofermentativas. Na presença desse tipo de bactéria heterofermentativa, houve uma superprodução de glicerol.

Nas fermentações sem tratamento, houve diferença na eficiência das fermentações contaminadas e não contaminadas, especialmente entre PE-2 e PE-2+52, confirmando novamente o impacto desse contaminante (levedura rugosa) nos

sistemas de produção de etanol (Figura 3E).

Nas fermentações com tratamento celular entre os reciclos, a fermentação com dupla contaminação (levedura rugosa e bactéria) apresentou maior produção de etanol, no último ciclo fermentativo (Figura 3B), fato que pode ser atribuído ao controle do crescimento da bactéria por meio do tratamento celular. Isso também é comprovado quando se analisa a eficiência fermentativa, pois não há diferença significativa entre a fermentação pura da PE-2 com as mistas PE-2 + *L. fermentum* e PE-2 + *L. fermentum* + rugosa (Figura 3F).

Em melaço, o crescimento da levedura PE-2 não foi alterado em função das contaminações pela levedura rugosa ou *L. fermentum*, mostrando elevação no número de UFC/mL ao longo dos ciclos fermentativos (Figura 4A, 4C e 4E). No entanto, quando os dois contaminantes estavam presentes houve uma diminuição no número de UFC no 3º ciclo fermentativo, aumentando a seguir (Figura 4G). Com o tratamento celular, a diminuição no número de UFC foi mais evidente para a levedura rugosa do que para a levedura do processo (Figura 4D e 4H). Houve controle total do crescimento de *L. fermentum* utilizando-se o tratamento celular combinado de baixo pH + etanol (Figura 4F e 4H).

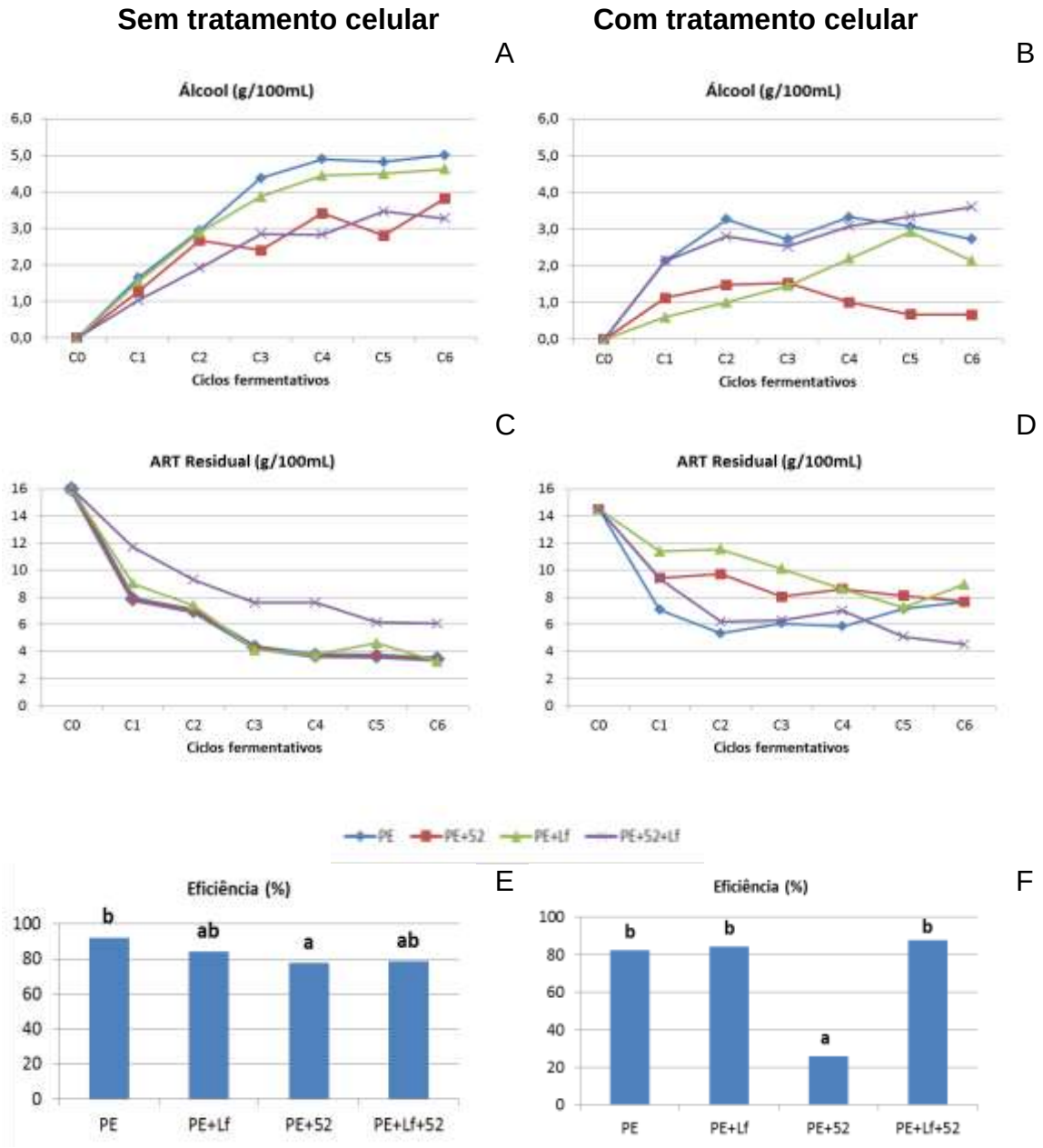


Figura 3 - Teor alcoólico (g/100 mL), ART residual (g/100 mL) e eficiência fermentativa média (%) nas fermentações conduzidas pela linhagem PE-2 e contaminadas com a linhagem rugosa 52 e ou *L. fermentum* (Lf), em meio de melaço 16 ºBrix, pH 4,5, submetidas a tratamento (ou não) das células em solução de ácido sulfúrico pH 2,0 + 13% etanol, por 2 horas, a 30 °C entre os ciclos fermentativos, ao final de 6 ciclos de fermentação (C1 a C6) em batelada, com duração de 9 horas. C0 refere-se aos resultados no início do 1º. ciclo fermentativo. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey a 5%

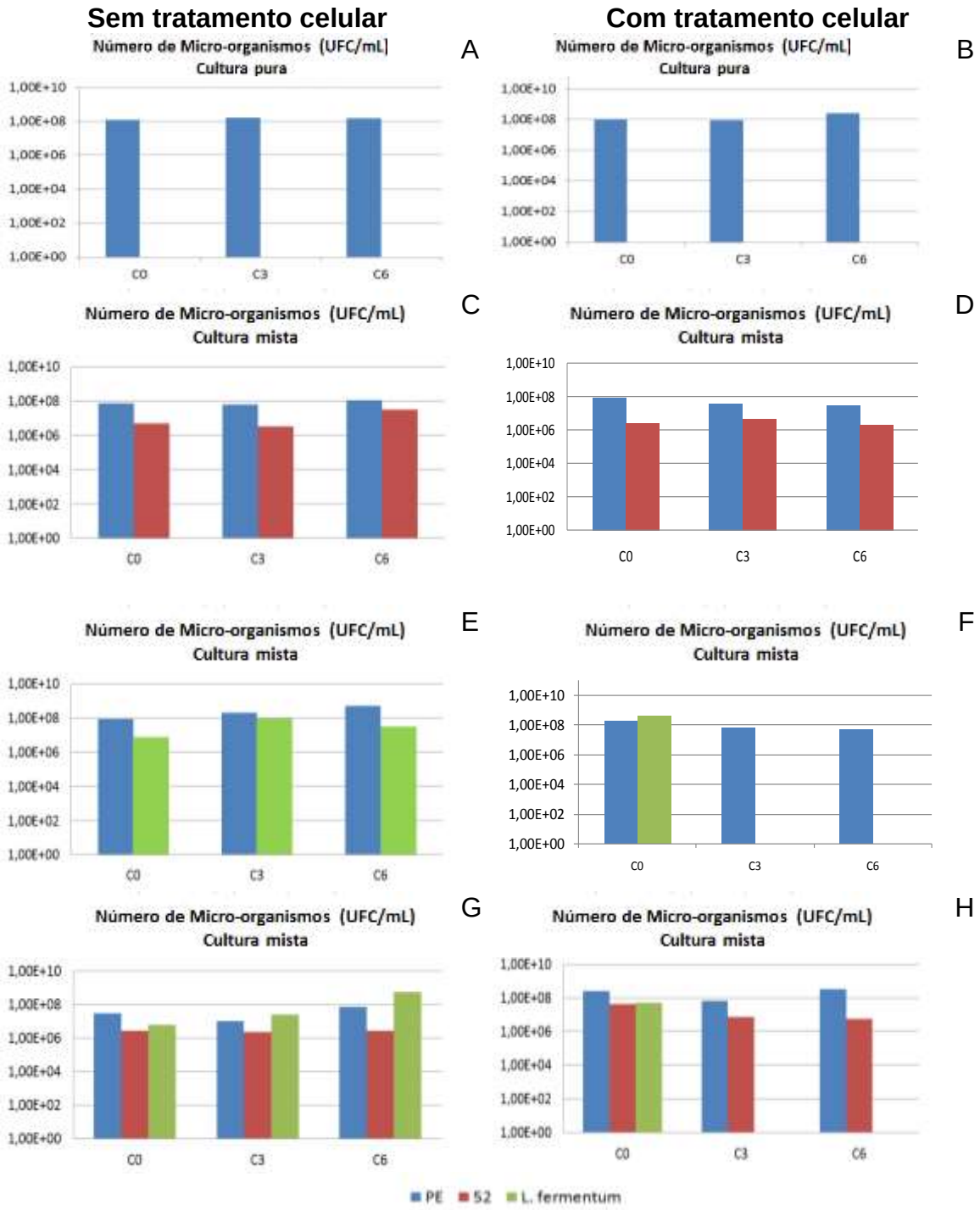


Figura 4 - Número de micro-organismos (UFC/mL) nas fermentações conduzidas pela linhagem PE-2 e contaminadas com a linhagem rugosa 52 e ou *L. fermentum* (Lf), em meio de caldo de melaço 16 ºBrix, pH 4,5, submetidas a tratamento (ou não) das células em solução de ácido sulfúrico pH 2,0 + 13% etanol, por 2 horas, a 30°C entre os ciclos fermentativos, ao final dos ciclos 3 (C3) e 6 (C6) de fermentação em batelada, com duração de 9 horas. C0 refere-se aos resultados no início do 1º. ciclo fermentativo

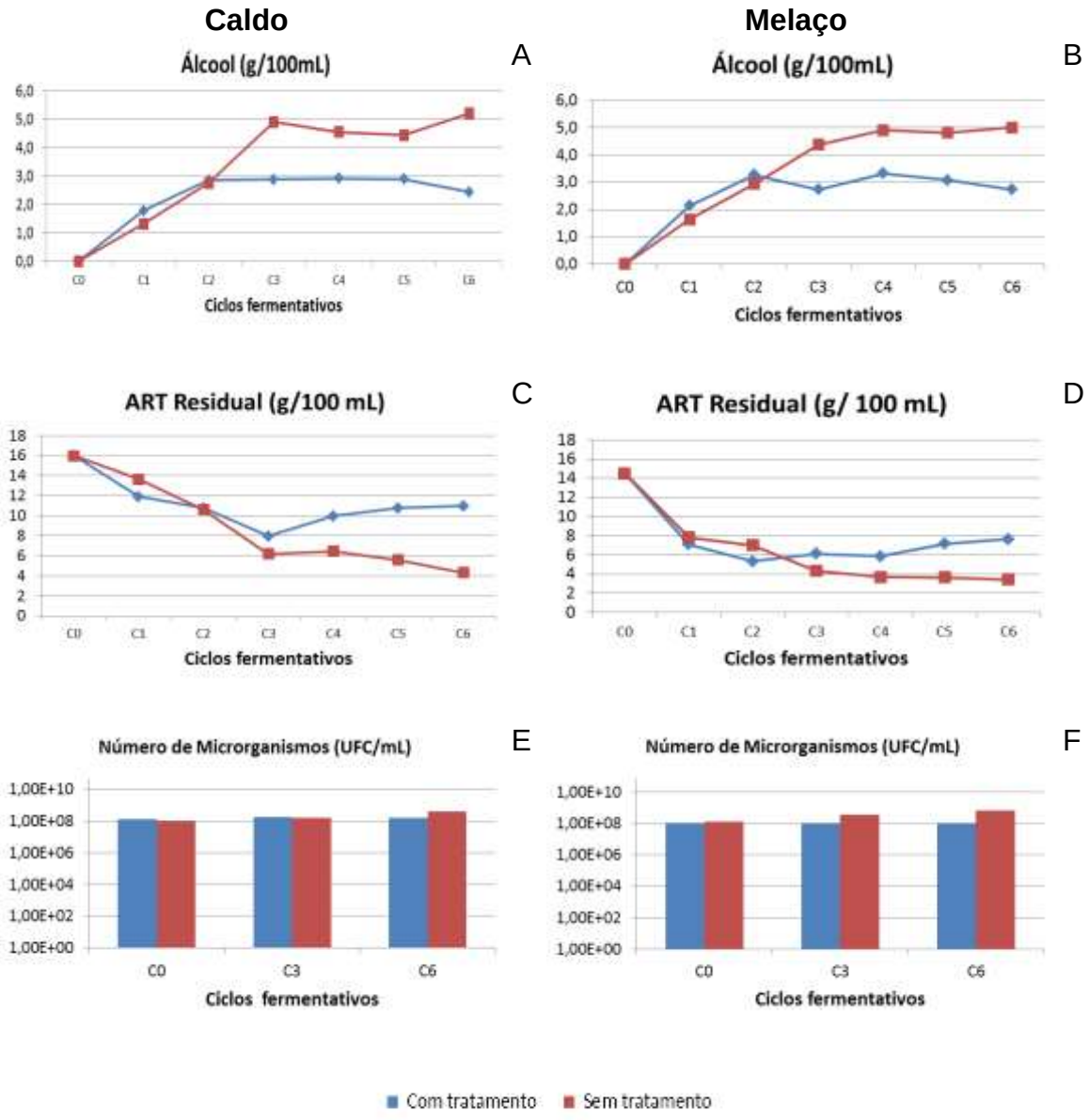


Figura 5 - Teor alcoólico (g/100 mL), ART residual (g/100 mL) e número de leveduras (UFC/ mL) apresentados nas fermentações puras com a linhagem PE-2 em meios de caldo de cana 16 ºBrix e melaço 16 °Brix, pH 4,5, submetidas a tratamento (ou não) das células em solução de ácido sulfúrico pH 2,0 + 13% etanol, por 2 horas, a 30 ^{o}C entre os ciclos fermentativos, ao final de 6 ciclos de fermentação (C1 a C6) em batelada, com duração de 9 horas. C0 refere-se aos resultados no início do 1º. ciclo fermentativo. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey a 5%

Com a finalidade de analisar o efeito do tratamento ácido + etanol especificamente sobre a levedura de processo PE-2 nos dois substratos utilizados, os resultados já apresentados anteriormente foram reunidos na Figura 5 para efeito comparativo. Para ambos os substratos, foi observado que até o 2º ciclo fermentativo não houve diferença entre os valores de álcool com e sem tratamento, porém nos ciclos seguintes, a diferença acentuou-se por causa do efeito do

tratamento sobre a fisiologia da levedura (Figura 5A e 5B), pois não houve influência do tratamento celular sobre o número de UFC/mL da levedura PE-2 (Figura 5E e 5F). A sobra de açúcar redutor foi maior na fermentação com tratamento, tanto em caldo quanto em melaço. No entanto, o consumo de açúcar foi maior na fermentação em melaço do que em caldo (Figura 5C e 5D). Isto pode ser explicado pelo fato de o melaço apresentar maior quantidade de açúcar redutor que o caldo (Tabela 1).

Tabela 1 - Quantificação de açúcares redutores e açúcares redutores totais nos substratos caldo de cana e melaço de cana pelo método do ácido 3,5 dinitrosalicílico

Substrato	Açúcares Redutores Totais (ART, g/100mL)	Açúcares Redutores (AR, g/100mL)
Caldo	16,722	1,018
Melaço	12,424	2,912

A linhagem PE-2 não teve sua viabilidade afetada pelo tratamento ácido + etanol, comprovando o resultado encontrado em teste apresentado no capítulo anterior, quando foi avaliado o efeito do tratamento sobre o crescimento das leveduras. Porém, na fermentação sem tratamento celular, houve crescimento da PE-2 ao final do 6º ciclo fermentativo tanto em caldo quanto em melaço, o que não ocorreu na fermentação com tratamento celular (Figuras 5E e 5F). Bassi et al. (2013) também obtiveram esse resultado, quando foi utilizado esse mesmo tratamento das células entre os ciclos fermentativos. A viabilidade da linhagem PE-2 foi ligeiramente afetada e houve uma diminuição da produção de etanol.

O baixo pH empregado na etapa de tratamento ácido não parece ser o fator que impacta a produção de etanol pela levedura. Gomes (1988) não observou nenhuma ação drástica sobre a viabilidade celular em experimentos de laboratório utilizando *S. cerevisiae* quando o leite de levedura foi tratado em três níveis de pH (2,0, 2,5 e 3,0) ajustados com ácido sulfúrico, porém Nunes et al. (1991) afirmaram que a adição de ácido causa muitas reações químicas que resultam no desequilíbrio do importante sistema enzima-substrato no meio de fermentação. Della-Bianca et al. (2014) verificaram a cinética da perda de viabilidade de células da linhagem PE-2 incubadas a pH 1,5 em condições não-proliferativas e constataram uma capacidade de sobrevivência superior dessa linhagem industrial comparada com uma linhagem

de laboratório, em situação de falta de carbono. Estes resultados indicam que a etapa de tratamento com ácido sulfúrico, utilizado na indústria de bioetanol com o intuito de diminuir a contaminação bacteriana devido às condições não assépticas, pode ser uma importante pressão de seleção exercida sobre as populações microbianas presentes em tais ambientes.

Provavelmente, o agente estressante do tratamento aqui utilizado foi o etanol, pois em fermentações realizadas por Reis (2011) utilizando tratamento das células em solução com pH 1,5, não houve diminuição na produção de etanol com a linhagem PE-2. Por ser um pH muito baixo e pela dificuldade das unidades produtoras de etanol em estar operando com esse tratamento de pH 1,5, optou-se por utilizar o pH que é geralmente utilizado pelas usinas e destilarias (pH=2,0) e acrescentar etanol, que é um produto disponível na unidade produtora. Porém, mais estudos sobre o efeito do etanol combinado com o baixo pH sobre a fisiologia da levedura tornam-se necessários.

Sendo assim, uma possível explicação para os resultados obtidos é que o tratamento pH 2,0 + etanol causou estresse para levedura. Segundo Amorim, Basso e Alves (1996) durante a fermentação, na seqüência de reações de produção de ATP, rotas metabólicas alternativas aparecem para propiciar a formação de materiais necessários à produção de biomassa, bem como para a formação de outros produtos de interesse metabólico (glicerol, ácido succínico e ácido acético), relacionados direta ou indiretamente com a adaptação e sobrevivência, as quais podem reduzir a produção de etanol.

Ainda de acordo com Gombert e Maris (2015), o glicerol é o mais efetivo osmorregulador presente em *S. cerevisiae* e é produzido em situações de estresse osmótico, pois sua formação é aumentada em meios com baixa atividade de água (ou analogamente, alta pressão osmótica) determinada pela presença de soluto, tais como sais e açúcares. Em meios com baixa atividade de água, sua produção sofre influência do pH, temperatura, concentração elevada de sacarose e das linhagens presentes no processo. Quanto maiores os valores destes parâmetros, maior é a produção de glicerol (GUTIERREZ, 1989). A produção de glicerol está também associada ao crescimento da levedura, de forma que a levedura que apresente crescimento mais vigoroso produziria mais glicerol. Além disso, o glicerol também é formado em resposta aos fatores de estresse, como por exemplo, os reciclos celulares na fermentação alcoólica (BASSO et al., 2008).

Os resultados na Figura 6 demonstraram não ocorrer maior produção de glicerol nas fermentações submetidas ao tratamento celular. Houve maior produção de glicerol em melaço que em caldo, e em relação às contaminações, mais glicerol foi produzido quando a levedura rugosa estava presente do que com a bactéria. A maior produção de glicerol em melaço pode ser devido ao fato desse substrato apresentar maior quantidade de sais que o caldo, o que pode causar um estresse osmótico. A menor produção de etanol nas fermentações submetidas ao tratamento celular não deve estar relacionada à produção de glicerol, sendo provavelmente outro fator o causador do desvio nas vias metabólicas de produção de etanol.

A síntese de trealose também ocorre em condições de estresse, sendo esse o mais eficiente sacarídeo na estabilização da membrana quando a levedura é submetida a um estresse osmótico, reduzindo assim possíveis danos em sua estrutura (PANEK et al., 1990). A trealose é um carboidrato de reserva, protegendo as leveduras em situação de estresse como temperatura elevada, toxicidade do etanol, desidratação celular e aumento da pressão osmótica (ALCARDE; BASSO, 1997).

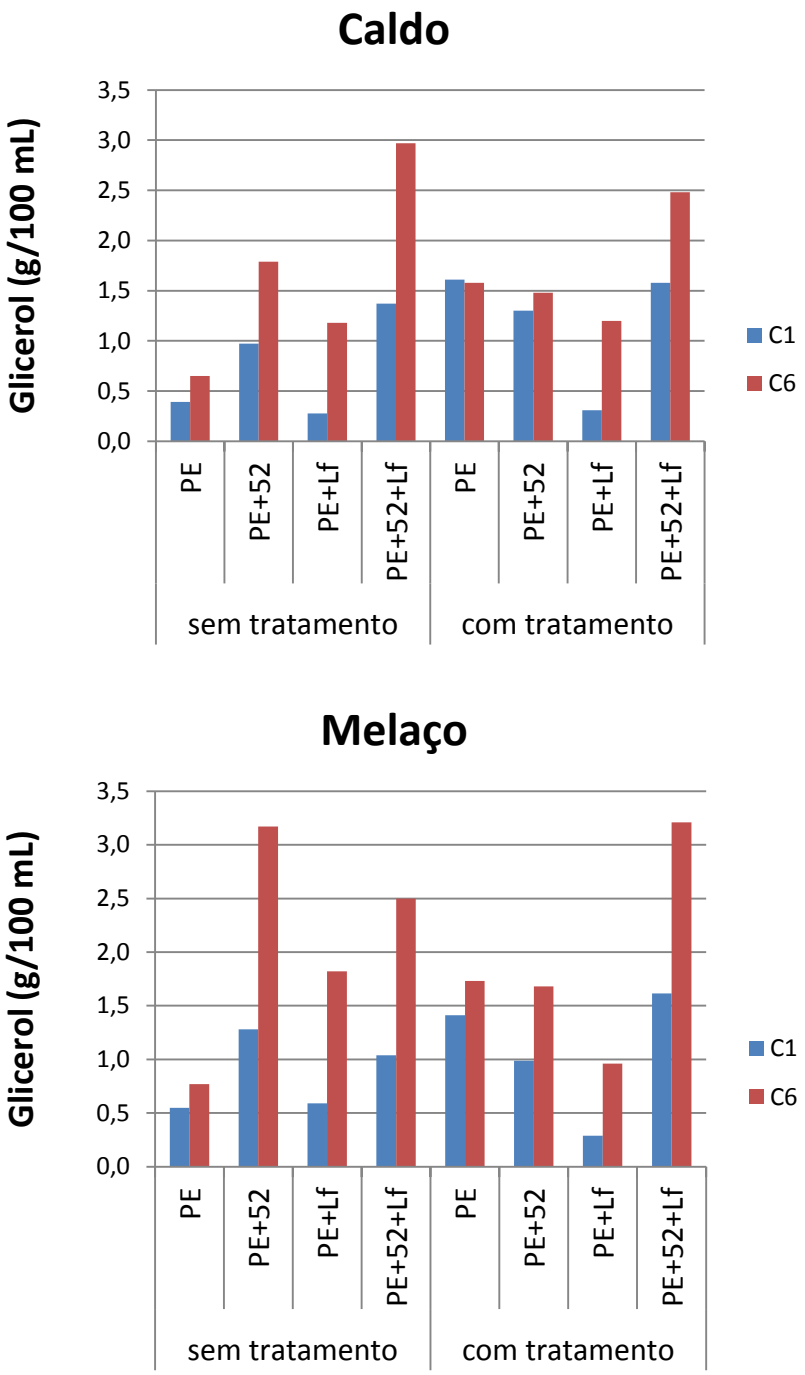


Figura 6 - Glicerol (g/100 mL) produzido durante as fermentações conduzidas pela linhagem PE-2 e contaminadas com a linhagem rugosa 52 e ou *L. fermentum* (Lf), em meios de caldo e melaço 16 ºBrix, pH 4,5, submetidas a tratamento (ou não) das células em solução de ácido sulfúrico pH 2,0 + 13% etanol, por 2 horas, a 30 °C entre os ciclos fermentativos, ao final dos ciclos 1 e 6 de fermentação (C1 e C6, respectivamente) em batelada, com duração de 9 horas

No entanto, apesar da menor produção de etanol nas fermentações submetidas ao tratamento celular com pH 2,0 + 13% etanol, não houve diferença significativa na eficiência fermentativa entre as fermentações da PE-2 sem e com tratamento,

independentemente do substrato de fermentação (caldo ou melaço), Figura 7. O rendimento da fermentação não foi alterado pelo tratamento celular ou pelo substrato, no entanto, houve maior sobra de açúcar residual, o que não é um resultado desejável em situação industrial.

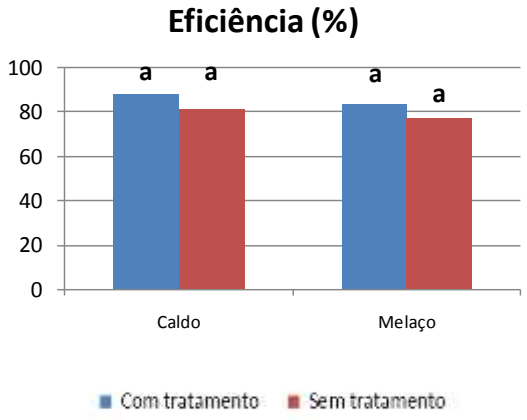


Figura 7 - Eficiência fermentativa média (%) apresentada nas fermentações puras com a linhagem PE-2 em meios de caldo de cana 16 ºBrix e melaço 16 °Brix, pH 4,5, submetidas a tratamento (ou não) das células em solução de ácido sulfúrico pH 2,0 + 13% etanol, por 2 horas, a 30 ^{o}C entre os ciclos fermentativos, em 6 ciclos de fermentação em batelada, com duração de 9 horas cada. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey

Na Figura 8 estão apresentados comparativamente os resultados da produção de etanol nas fermentações contaminadas com a levedura rugosa e ou *L. fermentum*, com e sem tratamento celular, com os substratos melaço e caldo.

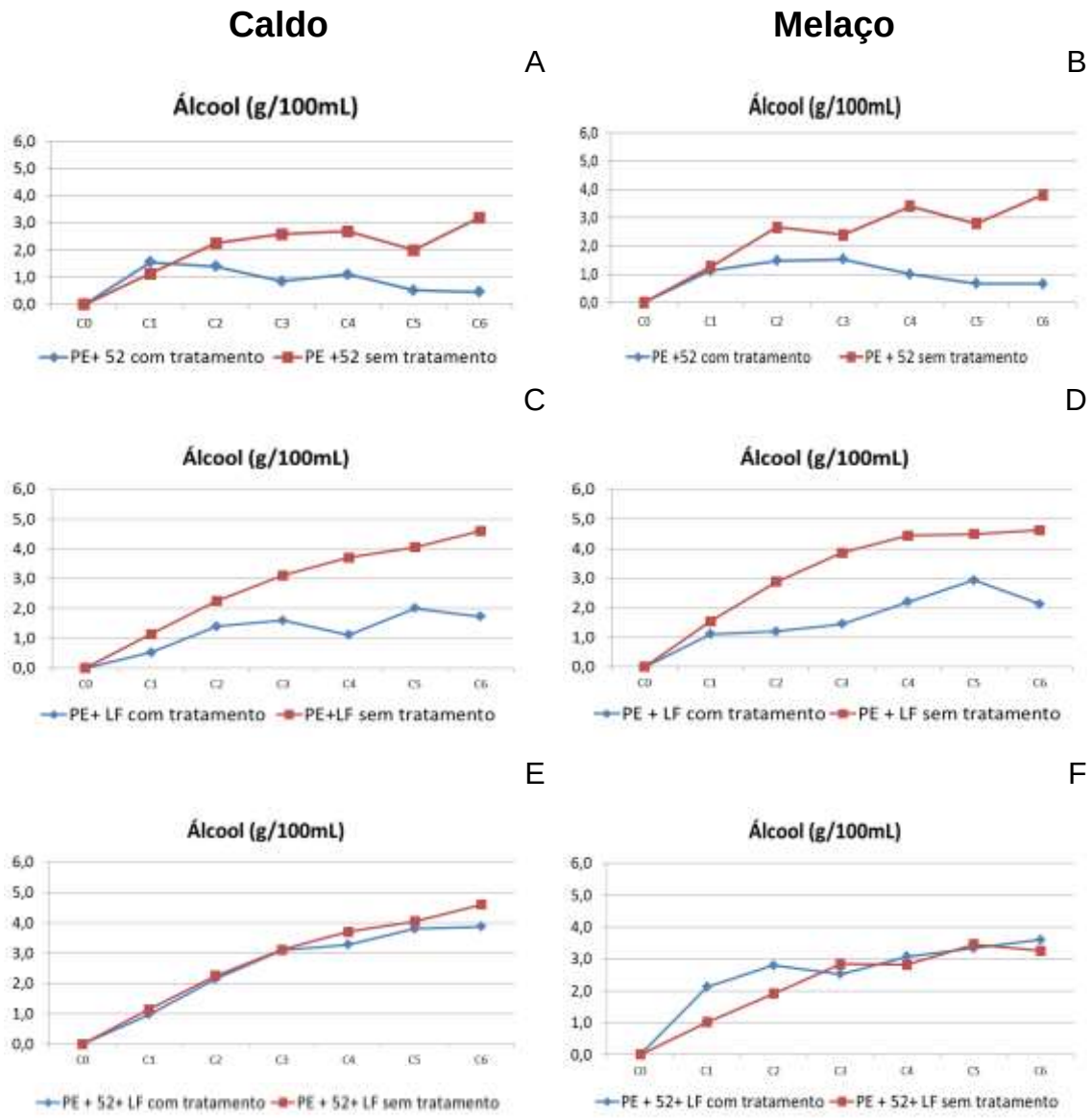


Figura 8 - Teor alcoólico (g/100 mL) apresentados nas fermentações com culturas mistas PE + 52; PE + L. *fermentum*; PE + 52 + *L. fermentum* em meios de caldo de cana 16 ºBrix e melaço 16 °Brix, pH 4,5, submetidas a tratamento (ou não) das células em solução de ácido sulfúrico pH 2,0 + 13% etanol, por 2 horas, a 30 ^{o}C entre os ciclos fermentativos, ao final de 6 ciclos de fermentação (C1 a C6) em batelada, com duração de 9 horas. C0 refere-se aos resultados no início do 1º. ciclo fermentativo. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey a 5%

Não há um efeito expressivo do substrato sobre a produção de etanol nas fermentações contaminadas com a levedura rugosa ou *L. fermentum.* No entanto, verifica-se o efeito marcante do tratamento celular baseado em baixo pH + etanol sobre a produção de etanol, com exceção da fermentação contaminada tanto com a levedura rugosa quanto com a bactéria *L. fermentum* (Figura 8E e 8F). Dois fatos devem ser considerados nessa fermentação contaminada: o tratamento celular

matou a bactéria; e houve diminuição no número de UFC da levedura rugosa (Figura 2H e 4H). Como essa diminuição também ocorreu quando a bactéria não estava presente, então se conclui que o tratamento combinado teve efeito sobre a levedura rugosa, e aliado ao fato da morte bacteriana ter possibilitado a liberação de nutrientes que permitiram o pleno desenvolvimento das reações de produção de etanol, a fermentação transcorreu como 'se não tivesse havido' o efeito do estresse do tratamento celular.

Em resumo, com os resultados apresentados pode-se constatar que o tratamento celular utilizado (pH 2,0 + 13% etanol) entre os ciclos fermentativos para o controle dos contaminantes (levedura rugosa e *L. fermentum*) afetou significativamente os parâmetros fermentativos, com menor produção de etanol e sobra de açúcar redutor, embora não tenha havido diminuição da eficiência fermentativa. Esses resultados foram observados tanto em caldo quanto em melaço, mostrando que o substrato não interferiu no desenvolvimento das contaminações submetidas ou não ao tratamento celular.

5.5 Conclusões

A presença dos contaminantes (levedura rugosa *S. cerevisiae* e ou *L. fermentum*) nas fermentações etanólicas com reciclo celular resultou em queda no rendimento fermentativo, sendo este decréscimo mais agravante quando presente a levedura rugosa do que a bactéria *L. fermentum*. A presença da bactéria *L. fermentum* na fermentação também contaminada com a levedura rugosa não potencializou o efeito negativo sobre a produção de etanol. Não houve diferença entre os substratos caldo e melaço quando se comparou as fermentações com e sem tratamento celular baixo pH + etanol. A diferença na produção de etanol ocorreu apenas quando se comparou fermentações com tratamento e sem tratamento dentro do mesmo substrato, pois se verificou que o tratamento célula proposto afetou o metabolismo fermentativo da linhagem PE-2. A viabilidade da levedura de processo não foi afetada em ambos os substratos. O tratamento proposto conseguiu controlar a bactéria *L. fermentum*, causando morte celular, porém para a levedura rugosa testada, foi verificado apenas um pequeno decréscimo de sua população inicial.

Referências

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

ALTHERTUM, F.; CRUZ, M.R.M. VAIRO, M.L.R.; GAMBASSI, P.M. Efeito dos micro-organismos contaminantes da fermentação alcoólica nas microdestilarias. **STAB – Açúcar Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v.3, n.1, p.42-49, 1984.

AMORIM, H.V. **Introdução à bioquímica da fermentação alcoólica**. Araras: IAA/ Coordenadoria Regional Sul, 1997. 110p.

AMORIM, H.V. **Fermentação alcóolica:** ciência e tecnologia. São Paulo: Fermentec, 2005. 448p.

AMORIM, H.V.; BASSO, L.C; ALVES, D.M.G. **Processo de produção de álcool-controle e monitoramento.** 2 ed. Piracicaba: FERMENTEC/FEALC/ESALQ-USP, 1996. p.59-59.

AMORIM, H.V; LOPES, M.L.; OLIVEIRA, J.V.D.; BUCKERIDGE, M.S.; GOLDMAN, G.H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.91, p.1267-1275, 2011.

ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; STUPIELLO, E.N.A. Bioethanol - what has Brazil learned about yeasts inhabiting the ethanol production processes from sugar cane? In: BERNARDES, M.A.S. (Ed.) **Biofuel production - Recent developments and prospects**. Intech, p.67-84, 2011.

BASSI, A.P.G.; PARALUPPI, A.L.; REIS, V.R.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Potassium metabisulphite as a potential biocide against*Dekkera bruxellensis* in fuel ethanol fermentations. **Letters in Applied Microbiology**. Oxford, v.60, n.3, p.248-258, 2015.

BASSI, A.P.G.; SILVA, J.G.; REIS, V.R.; CECCATO-ANTONINI, S.R. 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 Journal of Microbiology and Biotechnology,** Hull, v.29, n.9, p.1661-1676, 2013.

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

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

CARVALHO-NETTO, O.V.; CARAZZOLLE, M.F.; MOFATTO, L.S.; TEIXEIRA, P.; NORONHA, M.F.; CALDERON, L.; MIECZKOWSKI, P.A.; ARGUESO, J., PEREIRA, G. *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional reprograming due to bacterial contamination during industrial scale bioethanol production. **Microbial Cell Factories**, Barcelona, v.14, p.1-13, 2015.

CEBALLOS-SCHIAVONE, C.H.M. **Tratamento térmico do caldo de cana-de-açúcar visando a redução de contaminantes bacterianos *Lactobacillus* na produção de etanol e eficiência de tratamento do fermento por etanol.** 2009. 177p. Dissertação (Mestrado em Ciencias e Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” USP,Piracicaba, 2009.

CECCATO-ANTONINI, S.R.; PARAZZI, C. Isolamento de levedura selvagem floculante e efeitos da contaminação em processos de fermentação etanólica contínua. In: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DOS TÉCNICOS AÇUCAREIROS DO BRASIL, 6., 1996. Maceio. **Anais...** Maceió: STAB, 1996. p. 23-29.

CHERUBIN, R.A**. Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 2003. 137p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agricola na área de) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

DELLA-BIANCA , B.E; HULSTER, E.; PRONK, J.T.; MARIS, A.J.A.; GOMBERT, A.K. Physiology of the fuel ethanol strain *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 at low ph indicates a context-dependent performance relevant for industrial applications. **FEMS Yeast Research**, Gothenburg, v.14, p.1196-1205, 2014.

GOMBERT, A.K.; MARIS, A.J. Improving conversion yield of fermentable sugars into fuel ethanol in 1st generation yeast-based production processes. **Current Opinion in Biotechnology,** Cambridge, v.33, p.81–86, 2015.

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

GUTIERREZ, L.E. **Estudo comparativo da fermentação alcoólica por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces uvarum.*** 1989*.* 160p. Livre-Docência - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". USP, Piracicaba, 1989.

JIMENEZ, A.M.; BORJA, R.; MARTÍN, A.A. A comparative kinetic evaluation of the anaerobic digestion untreated molasses and molasses previously fermented with *Penicillium decumbens* in batch reactors. **Biochemical Engineering Journal**, Evanston, v.18, n.2, p.121-132, 2004.

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

LUCENA, B.T.L.; DOS SANTOS, B.M.; MOREIRA, J.L.; MOREIRA, A.P.B.; NUNES, A.C.; AZEVEDO, V. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. **BMC Microbiology,** Nottingham, v.10 p.298-306, 2010.

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

NUNES, M.A.; SOUTO, A; ALVES DINIS, N.C.; QUEIROZ, R.M. de; VIEIRA DE MEDEIROS, L.N.. BRITO DE OLIVEIRA, J.P. Processo de eliminação do ácido sulfúrico e outros bactericidas do sistema de fermentação alcoólica Melle-Boinot. Álcool não corrosivo. **Álcool e Açúcar**, São Paulo, v.4, n.22, p.39-50, 1991.

PANEK, A.C.; ARAUJO, P.S.; POPPE, S. C.; PANEK, A.D. On the determination of the trehalose-6-phosphate synthase complex in *Saccharomyces*. I. Interconversion of forms by phosphorylation. **Current Genetics**, New York, v.11, p. 459-465, 1990.

REIS, V.R. **Caracterização de linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de processos fermentativos para produção de etanol.** 2011. 81p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” USP, Piracicaba, 2011.

REIS, V.R.; BASSI, A.P.G.; SILVA, J.C.G.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts exhibiting rough colonies and pseudohyphal morphology with respect to alcoholic fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology,** São Paulo**,** v.44, n.4, p.1121-1131,2013.

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

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

TOSETTO, G.M. **Comportamento de linhagens industriais de *Saccharomyces* frente a compostos inibitórios presentes no melaço de cana-de-açúcar na produção de bioetanol.** 2008. [s.n]. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, 2008.

VASCONCELOS, J.N. Influência da complementação de nutrientes nitrogenados e fosfatados sobre o processo de fermentação alcoólica industrial. **Brasil Açucareiro**, Rio de janeiro, v.4, 5 / 6, n.105, p.41– 48, 1987.

6 ANÁLISE DO CRESCIMENTO E DA ATIVIDADE INVERTÁSICA DE LINHAGENS *DE Saccharomyces cerevisiae* EM CALDO DE CANA E MELAÇO

Resumo

A invertase é uma enzima que hidrolisa a sacarose, originando uma mistura, em quantidades iguais, de glicose e frutose. A eficiente conversão da sacarose em etanol está diretamente relacionada com a atividade dessa enzima, que é diferente para cada tipo de levedura. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o crescimento e a atividade da invertase extracelular (associada à célula) em linhagens selvagens (leveduras rugosas) de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas da fermentação etanólica, em comparação com a levedura industrial PE-2. Foram avaliados dois substratos de crescimento, caldo de cana e melaço, esperando-se contribuir para o entendimento das interações entre leveduras contaminantes e do processo no tocante à utilização do substrato. Observou-se que a atividade invertásica extracelular não foi influenciada pelo tipo de substrato (caldo ou melaço), mas houve diferença na atividade da enzima entre as linhagens rugosas em relação à PE-2, sendo significativamente menor nas linhagens rugosas. Quanto ao crescimento em caldo e melaço, houve diferença entre as linhagens de *S. cerevisiae*, pois as linhagens rugosas apresentaram um maior aumento no número de colônias em melaço do que em caldo no decorrer do tempo de cultivo.

Palavras-chave: Substrato; Invertase extracelular; Leveduras

Abstract

Invertase is an enzyme which hydrolyzes sucrose, yielding a mixture in equal amounts of glucose and fructose. The efficient conversion of sucrose in ethanol is directly related to the activity of this enzyme, which is different for each type of yeast. Thus, the aim of this study was to evaluate the growth and extracellular invertase activity (cell-associated) in wild strains (rough yeast) of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from ethanol fermentation compared to the PE-2 industrial yeast. The growth in different substrates, sugarcane juice and molasses, was evaluated, aiming to contribute to the understanding of the interactions between contaminant yeast strains and the industrial strain regarding the use of the substrate. The extracellular invertase activity was not influenced by the type of substrate (juice or molasses), but there was a difference in enzyme activity between the rough yeast strains compared to the PE-2, significantly lower in rough strains. Concerning the growth in juice and molasses, there were differences among the strains of *S. cerevisiae*, since rough strains showed a greater increase in the number of colonies in molasses than in juice during the cultivation time.

Keywords: Substrate; Extracellular invertase: Yeasts

6.1 Introdução

As leveduras constituem indubitavelmente o grupo mais importante de micro-organismos comercialmente explorados, especialmente em função de sua capacidade fermentativa. Muito se conhece sobre a bioquímica da fermentação alcoólica, porém os mecanismos de controle do processo para que se possa obter o máximo de eficiência ainda carecem de estudos, uma vez que na indústria, a levedura convive com populações de bactérias e leveduras selvagens que competem pelo substrato e produzem metabólitos que afetam o desempenho do fermento.

A eficiente conversão da sacarose em etanol está diretamente relacionada com a atividade da invertase, a enzima que hidrolisa a sacarose, produzindo glicose e frutose em quantidades iguais. Essa enzima pode ser encontrada em leveduras, fungos, bactérias, insetos, mamíferos e vegetais, porém a principal fonte desta enzima são as leveduras.

A levedura *S. cerevisiae* possui dois tipos de invertase: a extracelular e a intracelular, sendo que a forma extracelular (associada à célula) é predominante. Há trabalhos mostrando diferenças na atividade invertásica entre linhagens industriais de *S. cerevisiae*, porém não se conhece relatos de possíveis diferenças na atividade da enzima invertase entre linhagens industriais e selvagens de *S. cerevisiae*, como as leveduras com fenótipo de colônia rugosa tão frequentes na fermentação etanólica.

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento e a atividade da invertase extracelular (associada à célula) em linhagens contaminantes da produção de etanol de *S. cerevisiae*, em comparação com a levedura industrial PE-2. Foram avaliados dois substratos de crescimento, caldo de cana e melaço, esperando-se contribuir para o entendimento das interações entre leveduras contaminantes e do processo no tocante à utilização do substrato.

6.2 Revisão Bibliográfica

A invertase (β- fructofuranosideofrutohidrolase, EC3.2.1.26) pode ser considerada a primeira carboidrase a ser estudada. Em 1828 foi detectada sua atividade, quando se observou que a levedura de panificação fermentava a

sacarose em meio aquoso. Esta atividade foi confirmada em 1933, pela constatação que a levedura hidrolisava a sacarose em condições fermentativas (BARROS, 1990).

Segundo NEUMANN; LAPEN (1967), a invertase é uma enzima que hidrolisa a sacarose, originando uma mistura, em quantidades iguais, de glicose e frutose. Essa mistura de monossacarídeos recebe o nome de açúcar invertido, por apresentar a propriedade de desviar o plano de luz polarizada no sentido anti-horário (levógiro), em contraposição à solução de sacarose de partida para a ação da invertase, que desvia a luz plano polarizada no sentido horário (dextrógiro).

A reação catalisada por esta enzima é normalmente efetuada em pH entre 4,6 e 5,0 e temperatura de 35 a 50 ^{o}C. A levedura *S. cerevisiae* possui dois tipos de invertase: a extracelular e a intracelular, no entanto a maior parte da invertase encontra-se associada à célula, ou seja, é extracelular (PARAZZI, 2006). Algumas propriedades dessas duas formas estão apresentadas na Tabela 1 (GASCON et al., 1981). A invertase externa é localizada na parede celular e associada à manana, sendo consequência da expressão de RNAs com um transcrito maior, o qual é reprimido em altas concentrações de sacarose ou pelos seus produtos de hidrólise. A invertase interna é localizada no citoplasma e não associada à manana, consequência da expressão de RNAs com um transcrito menor (CARLSON; BOTSTEIN, 1982). A eficiência da expressão da invertase requer baixos níveis de glicose e frutose no meio (HERWING et al., 2001).

As moléculas destinadas a se fixarem na parede celular, possuem uma sequência de aminoácidos que direcionam para o retículo endoplasmático, onde se dá a glicosilação (inserção de dez unidades de manana por unidade de enzima), segundo VITOLO (1989). Após ser glicosilada, a invertase externa vai para o complexo de Golgi, sendo armazenada em vesículas secretoras e, finalmente, é descarregada no espaço perisplasmático, durante a gemulação, que é a forma de reprodução assexuada da levedura (PERLMAN; HALVORSON, 1981). A glicosilação das moléculas de invertase externa, a qual não é essencial para a atividade invertásica, confere proteção contra a ação hidrolítica das proteases naturais do micro-organismo (REDDY et al., 1988).

Um aspecto fundamental a se considerado é o fato da invertase interna não estar sujeita à repressão catabólica por hexoses, ocorrendo o contrário com a invertase externa (REDDY et al., 1990).

Tabela 1 - Propriedades da invertase

Propriedade	Invertase externa	Invertase interna
Massa molar (Daltons)	270.000	135.000
% carboidrato	50	3
Atividade especifica (U[1]/mg de proteína)	2700	2900
pH para estabilidade	3,0-75	6,0-9,0
pH ótimo - atividade	3,5-5,5	3,5-5,5

[1]U= micromol de sacarose hidrolisada por minuto/ mL

Fonte: Gascon et al. (1981)

O transporte de sacarose para o interior da célula é diferente para as diversas espécies e entre linhagens da mesma espécie. Há leveduras que não possuem os principais transportadores de hexoses (HXT1-HXT7 e GAL2), e são incapazes de crescer ou fermentar glicose e frutose. De acordo com Batista et al. (2004), há linhagens que fermentam a sacarose devido à absorção direta deste açúcar para dentro da célula, fato este atribuído ao transportador de sacarose. Estas linhagens não necessitam hidrolisar a sacarose para metabolizá-la, ou seja, o fazem em seu citoplasma e, posteriormente, os carboidratos resultantes (frutose e glicose) são utilizados predominantemente pela via glicolítica.

A atividade de invertase das células, assim como a ótima temperatura para crescimento e a velocidade de formação do etanol são dependentes da composição do meio e da linhagem de levedura utilizada (LALUCE et al., 1991). Vários trabalhos têm demonstrado a atividade invertásica em *S. cerevisiae* e a influência de fatores ambientais.

Vitolo (1987) estudou a atividade de invertase de células de *S. cerevisiae* em melaço de cana, em testes com cultura continua constante e não-constante e concluiu que durante o cultivo contínuo de leveduras, a parede celular e o espaço periplasmático são submetidos a mudanças morfológicas contínuas, as quais afetam a interação entre a invertase e moléculas de sacarose, conduzindo à oscilação da atividade invertásica.

Bokassa et al. (1993) estudaram uma linhagem de *S. cerevisiae* (01k32) com grande potencial para a síntese de invertase, observando que um meio de melaço

com 3% de ART é um substrato ideal para uma rápida promoção dessa enzima. Takeshige; Ouchi (1995) estudaram os efeitos da invertase de levedura na produção de etanol em meio de melaço. Seus estudos mostraram que, em condições atípicas para o processo de fermentação alcoólica, ou seja, melaço com 30% de sacarose, este pode exercer atividade inibitória, seja por excesso de sais, falta de nutrientes ou osmolaridade, sendo este último causado, possivelmente, pela concentração de glicose e frutose no meio fermentativo.

6.3 Material e Métodos

6.3.1 Linhagens

Foram utilizadas linhagens pertencentes ao banco de culturas do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM), UFSCar-Campus de Araras, da espécie *S. cerevisiae* (linhagens 7 - CCT7789, 36 - CCT7788 e 52 - CCT7787, apresentando colônias rugosas e células em pseudohifas; e PE-2, colônia mucosa e células dispersas), conforme descritas em Reis (2011). Essas linhagens foram armazenadas em meio YPD a 4°C.

6.3.2. Preparo do inóculo

Para os testes de crescimento em meio de caldo de cana e em melaço, as leveduras foram primeiramente reativadas, transferindo-as para placas de Petri com meio de cultura sólido YPD (em p/v: 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose e 2% ágar) e incubando-se a 30 °C por 48 horas. Em seguida, duas alçadas foram retiradas e colocadas em tubos falcons contendo 15 mL de meio caldo de cana 4 °Brix, acrescido de 1% de solução de sais esterilizada (50 g de sulfato de amônio, 20 g de fosfato monobásico de potássio, 10 g de sulfato de magnésio, 1 g de sulfato de zinco e 1 g de sulfato de manganês em volume final de 1000 mL), e levados para agitação em *shaker* a 30 °C, 160 rpm, *overnight*. Após o crescimento do inóculo, uma alíquota de 5 mL foi centrifugada a 3400 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e a massa, em torno de 100 mg, foi resuspendida em 100 µL de cada meio de crescimento 4° Brix (caldo ou melaço) e em seguida inoculada nos frascos para crescimento.

6.3.3 Curvas de crescimento

Foi avaliado o perfil de crescimento das linhagens em melaço e caldo de cana-de-açúcar 4 °Brix (pH 5,5) ao longo do tempo de cultivo, utilizando-se frascos erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura (volume final). Os frascos foram mantidos a 30 ^{o}C, 160 rpm de agitação, por 72 horas, sendo retiradas amostras (5 mL) de doze em doze horas. O crescimento das linhagens de leveduras *S. cerevisiae* foi avaliado por plaqueamento em meio YPD (incubação a 30 ^{o}C por 48 horas), após diluição seriada das amostras.

6.3.4 Atividade da invertase extracelular

A atividade da enzima invertase *in vivo* associada às células da levedura foi determinada segundo protocolo de Silveira, Carvajal e Bom (1996). As células das leveduras crescidas em caldo de cana e melaço foram coletadas (10 mL) por centrifugação a 4 ^{o}C, após 9 horas de cultivo. As células foram pesadas para estimativa do peso úmido da biomassa (em g/L), padronizando-se para cerca de 500-700 mg de massa úmida. O sedimento celular foi lavado duas vezes com tampão acetato de sódio 50 mM gelado, pH 5,0, e ressuspendido no mesmo tampão, no mesmo volume (10 mL). A seguir, 8 mL da suspensão celular foi incubada com 2 mL de solução de fluoreto de sódio 250 mM, a 30 ^{o}C por 30 minutos, sob agitação. A atividade da invertase foi iniciada pela adição de 4 mL de uma solução de sacarose 300 mM preparada em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. A reação foi incubada a 30 ^{o}C, sob agitação, e amostras de 1 mL foram retiradas e filtradas em membrana de porosidade 0,45 µm em intervalos de tempo de 0, 2, 4, 6, 8 e 10 minutos. A concentração de glicose no filtrado foi determinada por meio do Kit Glucose Liquicolor InVitro®. Os valores obtidos no kit (em mg/dL) foram divididos por 100 para obter os valores em g/L.

Os ensaios foram realizados em duplicata. As médias apresentadas da atividade enzimática são resultantes de dois testes realizados independentemente.

O cálculo da atividade invertásica foi feito da seguinte forma:

1- Foi realizada a regressão dos dados “g/L de glicose versus tempo de reação”. O eixo X foi constituído dos valores de tempo 0, 2, 4, 6, 8 e 10

minutos, e o eixo Y dos valores correspondentes de glicose determinados no kit, em g/L.

2- O coeficiente angular da equação da regressão foi considerado como a atividade invertásica em g glicose/L/minuto (A1).

3- O cálculo da atividade invertásica extracelular em g glicose/h/g biomassa foi feito da seguinte maneira: [(A1 X 60) / biomassa úmida em g/L]

A atividade da enzima foi reportada como gramas de glicose produzida por hora por grama de célula (peso úmido).

6.3.5 Análise estatística

Os resultados das atividades enzimáticas foram submetidos à análise de variância, e no caso de diferença significativa, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância, utilizando-se o software *Statistica*.

6.4 Resultados e Discussão

Os resultados do crescimento das linhagens rugosas e mucosa de *S. cerevisiae* em caldo de cana e melaço estão representados na Figura 1. A linhagem industrial PE-2 cresceu de forma similar em caldo e melaço, atingindo o pico de crescimento em 9 horas de cultivo. Segundo Vasconcelos (1987), o melaço apresenta uma concentração de nutrientes bem mais elevada do que os mostos de caldo de cana, porém não apresenta o nitrogênio em forma adequada para as leveduras. Com o experimento realizado, pode-se verificar que o melaço não influenciou o crescimento da linhagem PE-2, porém afetou a fermentação, como demonstrado no Capítulo 1.

As linhagens rugosas apresentaram crescimento similar em caldo e melaço somente nas primeiras horas de cultivo, a seguir, o número de UFC/mL aumentou mais em melaço do que em caldo de cana. Para a linhagem 52, não houve diferença no crescimento até 3 horas; para as linhagens 07 e 36, o crescimento foi similar até 9 horas de cultivo. A linhagem 52 teve o crescimento estabilizado dentro de 24 horas de cultivo, porém as linhagens 07 e 36 não apresentaram estabilização no número de colônias, mostrando um crescimento mais lento em ambos os substratos. Esse

desenvolvimento mais lento dessas linhagens pode estar ligado com a atividade da invertase de cada linhagem, que pode ter velocidades de hidrólise de sacarose distintas.

Os resultados da atividade invertásica para as diferentes linhagens de *S. cerevisiae* estão apresentados na Tabela 1. Verificou-se que as linhagens rugosas apresentaram uma atividade da invertase inferior à da linhagem PE-2, com exceção da linhagem rugosa 52, cuja atividade enzimática não diferiu da atividade da PE-2. A atividade invertásica extracelular para as linhagens de *S. cerevisiae* foi determinada nas células coletadas ao final de 9 horas de cultivo, ou seja, ao final da fase exponencial de crescimento para a linhagem industrial e linhagem rugosa 52. Em 9 horas de cultivo, as linhagens 07 e 36 ainda estavam em fase ativa de crescimento. Esse crescimento lento da linhagem 36 também foi observado nos experimentos de crescimento em meios com glicose ou sacarose como única fonte de carbono (CARVALHO, 2014).

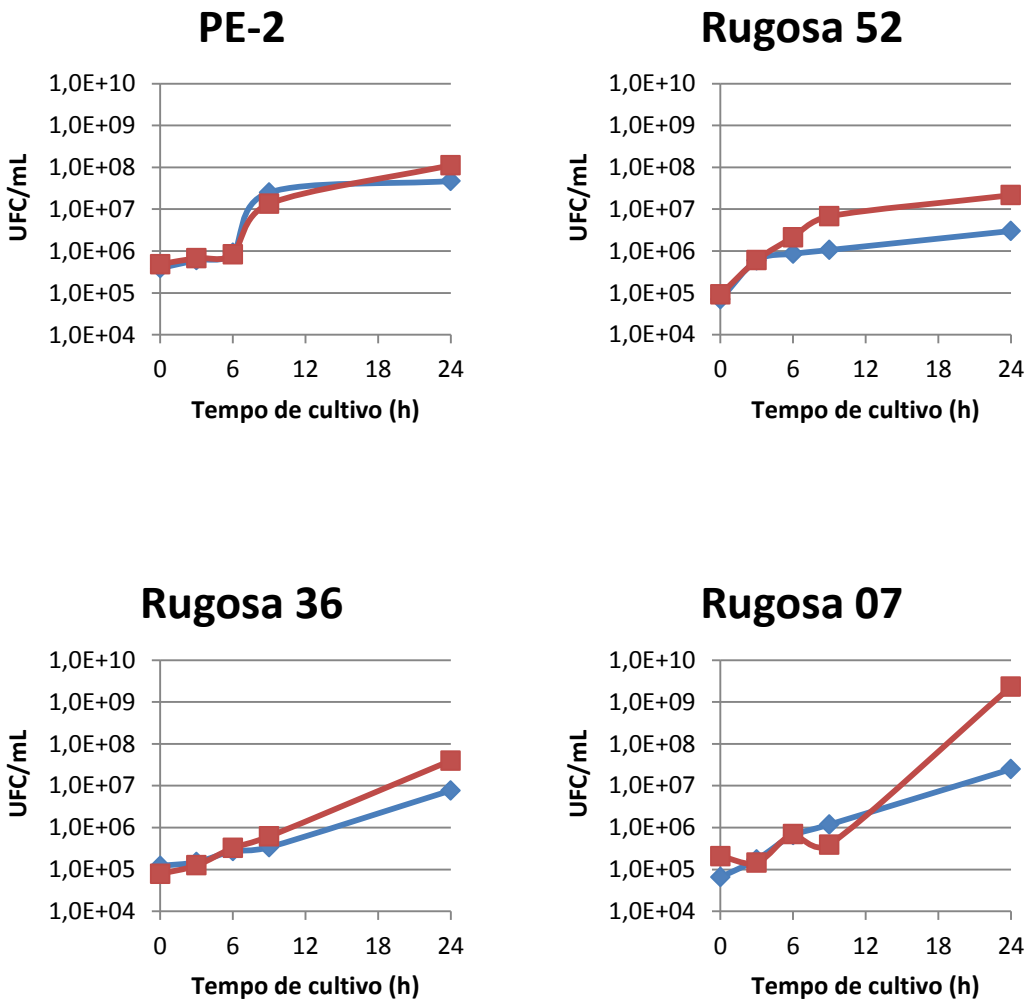


Figura 1 - Curvas de crescimento das linhagens de *S. cerevisiae* em meio de caldo de cana (em azul) e melaço (em vermelho), 4 °Brix, pH 5,5, a 30 °C, 160 rpm de agitação

Tabela 1 - Atividade da enzima invertase (g de glicose/hora/g de biomassa úmida) em células de *S. cerevisiae* crescidas em melaço e caldo de cana, após 9 horas de cultivo a 30 °C, 160 rpm de agitação[1]

Linhagem	Substrato de crescimento		Média
	Caldo	Melaço	
PE-2	0,648	0,427	0,537 b
Rugosa 52	0,370	0,397	0,383 ab
Rugosa 36	0,229	0,340	0,284 a
Rugosa 07	0,151	0,198	0,175 a
Média	0,350 A	0,340 A	

[1] Letras maiúsculas na linha ou minúsculas na coluna indicam diferença significativa entre as médias a 5% de significância

Parazzi (2006) verificou que 95,6% da enzima invertase na linhagem PE-2 estava associada às células e somente 6% no vinho delevedurado e 0,4% no tampão de lavagem, após um ciclo fermentativo em substrato misto caldo e melaço (1:1). Esse autor obteve resultado superior de atividade invertásica extracelular para a levedura PE-2 (2,39 g ART/hora/g biomassa úmida), porém em condições de fermentação.

Leveduras industriais apresentaram diferentes atividades de invertase (BG-1= 7,34; FLEISCHMANN= 5,75; CAT-1= 3,76; PE-2= 2,39 g ART/h/g biomassa), apresentando diferentes velocidades de hidrolise da sacarose tanto em meio de crescimento como em mostos (PARAZZI, 2006). Sendo assim, o autor concluiu que a atividade de invertase é dependente da linhagem de levedura, assim como a velocidade de metabolização dos açucares em meios de crescimentos e mosto.

A diferença entre as atividades invertásicas das linhagens rugosas em relação à linhagem industrial PE-2 é maior em caldo de cana do que em melaço. Como as linhagens rugosas apresentam uma atividade invertásica inferior à da linhagem industrial em caldo de cana, é de se esperar que cresçam melhor em melaço do que em caldo de cana pela maior disponibilidade de açúcar redutor livre no melaço, como os resultados apresentados no Capítulo 3.

Bokassa et al. (1993), estudando uma linhagem de *S. cerevisae* (01K32) com grande potencial para a síntese de invertase, observaram que um meio com 3% de açúcar redutor total (ART) é o substrato ideal para uma rápida produção dessa enzima. Estudos envolvendo adição de invertase comercial no melaço comprovaram que deve haver um equilíbrio entre concentração de invertase e monossacarídeos formados, caso contrário, há aumento na pressão osmótica do meio e, consequentemente, um menor rendimento em etanol. Esta pode ser uma possível explicação para o baixo rendimento da levedura PE-2 nas fermentações com melaço descritas no Capitulo 1, em ciclo único de fermentação.

Basso e Amorim (1998) estudaram o comportamento de diferentes linhagens de leveduras (PE-2, VR-1, BG-1 e CR-1) quanto ao desempenho fermentativo e a hidrolise da sacarose em mosto com 17,8% de ART, concluindo que todas as leveduras apresentam um excelente desempenho fermentativo, porem as linhagens BG-1, CR-1 e SA-1 hidrolisaram a sacarose em 2 horas, enquanto a PE-2 e VR1 em 6 horas.

A menor atividade invertásica apresentada pelas linhagens rugosas em relação à linhagem industrial PE-2 merece investigação mais aprofundada, a fim de verificar quais são as condições ambientais em que essa atividade poderia ser aumentada. Se isso acontecesse, é possível que os efeitos prejudiciais da contaminação pela levedura rugosa pudesse ser atenuado.

6.5 Conclusões

Houve diferença entre as linhagens de *S. cerevisiae* quanto ao crescimento em diferentes substratos, pois as linhagens rugosas apresentaram um maior aumento no número de colônias em melaço do que em caldo no decorrer do tempo de cultivo. A atividade invertásica extracelular (associada às células) não foi influenciada pelo tipo de substrato (caldo ou melaço), porém houve diferença na atividade da enzima entre as linhagens rugosas e a levedura PE-2, sendo significativamente menor nas linhagens rugosas, o que pode explicar o crescimento mais lento apresentado por essas linhagens em comparação com a linhagem industrial.

Referências

BARROS, D.B. **Imobilização da invertase em quitina de Krill** (*Euphasia superbal*). 1990. 121p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1990.

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. **Estudo comparativo de leveduras industriais quanto ao desempenho fermentativo e hidrólise de sacarose.** Piracicaba: ESALQ, 1998. p.125-136. (Relatório anual de pesquisas em fermentação alcoólica: 1995).

BATISTA, A.S.; MILETTI, L.C.; STAMBUK, B.U. Sucrose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* lacking hexose transport. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, Norwich, v.8, p.26-33, 2004.

BOKASSA, I.P.; KRASTONOV, A.I.; ROCHKOVA,Z.; ANGELOV, A.A Biosynthesis of invertase by *Saccharomyces cerevisiae* with sugarcane molasses as substrate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Hull, v.9, n.6, p.662-663, 1993.

CARLSON, M.; BOTSTEIN, D. Two differentially regulated mRNAs with differente 5´ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. **Cell**, Cambridge, v. 28, p.145-154, 1982.

CARVALHO, I.G.B. **Avaliação da competitividade de leveduras selvagens *Saccharomyces cerevisiae* isoladas da fermentação alcoólica.** Araras: UFSCar/FAPESP, 2014. 40p. (Relatório).

GASCON, S.; NEUMANN, N.P.; LAMPEN, J.O. Comparative study of the properties of the purified internal and external invertase from yeast. **The Journal of Biological Chemistry,** Bethesda, v.3, p.33-38, 1981.

HERWING, C.; DOERRIES, C.; MARISON, I.; VON-STOCKAR, U. Quantitative analysis of the regulation scheme of invertase expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.76, n.3, p. 247-258, 2001.

LALUCE, C. PALMIERI, M.C.; CRUZ, R.C.L. Growth and fermentation characteristics of new selected straing of *Saccharomyces* at high temperatures and high cell densities. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 37, p. 528-536, 1991.

NEUMANN, N.P.; LAPEN, J.O. Purification and properties of yeast invertase. **Biochemistry**, Moscow, v.6, p.468-475, 1967.

PARAZZI, J.O**. Metabolização do açúcar de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com e sem transportador de sacarose e diferentes atividades de invertase**. 2006. 106p. Dissertação(Mestrado em Ciencia e Tecnologia de Alimentos) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

PERLMAN, D.; HALVORSON, H.O. Distinct repressible mRNAs for cytoplasmatic and secreted yeast invertase are encoded by a single gene. **Cell**, Cambridge, v.25, n.2, p.525-536, 1981.

REDDY, A.; JOHSON, R.S.; BIEMANN, K.; WILLIAMS, R.S.; ZIEGLER, F.D.; TRIMBLE, R.B.; MAEY, F. Characterization of the glycosylation sites in yeast external invertase. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.263, n.15, p. 6978-6985, 1988.

REDDY, A.; MACCOLL, R.; MARLEY, F. Effect oligossaccharides and chloride on the oligomeric strutures of external, internal and deglycosylated invertase**. Biochemistry**, Moscou, v.29, n.10, p.2482-2487,1990.

SILVEIRA, M.C.F.; CARVAJAL, E.; BOM, E.P.S. Assay for in vivo yeast invertase activity using NaF. **Analytical Biochemistry**, New York, v.238, p.26-28, 1996.

TAKESHIGE, K.; OUCHI, K. Effects of yeast invertase on ethanol in molasses. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 79, n.5 p.513-515, 1995.

VASCONCELOS, J.N. Influência da complementação de nutrientes nitrogenados e fosfatados sobre o processo de fermentação alcoólica industrial. **Brasil Açucareiro**, Rio de janeiro, v.4, 5 / 6, n.105, p.41–48, 1987.

VITOLO, M. **Efeito do pH e da aeração sobre a atividade invertásica de celulas inatctas de levedura obtidas por cultivo descontínuo.** 1989. 140p. Tese (Livre Docencia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São, 1989.

VITOLO, M.; VAIRO, M.L.R.; BORZANI, W. Invertase activity of intact cells of *Saccharomyces cerevisiae* growing on sugarcane molasses. II. Unsteady-state continuous culture tests. **Biotechnology and Bioenginnering,** New York**,** v.30, p.9-14, 1987.

7 CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos na presente tese permitem concluir que o tipo de substrato de fermentação, caldo de cana ou melaço, influencia o desempenho da linhagem industrial PE-2 assim como afeta o desenvolvimento das contaminações com as leveduras rugosas *S. cerevisiae* na presença ou ausência da bactéria *L. fermentum*, em fermentações sem reciclo celular. De uma forma geral, as linhagens rugosas e *L. fermentum* cresceram melhor em melaço do que em caldo. O efeito da contaminação foi mais evidente quando se utilizou caldo de cana do que melaço como substrato, no caso da contaminação com leveduras rugosas, e o inverso no caso da contaminação com *L. fermentum.*

O efeito da contaminação sobre a eficiência fermentativa foi mais grave na presença da levedura rugosa do que com a bactéria, e a contaminação dupla (tanto com a levedura rugosa quanto com a bactéria) não teve efeito maior sobre a eficiência fermentativa do que a contaminação simples, por um ou por outro micro-organismo isoladamente, especialmente na fermentação em batelada com reciclo celular, independentemente do substrato. Na verdade, nas fermentações com reciclo de células, o efeito do substrato foi menos evidente.

O controle do crescimento das linhagens rugosas pode ser realizado modificando o tratamento ácido normalmente realizado na indústria, seja pela adição de etanol à solução ácida ou pelo abaixamento do pH, dependendo da linhagem rugosa. Não houve efeito dessas modificações sobre o crescimento da linhagem industrial. No entanto, o tratamento combinado baixo pH (2,0) + 13% etanol afetou a fisiologia da linhagem industrial, trazendo prejuízos à fermentação com reciclo celular, com pequeno controle sobre o crescimento da levedura rugosa e causando morte celular à *L. fermentum*. O efeito letal do tratamento sobre a bactéria poderia se constituir em uma estratégia para o controle dessa contaminação quando se detecta efeito considerável à produção de etanol. Utilizando esse tratamento modificado em alguns ciclos fermentativos, poderia se exterminar a bactéria dos tanques de fermentação, mesmo que isso possa trazer prejuízo ao rendimento da fermentação transitoriamente.

O tipo de substrato de fermentação não interferiu no efeito do tratamento combinado sobre a eficiência fermentativa, seja no sentido de minimizar ou maximizar o prejuízo.

A diferença na atividade invertásica entre as linhagens rugosas e industrial de *S. cerevisiae* pode ser a responsável pela fermentação lenta apresentada pelas linhagens rugosas quando presentes na fermentação, sendo não significativa a influência do substrato sobre a atividade dessa enzima.

Concluiu-se portanto, que a utilização de caldo de cana ou melaço como substrato da fermentação poderá afetar o desenvolvimento das contaminações e as interações entre os micro-organismos durante a fermentação, e que é possível modificar a etapa do tratamento celular ácido para obter o controle do crescimento dos contaminantes, leveduras *S. cerevisiae* rugosas e *L. fermentum* no processo fermentativo para produção de etanol combustível. No entanto, haverá prejuízo ao rendimento fermentativo. Sendo assim, a adoção do tratamento modificado deve ser avaliada frente ao efeito que a contaminação pode causar se não for controlada.

ANEXO

Tabela 1 - Curvas-padrões obtidas para quantificação do número de bactérias e leveduras

Micro-organismo (unidade)	Equação (coeficiente de correlação)[1]
S. cerevisiae PE-2 (X 10^7 UFC/mL)	Y= 0,812 X - 0,0404 (R^2 = 0,9607)
S. cerevisiae - Rugosa 7 (X 10^7 UFC/mL)	Y = 0,0588X + 0,2749 (R^2 = 0,8749)
S. cerevisiae - Rugosa 36 (X 10^7 UFC/mL)	Y= 0,4051X + 0,0969 (R^2 = 0,846)
S. cerevisiae - Rugosa 52 (X 10^7 UFC/mL)	Y= 0,6005X - 0,0838 (R^2 = 0,9146)
L. fermentum ATCC19255 (X 10^7 UFC/mL)	Y= 0,0032 X + 0,0881 (R^2= 0,9539)

[1] Y= absorbância a 600 nm; X= número de UFC/mL