



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CINTIA GREICE MATSUOCA GOIS

**CONTROLE DE *LACTOBACILLUS* SP. NO PROCESSO
AGROINDUSTRIAL DE FERMENTAÇÃO ETANÓLICA POR
COMPOSTOS DO METABOLISMO SECUNDÁRIO DE
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

CINTIA GREICE MATSUOCA GOIS

**CONTROLE DE *LACTOBACILLUS* SP. NO PROCESSO
AGROINDUSTRIAL DE FERMENTAÇÃO ETANÓLICA POR
COMPOSTOS DO METABOLISMO SECUNDÁRIO DE
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia.
Orientador: Prof.Dr. Galdino Andrade

Londrina
2012

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

| | |
|-------|---|
| G616c | <p>Gois, Cintia Greice Matsuoca. Controle de <i>Lactobacillus</i> sp. no processo agroindustrial de fermentação etanólica por compostos do metabolismo secundário de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> / Cintia Greice Matsuoca Gois. – Londrina, 2012. 51 f. : il.</p> <p>Orientador: Galdino Andrade Filho. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2012. Inclui bibliografia.</p> <p>1. Microbiologia industrial – Teses. 2. Álcool – Fermentação – Teses. 3. Lactobacilo – Teses. 4. Produtos de ação antimicrobiana – Teses. 5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> – Teses. I. Andrade Filho, Galdino. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.</p> <p>CDU 579:661.72</p> |
|-------|---|

CINTIA GREICE MATSUOCA GOIS

**CONTROLE DE *LACTOBACILLUS* SP. NO PROCESSO
AGROINDUSTRIAL DE FERMENTAÇÃO ETANÓLICA POR
COMPOSTOS DO METABOLISMO SECUNDÁRIO DE
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Galdino Andrade
UEL – Londrina – PR

Profa. Dra. Diva Souza Andrade
IAPAR – Londrina – PR

Prof. Dr. Gerson Nakazato
UEL – Londrina – PR

Londrina, 13 de março de 2012

DEDICO

*A Deus e a minha família, por me amarem
da forma que sou.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me permitiu concluir mais esta etapa.

Aos meus pais Fátima e Mário pelo amor e compreensão em todos os momentos da minha vida.

A minha irmã Mônica, pelo seu exemplo de dedicação e força, pela amizade e companheirismo em todos os momentos.

A minha amiga querida Ariane pela amizade verdadeira, pelos momentos de consolo e diversão.

As minhas amigas Indianara e Pollyanna Aranda, pelo apoio no trabalho, fofocas e amizade.

Ao Prof. Dr. Galdino Andrade, por ter me surpreendido com sua orientação acadêmica e em minha vida, pelo seu lado humano, que me compreendeu e me acolheu em um momento de dor.

Aos Professores da banca, Diva Souza Andrade e Gerson Nakazato, pelas precisas correções e sugestões.

A técnica do laboratório Marta Salvador, pela amizade, longas conversas e consolos.

A COOPERVAL, em especial ao José Luiz, Lucimar e Fernanda pela disponibilidade, pela dedicação de tempo e pela disposição em nos receber em cada coleta e experimento.

Aos companheiros de laboratório Viviana, Dáfila, Flávia, Eik, Cris, Priscila, Nathali, Luan, Júnior, em especial, Ane e Mayara, pelo carinho, pelos ensinamentos e por estarem sempre dispostos a me ajudarem. E a minha turma de mestrado, a turma mais engraçada e unida que já existiu.

As minhas grandes amigas Lucilene Lopes e Jamile, pela amizade essencial na minha vida, pela ajuda nos experimentos, e pela amizade verdadeira, amor e carinho.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

"Muitas pessoas devem a grandeza de suas vidas aos problemas e obstáculos que tiveram de vencer." (Baden Powell).

GOIS, Cíntia Greice Matsuóca. **Controle de *Lactobacillus* sp. no processo agroindustrial de fermentação etanólica por compostos do metabolismo secundário de *Pseudomonas aeruginosa*.** 2012. 51 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina.

RESUMO

A contaminação bacteriana na indústria sucroalcooleira, causada principalmente por *Lactobacillus* sp., é um dos principais problemas que afetam a fermentação etanólica, pelo fato deste contaminante reduzir os rendimentos na produção do álcool. A fração F4 é produzida por *Pseudomonas aeruginosa* e extraída a partir do tratamento com diclorometano e em seguida fracionada por cromatografia líquida a vácuo com solventes com polaridade crescente e obtida na fase metanol. O objetivo deste estudo foi avaliar o controle de *Lactobacillus* sp. no microcosmo da dorna durante a fermentação alcoólica. Foi testado a ação da fração F4 em combinação ou não com produtos já utilizados no controle de bactérias contaminantes na indústria sucroalcooleira tais como o ácido sulfúrico e o antibiótico Kamoram[®]. A atividade antibiótica da fase metanol (F4) foi determinada por testes de difusão em agar, bioautografia e determinação da concentração inibitória mínima. A avaliação de eficiência da fermentação foi determinada pela formação de espuma e a floculação, teor alcoólico, acidez total e açúcar redutor residual. Também foi determinado a viabilidade celular, brotamento, viabilidade de brotamento, e as populações de *Saccharomyces cerevisiae* e de *Lactobacillus* sp. Os resultados deste estudo revelam que a fração F4 em comparação com os demais tratamentos possui também atividade antibiótica frente à *Lactobacillus* sp. sem causar efeitos adversos na levedura e melhora o processo de fermentação devido a diminuição de espuma e da floculação. Conclui-se que F4 apresenta atividade antibiótica contra *Lactobacillus* sp. e pode ser uma alternativa no controle da contaminação na fermentação etanólica.

Palavras chave: Fermentação alcoólica. Antimicrobiano. *Pseudomonas aeruginosa*. *Lactobacillus* sp. Eficiência de fermentação

GOIS, Cíntia Greice Matsuóca. **Control of *Lactobacillus* sp. in agro-ethanol fermentation process by secondary metabolic compounds of *Pseudomonas aeruginosa***. 2012. 51 p. Dissertation (MSc in Microbiology) -Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina.

ABSTRACT

Bacterial contamination in the sugar industry, mainly caused by *Lactobacillus* sp., is one of the main problems affecting the ethanol fermentation, because these contaminants reduce yields in the production of alcohol. Fraction F4 is generated by *Pseudomonas aeruginosa* and extracted from the treatment with dichloromethane and then fractionated by vacuum liquid chromatography with increasingly polar solvent and obtained from the methanol phase. The objective of this study was to evaluate the control of *Lactobacillus* sp. in the microcosm of the vat during fermentation. We tested the action of the F4 fraction or in combination with products already in use in the control of bacteria in the sugar industry such as sulfuric acid and antibiotic Kamoram[®]. The antibiotic activity of the methanol phase (F4) was determined by agar diffusion test, bioautography and minimal inhibitory concentration determination. The evaluation of the fermentation efficiency was determined by foaming and flocculation, alcohol content, total acidity and reducing sugar residue. It was also determined cell viability, budding, brotamente viability, and the populations of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus* sp. These results show that the F4 fraction compared with other treatments also has antibiotic activity against the *Lactobacillus* sp. without causing adverse effects on the yeast fermentation process improves because of the decrease of foam and flotation. We conclude that F4 has antibiotic activity against *Lactobacillus* sp. and can be an alternative to control contamination in ethanol fermentation.

Keywords: Fermentation. Antimicrobial. *Pseudomonas aeruginosa*. *Lactobacillus* sp. Fermentation efficiency.

LISTA DE TABELA

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Avaliação da atividade antibiótica do extrato bruto FD (fase diclorometano) e das suas frações purificadas por cromatografia líquida a vácuo (CLV) utilizando seis fases móveis com polaridade crescente (F1, 100% de hexano; F2, diclorometano 100%; F3 acetato de etila 100%; F4, metanol 100%; F5 metanol / água (1:1, v / v) e F6, água 100%), frente à <i>Lactobacillus</i> sp. e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 46 |
|--|----|

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Esquema da produção do metabólito com atividade antibiótica (Oliveira et al., 2011)..... 46
- Figura 2** – pH do vinho após fermentação (6 h 32 °C⁻¹) tratado com ácido sulfúrico (98%) (HS); Kamoran[®] 10 ppm (KM), fração F4 (F4) 1562 µg mL⁻¹, ácido sulfúrico (98%) + Kamoran[®] 10 ppm (HS+KM), Kamoran[®] 10 ppm + fração F4 1562 µg mL⁻¹ (KM+F4). As barras representam médias de três repetições e quando seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0.05$) 47
- Figura 3** – Teor alcoólico do vinho após fermentação (6 h 32 °C⁻¹) tratado com ácido sulfúrico (98%) (HS); Kamoran[®] 10 ppm (KM), fração F4 (F4) 1562 µg mL⁻¹, ácido sulfúrico (98%) + Kamoran[®] 10 ppm (HS+KM), Kamoran[®] 10 ppm + fração F4 1562 µg mL⁻¹ (KM+F4). As barras representam médias de três repetições e quando seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0.05$) 47
- Figura 4** – Acidez total do vinho após fermentação (6 h 32 °C⁻¹) tratado com ácido sulfúrico (98%) (HS); Kamoran[®] 10 ppm (KM), fração F4 (F4) 1562 µg mL⁻¹, ácido sulfúrico (98%) + Kamoran[®] 10 ppm (HS+KM), Kamoran[®] 10 ppm + fração F4 1562 µg mL⁻¹ (KM+F4). As barras representam médias de três repetições e quando seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0.05$) 48
- Figura 5** – Açúcares Redutores Residuais do vinho após fermentação (6 h 32 °C⁻¹) tratado com ácido sulfúrico (98%) (HS); Kamoran[®] 10 ppm (KM), fração F4 (F4) 1562 µg mL⁻¹, ácido sulfúrico (98%) + Kamoran[®] 10 ppm (HS+KM), Kamoran[®] 10 ppm + fração F4 1562 µg mL⁻¹ (KM+F4). As barras representam médias de três repetições e quando seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0.05$)..... 48

- Figura 6** – Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* após fermentação (6 h 32 °C⁻¹) tratado com ácido sulfúrico (98%) (HS); Kamoran[®] 10 ppm (KM), fração F4 (F4) 1562 µg mL⁻¹, ácido sulfúrico (98%) + Kamoran[®] 10 ppm (HS+KM), Kamoran[®] 10 ppm + fração F4 1562 µg mL⁻¹ (KM+F4). As barras representam médias de três repetições e quando seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0.05$)49
- Figura 7** – Brotamento celular de *Saccharomyces cerevisiae* após fermentação (6 h 32 °C⁻¹) tratado com ácido sulfúrico (98%) (HS); Kamoran[®] 10 ppm (KM), fração F4 (F4) 1562 µg mL⁻¹, ácido sulfúrico (98%) + Kamoran[®] 10 ppm (HS+KM), Kamoran[®] 10 ppm + fração F4 1562 µg mL⁻¹ (KM+F4). As barras representam médias de três repetições e quando seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0.05$)49
- Figura 8** – Viabilidade de brotamento de *Saccharomyces cerevisiae* após fermentação (6 h 32 °C⁻¹) tratado com ácido sulfúrico (98%) (HS); Kamoran[®] 10 ppm (KM), fração F4 (F4) 1562 µg mL⁻¹, ácido sulfúrico (98%) + Kamoran[®] 10 ppm (HS+KM), Kamoran[®] 10 ppm + fração F4 1562 µg mL⁻¹ (KM+F4). As barras representam médias de três repetições e quando seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0.05$).....50
- Figura 9** – População de *Saccharomyces cerevisiae* após fermentação (6 h 32 °C⁻¹) tratado com ácido sulfúrico (98%) (HS); Kamoran[®] 10 ppm (KM), fração F4 (F4) 1562 µg mL⁻¹, ácido sulfúrico (98%) + Kamoran[®] 10 ppm (HS+KM), Kamoran[®] 10 ppm + fração F4 1562 µg mL⁻¹ (KM+F4). As barras representam médias de três repetições e quando seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0.05$)50
- Figura 10** – População de *Lactobacillus* sp. após fermentação (6 h 32 °C⁻¹) tratado com ácido sulfúrico (98%) (HS); Kamoran[®] 10 ppm (KM), fração F4 (F4) 1562 µg mL⁻¹, ácido sulfúrico (98%) + Kamoran[®] 10 ppm (HS+KM), Kamoran[®] 10 ppm + fração F4 1562 µg mL⁻¹ (KM+F4). As barras representam médias de três repetições e quando seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0.05$)51

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 | OBJETIVOS | 15 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL..... | 15 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 15 |
| 3 | REVISÃO DE LITERATURA | 16 |
| 3.1 | IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E SOCIAL DO ÁLCOOL NO BRASIL..... | 16 |
| 3.2 | ETAPAS DA PRODUÇÃO DO ÁLCOOL | 16 |
| 3.3 | CONTAMINANTES | 17 |
| 3.4 | ALTERNATIVAS DE CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO..... | 19 |
| 3.5 | INDICADORES DE ESTRESSE EM SACCHAROMYCES CEREVISAE | 21 |
| | REFERÊNCIAS | 23 |
| | ARTIGO – CONTROLE DE LACTOBACILLUS SP. NO PROCESSO AGROINDUSTRIAL DE FERMENTAÇÃO ETANÓLICA POR COMPOSTOS DO METABOLISMO SECUNDÁRIO DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA | 29 |
| 1 | INTRODUÇÃO | 32 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS | 33 |
| 2.1 | CEPAS BACTERIANAS | 33 |
| 2.2 | PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E FRACIONAMENTO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS COM ATIVIDADE ANTIBIÓTICA | 34 |
| 2.3 | CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)..... | 35 |
| 2.4 | AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA..... | 35 |
| 2.4.1 | Difusão em Agar..... | 35 |
| 2.4.2 | CCD Bioautografia | 35 |
| 2.4.3 | Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) | 36 |
| 2.5 | AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE FERMENTAÇÃO POR SUBPRODUTOS..... | 36 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.5.1 | Avaliação da Formação de Espuma e da Floculação..... | 37 |
| 2.5.2 | Determinação do Teor Alcoólico..... | 37 |
| 2.5.3 | Determinação da Acidez Total | 37 |
| 2.5.4 | Determinação do Açúcar Redutor Residual (ARR)..... | 37 |
| 2.6 | ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS | 38 |
| 2.6.1 | Viabilidade Celular de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> | 38 |
| 2.6.2 | Determinação da População de <i>Lactobacillus SP</i> | 38 |
| 3 | RESULTADOS | 39 |
| 3.1 | DIFUSÃO EM AGAR | 39 |
| 3.2 | CCD BIOAUTOGRAFIA..... | 39 |
| 3.3 | DETERMINAÇÃO DA CIM..... | 39 |
| 3.4 | EFICIÊNCIA DE FERMENTAÇÃO POR SUBPRODUTOS E pH..... | 40 |
| 3.4.1 | Formação de Espuma e Floculação | 40 |
| 3.4.2 | pH | 40 |
| 3.4.3 | Teor Alcoólico do Vinho | 40 |
| 3.4.4 | Acidez Total..... | 40 |
| 3.4.5 | Açúcar Redutor Residual | 40 |
| 3.5 | ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS | 41 |
| 3.5.1 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 41 |
| 3.5.2 | População de <i>Lactobacillus SP</i> | 41 |
| 4 | DISCUSSÃO | 41 |
| | CONCLUSÕES | 43 |
| | REFERÊNCIAS | 43 |

1 INTRODUÇÃO

A plantação de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) para a extração de seus derivados (açúcar e álcool) é uma das mais importantes atividades agroindustriais e econômicas do país, sendo o Brasil o maior exportador mundial de açúcar e álcool (BERG, 2004). Depois do petróleo, a cana-de-açúcar é a segunda principal fonte de energia do país, considerada uma das melhores alternativas para fornecimento de energia limpa e renovável. Desde o surgimento do Programa Nacional do Álcool (PROÁLCOOL), o setor sucroalcooleiro ganhou maior importância econômica e social (AMORIM; LEÃO, 2005).

Um dos grandes problemas encontrados na indústria sucroalcooleira é a contaminação por bactérias no processo fermentativo (NARENDRANATH et al., 1997). O solo é um grande reservatório biológico de microorganismos e a contaminação que atinge a indústria em sua maior parte tem nele sua origem. Dependendo do nível de contaminação podem ser gerados diversos danos (CHERUBIN, 2003; AMORIM; LEÃO, 2005):

- Consumo da sacarose que poderia ser convertida em etanol;
- Formação de goma produzida pelos contaminantes, que pode causar entupimentos de tubulações, peneiras, centrífugas e trocadores de calor;
- Aumento da floculação do fermento, que diminui a velocidade de fermentação, acarreta perda de células de levedura pelo fundo da dorna e dificulta a operação das centrífugas;
- Redução da viabilidade das leveduras e/ou formação de produtos indesejáveis que, conseqüentemente, levam a reduções na produção de álcool no processo fermentativo.

O ácido sulfúrico e os antibióticos usados na indústria sucroalcooleira para controle da contaminação por *Lactobacillus* sp. na dorna, pode selecionar bactérias resistentes, o que diminui a eficiência destes produtos. Além da diminuição da eficiência no controle das bactérias os produtos utilizados geram resíduos que quando eliminados no meio ambiente pode causar graves impactos na comunidade microbiana do solo, selecionando resistentes aos antibióticos usados e alterando os ciclos biogeoquímicos e a fertilidade o solo, por serem estes fatores medidos basicamente pela atividade microbiana do solo.

Devido a estes fatores, é urgente e necessária a busca por novos produtos que controlem a contaminação bacteriana da dorna e melhorem a fermentação alcoólica.

Compostos do metabolismo secundário produzidos por espécies antagonistas, quando em competição, podem apresentar atividade antimicrobiana (HARMAN, 2000; OLIVEIRA et al., 2011). O uso de metabólitos secundários com atividade antibiótica no controle de bactérias contaminantes da fermentação pode ser uma estratégia promissora para a redução das perdas em razão da degradação da sacarose e a formação dos ácidos láctico e acético, que ocasionam perda de açúcar, inviabilização das leveduras e é responsável por dificuldades operacionais na indústria (OLIVA-NETO; YOKOYA, 1997).

O uso desses compostos no controle das principais bactérias contaminantes no processo industrial de fermentação alcoólica em associação ou em substituição aos antibióticos demonstra ser uma alternativa viável, e a aplicação desta estratégia pode cooperar com o desenvolvimento tecnológico do processo industrial na produção de álcool, tornando o processo fermentativo mais eficiente e sustentável, além de ecológico, do ponto de vista de geração de resíduos (LU et al., 2003a; CHIBANI et al., 2004; VINDEROLA et al., 2007), já que resíduos como a vinhaça são utilizados como fertirrigantes no plantio da cana.

Visto a importância da agroindústria de álcool no Brasil e os problemas que a contaminação bacteriana apresenta para esse setor, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da fração F4 (fase metanol) produzida por *Pseudomonas aeruginosa* (cepa LV) e das demais frações F obtidas de FD após o fracionamento por cromatografia líquida a vácuo (CLV), no controle de contaminantes bacterianos – *Lactobacillus* sp. – do processo agroindustrial de fermentação etanólica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o controle de *Lactobacillus* sp., no microcosmo da dorna durante a fermentação alcoólica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Buscar uma alternativa de controle das bactérias contaminantes, em especial *Lactobacillus* sp., do processo fermentativo;
- b) Avaliar as alternativas utilizados na indústria sucroalcooleira no controle de contaminantes e compará-los ao composto biológico;
- c) Correlacionar o uso de antibióticos e a introdução do composto biológico no controle bacteriano na dorna;
- d) Avaliar a viabilidade celular de *S. cerevisiae* durante os tratamentos de controle antibacteriano;
- e) Determinar o teor alcoólico, o teor de açúcares redutores residuais e a acidez total durante o processo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E SOCIAL DO ÁLCOOL NO BRASIL

A agroindústria do álcool representa um considerável gerador econômico, sendo esse setor de suma importância para o país. O Brasil é hoje o segundo maior produtor de etanol do mundo e tem uma das matrizes energéticas mais limpas do planeta, na qual a energia renovável representa quase 50% segundo União da Indústria de Cana-de-Açúcar (UNICA). Graças a avanços científicos e tecnológicos (BASSO et al., 2008), sua produção vem crescendo nas últimas décadas, no entanto, recentemente, os Estados Unidos ultrapassaram o Brasil em termos de volume de produção de bioetanol (VALDES, 2007). Os dois países respondem por 80% do etanol mundial.

Os efeitos adversos da utilização de recursos não renováveis, como emissão de gases poluente e mudanças climáticas, além de fatores econômicos e segurança energética, convergem para uma revolução bioenergética (NASS et al., 2007). Quando comparado a outros combustíveis convencionais, o etanol tem baixa toxicidade e volatilidade, o que contribui na redução da poluição atmosférica e, em longo prazo, poderia se tornar a solução para as alterações climáticas (ARISTIDOU; PENTTILA, 2000).

Segundo o Departamento de Cana-de-açúcar e Agroenergia, da Secretaria de Produção e Agroenergia, órgão ligado ao Ministério da Agricultura, o Brasil é líder mundial no setor de agroenergia, representando 32% da energia ofertada. Grande extensão territorial e recursos naturais que possibilitam a ampliação da produção de insumos energéticos provenientes da biomassa favorecem a liderança do país no setor. Os dois principais biocombustíveis líquidos usados no Brasil são o etanol, extraído de cana-de-açúcar, e o biodiesel, produzido a partir de óleos vegetais ou de gorduras animais e adicionado ao diesel de petróleo em proporções variáveis.

3.2 ETAPAS DA PRODUÇÃO DO ÁLCOOL

As etapas para a produção de etanol diferenciam de usina para usina, mas de modo geral, as etapas são similares. São divididas em: etapa agrícola e etapa industrial. As operações envolvidas no processo de produção de uma usina são: pesagem, estocagem, lavagem, preparo/moagem, clarificação do caldo, fermentação/centrifugação, destilação (PAIVA, 2006).

A etapa industrial se inicia com a pesagem e análise da cana que passa diretamente para a mesa alimentadora ou vai para o estoque de cana. Na mesa, a cana passa por uma corrente de água para retirada de impurezas minerais e vegetais. A água contaminada é tratada e as impurezas grosseiras são retiradas, e essa água volta à mesa alimentadora. Em seguida a cana é picada e desfibrada. E se inicia a alimentação da moenda, onde o bagaço resultante é queimado nas caldeiras para produção de vapor para a geração de energia elétrica (PAIVA, 2006).

O caldo extraído é utilizado para a preparação do mosto, junto ao xarope, mel e água. O mosto é enviado para as dornas de fermentação e misturado com as leveduras. Após aproximadamente 7 horas, o mosto é fermentado e se transforma em vinho levedado, que contém 6 a 10% de álcool e leveduras. Nas centrífugas o vinho é separado das leveduras, que será enviado à destilação, onde a primeira coluna fabrica a cachaça, a segunda recupera o álcool hidratado e na seqüência, outra coluna produz o álcool anidro. O fermento é tratado e retorna à fermentação e uma parte é retirada deste ciclo para ser utilizada como proteína animal (PAIVA, 2006).

Os prejuízos causados pela contaminação bacteriana na fermentação alcoólica tem início na lavoura com a matéria-prima. A cana-de-açúcar excessivamente contaminada, aliada aos problemas de eficiência no tratamento do caldo levam um grande número de bactérias e produtos de seu metabolismo para o processo fermentativo (Amorim; Oliveira, 1982; Kaji; Canhos, 1989).

3.3 CONTAMINANTES

A contaminação bacteriana causa prejuízos desde a lavoura até a fermentação alcoólica. A contaminação excessiva no momento do corte e transporte da cana-de-açúcar leva um grande número de bactérias e seus produtos metabólicos até o processo fermentativo (AMORIM; OLIVEIRA, 1982; KAJI; CANHOS, 1989). O caldo de cana é rico em nutrientes orgânicos e inorgânicos, e possui pH e temperatura ideais para o crescimento de um grande número de bactérias. Além desses fatores, as próprias condições das etapas do processo de produção do álcool, selecionam determinadas espécies ou linhagens de microrganismos, estando todo processo sujeito à contaminação (GALLO, 1989; CHERUBIN, 2003).

Os principais gêneros das bactérias contaminantes da fermentação alcoólica são predominadas por Gram-positivas. Nas usinas de álcool, *Lactobacillus* sp. é o

contaminante bacteriano mais comumente encontrado (SKINNER; LEATHERS, 2004; MAKANJUOLA; SPRINGHAM, 1984), trazendo graves conseqüências para a produção. Segundo Silva (1988), os gêneros *Lactobacillus* (38%), *Leuconostoc* (12%) e *Bacillus* (3%) são os principais contaminantes do processo fermentativo. Em relação às espécies predominantes destacaram-se *Lactobacillus fermentum* e *Leuconostoc mesenteroides*. Na produção de álcool utilizando o milho como matéria prima, também ocorre a prevalência de bactérias lácticas, em especial *Lactobacillus* sp., representando cerca de 40% dos contaminantes totais isolados (SKINNER; LEATHERS, 2004).

Os contaminantes na indústria sucroalcooleira causam prejuízos no rendimento fermentativo devido à presença de bactérias lácticas que degradam a sacarose formando duas moléculas de ácido láctico ao invés de formar duas moléculas de etanol (NARENDRANATH et al., 1997; OLIVA-NETO; YOKOYA, 1997). Além disso, muitos nutrientes deixam de ser aproveitados por leveduras e são consumidos por bactérias. A contaminação reduz a produção de etanol e inibe o crescimento da levedura (CHANG et al., 1995; NGANG et al., 1990; NARENDRANATH et al., 2000). Como mencionado anteriormente as bactérias lácticas são as principais contaminantes na fermentação etanólica e esse fato tem efeitos drásticos no processo fermentativo. A fermentação do carboidrato em ácido láctico reduz a produção do álcool e a fermentação das leveduras é inibida pelo ácido láctico (MAKANJUOLA et al., 1992; NGANG et al., 1990).

Na fermentação alcoólica ocorrem várias interações entre leveduras e bactérias. Entre diversas pesquisas, Nobre (2005) buscou encontrar a inibição exercida pelas bactérias sobre o desenvolvimento de leveduras. Este mesmo autor encontrou uma relação negativa na interação entre *L. fermentum* e *Bacillus subtilis* com *S. cerevisiae*. Essas bactérias reduziram a viabilidade celular de *S. cerevisiae* em cultivo misto. A presença dessas bactérias junto à acidez do meio foi um dos principais fatores que levaram à redução da viabilidade celular de *S. cerevisiae*.

Em um trabalho anterior, Oliveira-Freguglia; Horii (1998) observaram que a contaminação por *Lactobacillus fermentum* causa floculação no processo fermentativo; influencia na viabilidade de *Saccharomyces cerevisiae*, podendo reduzir a valores próximos a zero em cerca de 12 horas após o término da fermentação alcoólica, e causam grandes prejuízos às leveduras mesmo depois de tratados com antimicrobianos ou calor, devido à toxicidade dos produtos metabólicos de *L. fermentum*.

Os prejuízos podem ser ainda maiores quando a contaminação bacteriana atinge níveis superiores a 1.0×10^7 células.mL⁻¹ em meio fermentativo, levando a uma significativa diminuição no rendimento alcoólico (AMORIM et al., 1981).

Vários fatores são atribuídos a essa queda no rendimento, tais como:

- a) a floculação das leveduras, o que diminui a velocidade de fermentação, acarreta perda de células de levedura pelo fundo da dorna e dificulta a operação das centrífugas (AMORIM; OLIVEIRA, 1982; OLIVA-NETO; YOKOYA, 1997);
- b) o desvio de muitos nutrientes para a multiplicação das bactérias (NARENDRANATH et al., 1997), sendo que cada molécula de açúcar direcionada para a produção de ácido láctico resulta na perda de duas moléculas de etanol que poderiam ser produzidas (INGLEDEW, 1995); e
- c) a diminuição da viabilidade das leveduras causada pelo microrganismo contaminante (YOKOYA, 1989), devido à produção de metabólitos (principalmente os ácidos láctico e acético) (BEVAN; BOND, 1971) e à competição por nutrientes do meio (NOBRE, 2005).

Perdas na produção causadas por *Lactobacillus* sp. foram retratadas por outros autores (HYNES et al., 1997; NARENDRANATH et al., 1997). Qualquer redução na produção de etanol tem importantes conseqüências econômicas para a indústria do álcool combustível, onde as margens de lucro costumam ser muito baixas (MAKANJUOLA et al., 1992).

3.4 ALTERNATIVAS DE CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO

Alguns processos têm sido desenvolvidos para o controle da contaminação durante a fermentação alcoólica. A produção de etanol no Brasil é atualmente realizada pelo processo de fermentação descontínuo (batelada alimentada) ou contínuo, com reciclo de células de leveduras, de forma que contaminantes bacterianos são também reciclados e podem causar problemas devido à competição pelo mesmo substrato (MENECHIN et al., 2008). O controle bacteriano é feito pela adição de ácido sulfúrico na lavagem das células do fermento ou utilizando-se biocidas.

Um dos processos mais usados para o controle bacteriano é a adição de ácido sulfúrico na lavagem das células do fermento (MENECHIN et al., 2008; PIESLEY;

TOM, 1978; SIMPSON; HAMMOND, 1989). O ácido sulfúrico é usado para ajustar o pH durante a fermentação. A adição de ácido sulfúrico, segundo Gallo (1989) reduz até 45% da população de bactérias contaminantes, além de ter custo reduzido e contribuir na redução da floculação, entretanto não é satisfatório nos processos contínuos onde as células das leveduras são recicladas (MADSON; MUTTAGH, 1991).

Outro processo muito utilizado para o controle da contaminação bacteriana na indústria sucroalcooleira é a utilização de antibióticos como a penicilina G, estreptomicina, tetraciclina (AQUARONE, 1960; DAY et al., 1954), a virginiamicina (HYNES et al., 1997; ISLAM et al., 1999), e outras misturas. Antibióticos como a penicilina e virginiamicina, de fato, são usados na produção de bioetanol atualmente (BAYROCK et al., 2003; HYNES et al., 1997). Entretanto, o uso de antibióticos no processo industrial tem gerado controvérsias. Métodos que envolvem antibióticos como b-lactâmicos são muito caros (AQUARONE, 1960; DAY et al., 1954); os resíduos gerados durante a fermentação alcoólica podem ser reciclados como fertilizantes e rações para animais, por isso, a adição de antibióticos pode não ser preferível do ponto de vista ecológico (BEVAN; BOND, 1971); e, o uso inadequado de antibióticos pode contribuir para surgimento de cepas resistentes a antibióticos (KHACHATOURIANS, 1998).

Segundo Bayrock et al. (2003), o modo da adição do antibiótico também interfere no controle da contaminação. Um número menor de células viáveis de *L. paracasei* em cultivo conjunto com *S. cerevisiae* e maior aumento na concentração de etanol foi encontrada quando a adição do antibiótico é feita de forma pulsada ao invés de contínua.

Apesar do grande número de métodos disponíveis para o controle, a aplicação constante, o preço e o fator custo-benefício são levados em conta no momento da escolha do melhor método de controle da contaminação (BEVAN; BOND, 1971).

Neste sentido, outros métodos de controle estão sendo estudados. Meneghin et al. (2008) utilizaram dióxido de cloro como biocida para controlar a contaminação da fermentação alcoólica. O dióxido de cloro apresentou resultados de controle contra as bactérias contaminantes do processo fermentativo, porém as leveduras também foram sensíveis ao mesmo.

Peróxido de hidrogênio, metabissulfito de potássio, 3,4,4'-trichlorocarbanilide e antibióticos também foram usados como controle do crescimento de bactérias lácticas (AQUARONE, 1960; BAYROCK et al., 2003; CHANG et al., 1997; NARENDRANATH et al., 2000; OLIVA-NETO; YOKOKA, 1998).

3.5 INDICADORES DE ESTRESSE EM SACCHAROMYCES CEREVISAE

Nos processos industriais as leveduras estão sujeitas a diferentes tipos de estresses que têm impacto direto no desempenho da fermentação. Ao final da fermentação as células de leveduras sedimentam e são re-inoculadas em um mosto fresco para o início de um novo ciclo fermentativo. Além de serem expostas a altas concentrações de etanol durante a fermentação, antes de serem reutilizadas, as leveduras são submetidas a diversos estresses, como a lavagem com ácido para evitar a contaminação por bactérias, temperaturas elevadas, contaminação bacteriana, carência ou excesso de nutrientes (SMART; WHISKER, 1996; HEGGART et al., 1999; CUNNINGHAM; STEWART, 2000; YAMAGISHI et al., 2001; JENKINS et al., 2003; POWELL et al., 2003; CAMPELO; BELO, 2004; KOBİ et al., 2004). Após 6 a 8 ciclos fermentativos as leveduras perdem sua capacidade efetiva máxima (YAMAGISHI et al., 2001; HEGGART et al., 1999; KOBİ et al., 2004) e por essa característica é de fundamental importância que as leveduras sejam avaliadas antes do uso em um novo ciclo fermentativo. Quando o estresse é demasiado, a levedura tenta se defender e responde com a formação de metabólitos como glicerol e trealose. O glicerol é um osmorregulador de *S. cerevisiae* formado em meios com baixa atividade de água (alta pressão osmótica) na presença de solutos, tais como sais e açúcares (WALKER, 1998; ERASMUS et al., 2003, HAJNY et al., 1960; PANCHAL; STEWART, 1980; MAIORELLA et al., 1984; LARSSON ; GUSTAFSSON, 1987; TOKUOKA, 1993).

A floculação é outro fenômeno que indica reação de estresse da levedura. É descrita como um fenômeno reversível em que as células de levedura se aderem umas as outras formando flocos que se sedimentam no meio onde estão suspensas (STEWART, 1975). Iserentant (1996) e Stratford (1992) consideram a floculação como estratégia de sobrevivência da levedura que ao se unir a outras, protegeria as células que ficam no centro do floco contra situações desfavoráveis. A floculação prejudica o processo de fermentação alcoólica uma vez que as células de levedura, ao aglomerarem-se, diminuem o contato com o substrato, reduzindo o rendimento e aumentando o tempo de fermentação (SERRA et al., 1976; YOKOYA; OLIVA-NETO, 1991).

Muitos fatores influenciam na floculação de leveduras: pH (MASY et al., 1991); agitação e stresse (MOMOSE et al., 1969; STRATFORD; KEENAN, 1988); fatores genéticos (ZARATTINI et al., 1993); etanol e outros produtos da fermentação (PATEL; INGLEDEW, 1975), entre outros. A floculação das leveduras também está associada à contaminação bacteriana. Yokoya; Oliva-Neto (1991) indicam cepas de *Lactobacillus*

fermentum como o principal microrganismo responsável pelo processo de floculação. Momose et al., (1969) observaram que cepas de leveduras eram floculadas por *Lactobacillus plantarum*.

Thomas et al. (2001) relatou que a presença de *Lactobacillus fermentum* com as leveduras durante a fermentação à base de milho ocasionou queda da viabilidade celular da levedura em 55%, além disso, diminuiu 22% na produção de etanol e desvio de carboidratos para a produção de glicerol e ácido láctico.

O desempenho das leveduras está relacionado ao estresse nutricional, devido a competição dos nutrientes das leveduras com as bactérias (BAYROCK; INGLEDEW, 2005). Esses autores registraram uma diminuição no número de células viáveis de leveduras, diminuição na produção de etanol e aumento da concentração de ácido láctico.

O aumento das usinas sucroalcooleiras no Paraná e os problemas ainda existentes na fermentação etanólica justificam estudos na linha de controle dos contaminantes e as possíveis implicações econômicas.

REFERÊNCIAS

- AMORIM HV; LEÃO RM. Fermentação Alcoólica: Ciência e Tecnologia. Piracicaba: Fermentec: 2005. 488p.
- AMORIM HV; OLIVEIRA AJ. Infecção na fermentação: como evitá-la. *Álcool e Açúcar*, v.2, n.5, p.12-18, jul/ago, 1982.
- AMORIM, HV; OLIVEIRA, AJ; CAMPOS, H. Infecção, problema sério na produção de álcool. In: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DOS TÉCNICOS AÇUCAREIROS DO BRASIL, Rio de Janeiro: Anais. Piracicaba: STAB, 158-168, 1981.
- AQUARONE, E. Penicillin and tetracycline as contamination control agents in alcoholic fermentation of sugar cane molasses. *Applied Microbiology*, 8, 263–268, 1960.
- ARISTIDOU A; PENTTILÄ, M. Metabolic engineering application to renewable resource utilization. *Current Opinion in Biotechnology*, 11, 187-198, 2000.
- BASSO, LC; AMORIM, HV; OLIVEIRA, AJ; LOPES, ML. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Research*, 8, 1155–1163, 2008.
- BAYROCK, DP; INGLEDEW, WM. Ethanol production in multistage continuous, single stage continuous, *Lactobacillus* – contaminated continuous, and batch fermentations. *World Journal of Microbiology ; Biotechnology*, 21, 83-88, 2005.
- BAYROCK, DP; THOMAS, KC; INCLEDEW, WM. Control of *Lactobacillus* contaminants in continuous fuel ethanol fermentation by constant or pulsed addition of penicillin G. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 468-502, 2003.
- BERG C. World fuel ethanol – analysis and outlook. Disponível em: <<http://www.distill.com/World-Fuel-Ethanol-A;O-2004.html>>. Acesso em : 3 Out. 2010.
- BEVAN, D; BOND, J. Microorganism in field and mill -a preliminary survey. In: CONFERENCE OF THE QUEENSLAND SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, Cairns. Proceedings. Brisbane: Watson Ferguson, 38, 137-143, 1971.
- _____. Brasil é líder mundial no setor de agroenergia. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2011/12/brasil-e-lider-mundial-no-setor-de-agroenergia>>. Acesso em: 15 Dez. 2011.
- CAMPELO, AF; BELO, I. Fermentative capacity of baker's yeast exposed to hyperbaric stress. *Biotechnology Letters*, 26, 1237-1240, 2004.
- CHANG IS; KIM BH; SHIN PK; LEE WK. Bacterial contamination and its effects on ethanol fermentation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 5: 309-314, 1995.
- CHANG, IS; KIM, BH; SHIN, PK. Use of sulfite and hydrogen peroxide to control bacterial contamination in ethanol fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 1-9, 1997.

- CHERUBIN, AR. Efeitos da Viabilidade da Levedura e da Contaminação Bacteriana na Fermentação Alcoólica. Tese (Doutorado em Agronomia, Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Piracicaba, SP, 2003.
- CHIBANI-CHENNOUFI, S; DILLMANN, ML; MARVIN-GUY, L; RAMI-SHOJAEI, S. ; BRUSSOW, H. *Lactobacillus plantarum* bacteriophage LP65: a new member of the SPO1like genus of the family Myoviridae. *Journal of Bacteriology*, 186, 7069–7083, 2004.
- CUNNINGHAM, S; STEWART, GG. Acid washing and serial repitching a brewing Ale strain of *Saccharomyces cerevisiae* in high gravity wort and the role of wort oxygenation conditions. *Journal Institute of Brewing*, 106, 389-402, 2000.
- DAY, WH; SERJAK WC; STRATTON JR; STONE, L. Antibiotics as contamination-control agents in grain alcohol fermentations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2, 252–258, 1954.
- ERASMUS, DJ; MERWE, VDGK; VUUREN, VHJ. Genome-wide expression analyses: Metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. *FEMS Yeast Research*, 3(4): 375-399, 2003.
- GALLO, CR. Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica. Tese (Doutorado) -Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, 1989.
- HARMAN, GE. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease* 84, 377 – 393, 2000.
- HAJNY, GJ; HENDERSHOT, WF; PETERSON, WH. Factors affecting glycerol production by a newly isolated osmophilic yeast. *Applied Microbiology*, 8, 5-11, 1960.
- HEGGART, H; MARGARITIS, A; PILKINGTON, H; STEWART, RJ; DOWHANICK, TM; RUSELL, I. Factors affecting yeast viability and vitality characteristics: a review. *Technical Quarterly*, 36, 383-406, 1999.
- HYNES, SH; KJARSGAARD, DM; THOMAS, KC; INGLEDEW, WM. Use of virginiamycin to control the growth of lactic acid bacteria during alcohol fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 18, 284-291, 1997.
- INGLEDEW, WM. The biochemistry of alcohol production In: LYONS, TP; KELSALL, DR; MURTAGH, JE.(Ed.) *The alcohol textbook*. Nottingham: Nottingham University Press, 5579, 1995.
- ISLAM M; TOLEDO R; HAMDY MK. Stability of virginiamycin and penicillin during alcohol fermentation. *Biomass and Bioenergy* 17, 369–376, 1999.
- ISERENTANT, D. Practical aspects of yeast flocculation. *Belgium Journal of Brewing and Biotechnology*. 21, 30-33, 1996.
- JENKINS, CL; KENNEDY, AI; HODGSON, JA; THURSTON, P; SMART, KA. Impact of serial repitching on Lager brewing yeast quality. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 61, 1-9, 2003.

- KAJI DA; CANHOS VP. Contaminantes do processo de produção de açúcar e álcool. In: Eguchi SY, Yokoya F, Canhos VP, Gallo CR. Pontos críticos microbiológicos em usinas de açúcar e álcool. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas Tecnológicas André Tosello, 1-9, 1989.
- KHACHATOURIANS, GG. Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. Canadian Medical Association Journal 159, 1129–1136, 1998.
- KOBI, D; ZUGMEYER, S; POTIER S; GUTFREUND, LJ. Two-dimensional protein map of an “ale”-brewing yeast strain: proteome dynamics during fermentation. FEMS Yeast Research 5, 213-230, 2004.
- LARSSON, C; GUSTAFSSON, L. Glycerol production in relation to the ATP pool and heat production rate of the yeast *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* during salt stress. Archives of Microbiology, 147, 358-363, 1987.
- LU Z; BREIDT F; FLEMING HP; ALTERMANN E; KLAENHAMMER TR. Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage JL-1 from a cucumber fermentation. International Journal of Food Microbiology, 2003.
- MADSON, PW; MUTTAGH JE. Fuel ethanol in USA: review of reasons for 75% failure rate of plants built, p. 119–124. In IX International Symposium on Alcohol Fuels. ISAF-Firenze 91, 12–15, 1991.
- MAIORELLA, B.; BLANCH, HW.; WILKE, CR. Feed component inhibition in ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering, 26, 1156-1166, 1984.
- MAKANJUOLA DB.; SPRINGHAM DG. Identification of lactic acid bacteria isolated from different stages of malt and whisky distillery fermentations. Journal of the Institute of Brewing 90, 1319, 1984.
- MAKANJUOLA, DB.; TYMON, A.; SPRINGHAM, DG. Some effects of lactic acid on laboratory scale yeast fermentations. Enzyme and Microbial Technology 14, 351– 357, 1992.
- MENEGHIN, SP.; REIS, FC.; ALMEIDA, PG.; CECCATO-ANTONINI, SR. Chlorine dioxide against bacteria and yeasts from the alcoholic fermentation. Brazilian Journal of Microbiology, 39(2), 337-343, 2008.
- MASY, CL; DENGIS, P; GARSOUX, G; MALOTTE, L; DUFOUR, JP; MESTDAGH, MM; ROUXHET, PG. A simple test for screening flocculence of brewer’s yeast. Louvain Brewing Letters, 4, 31-34, 1991.
- MOMOSE, H; IWANO, K; TONOIKE, R. Studies on the aggregation of yeast caused by lactobacilli. The Journal of General and Applied Microbiology, 15, 19-26, 1969.
- NARENDRANATH NV; HYNES, SH; THOMAS, KC; INGLEDEW, WM. Effects of lactobacilli on yeast -catalyzed ethanol fermentations. Applied and Environmental Microbiology, 63: 4158–4163, 1997.

NARENDRANATH, NV; THOMAS, KC; INGLEDEW, WM. Urea hydrogen peroxide reduces the numbers of Lactobacilli, nourishes yeast, and leaves no residues in the ethanol fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 4187-4192, 2000.

NASS, LL; PEREIRA, PAA; ELLIS, D. Biofuels in Brazil: Na Overview. *Crop Science*, 47, 2228-2237, 2007.

NGANG, JJEF; LETOURNEAU, P. Alcoholic fermentation of beet molasses: effects of lactic acid on yeast fermentation parameters. *Applied Microbiology and Biotechnology* 31:125-128, 1990.

NOBRE, TP. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. Dissertação (Mestrado) -ESALQ/USP, 2005.

OLIVA-NETO P; YOKOYA F. Effects of nutritional factors on growth of *Lactobacillus fermentum* mixed with *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation. *Revista de Microbiologia*, 28, 25-31, 1997.

OLIVA-NETO, P; YOKOYA, F. Effect of 3,4,4'-trichlorocarbanilide on growth of lactic acid bacteria contaminants in alcoholic fermentation. *Bioresource Technology*, 63: 17-23, 1998.

OLIVEIRA AG; MURATE, LS; SPAGO, FR; LOPES, LP; BERANGER, JPO; SAN MARTIN, JAB; NOGUEIRA, MA; ANDRADE, CGTJ; MELLO, JCP; ANDRADE, G. Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. *Biological Control*. 56, 125–131, 2011.

OLIVEIRA, FRM; HORII, J. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* em cultura mista com *Lactobacillus fermentum*. *Scientia Agricola* 55 , 1998.

PAIVA, RPO. Um modelo baseado em seleção de processos e dimensionamento de lotes para o planejamento agregado da produção em usinas de açúcar e álcool. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) -Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

PANCHAL, CJ; STEWART, GG. The effect of osmotic pressure on the production and excretion of ethanol and glycerol by a brewing yeast strain. *Journal of the Institute of Brewing*, 86, 207-210, 1980.

PATEL, GB; INGLEDEW, WM. A flocculation teste for moderately flocculent brewing yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, 81, 123-6, 1975.

PIESLEY, JG; LOM, T. Yeast-strains and handling techniques, In H. M. Broderick (ed.), *The practical brewer: a manual for the brewing industry*, 2nd ed. Master Brewers Association of Americans, Madison, Wis, 183–227, 1978.

POWELL, CD; QUAIN, DE; SMART, KA. The impact of brewing yeast age on fermentation performance, attenuation and flocculation. *FEMS Yeast Research*, 3, 149-157, 2003.

SERRA, GE; CEREDA, MP; FERES, RJF; BERTOSO, MT; VICENTE, AL. Contaminação da fermentação alcoólica: “floculação do fermento”. *Brasil. Açucareiro*. 93: 336-41, 1976.

- SILVA N. Influência do resfriamento em torres sobre a microflora do caldo de cana no processo de produção de álcool. Dissertação (Mestrado) -Universidade de Campinas, 1988.
- SIMPSON, WJ; HAMMOND, JRM. The response of brewing yeast to acid washing. *Journal of the Institute of Brewing*, 95: 347-354, 1989.
- SKINNER KA; LEATHERS TD. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 31: 401–408, 2004.
- SMART, KA; WHISKER, SW. Effect of serial repitching on fermentation properties and condition of brewing yeast. *Journal of the American Society of Brewing Chemistry*, 54, 4144, 1996.
- STEWART, GG. Yeast flocculation -Practical implications and experimental findings. *Brewer's Digest*. 50, 42, 1975.
- STRATFORD, M. Yeast flocculation: reconciliation of physiological and genetics viewpoints. *Yeast*. 8, 25-38, 1992.
- STRATFORD, M.; KEENAN, MHJ. Yeast flocculation: quantification. *Yeast* 4, 107–115, 1988.
- THOMAS, KC; HYNES, SH; INGLEDEW, WM. Effect of lactobacilli on yeast growth, viability and batch and semi continuous alcoholic fermentation of corn mash. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 819-828, 2001.
- TOKUOKA, K. Sugar-and salt – tolerant yeast. *Journal of Applied Bacteriology*, 74, 101110, 1993.
- UNICA -Nova fase para o etanol brasileiro, além do uso como combustível, será destaque no World Biofuels Market 2011. Disponível em:
<<http://www.unica.com.br/noticias/show.asp?nwsCode={8679F386-75F0-40B3-92A1-44E683B3ED3F}>> acesso em: 09/03/2011.
- VALDES, C. Ethanol demand driving the expansion of Brazil's sugar industry. *Sugar Journal*, 70, 9-11, 2007.
- VINDEROLA V; BRIGGILER MARCÓ M; GUGLIELMOTTI D; PERDIGÓN G; GIRAFFA G; REINHEIMER J; QUIBERONI A. Phage resistant mutants of *Lactobacillus delbrueckii* may have functional properties that differ from those of parent strains. *International Journal of Food Microbiology* 116, 96–102, 2007.
- WALKER, GM. *Yeast physiology and biotechnology*. West Sussex: John Wiley and Sons Ltd, 350, 1998.
- YAMAGISHI, H; YUUKI, T; KAGAMI, N; YOKOGAWA, Y; SHIBATA, K; MINEMURA, M; OHYA, Y. Appearance of poor-fermenting variants in Brewing yeast culture. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 65, 2361-2363, 2001.
- YOKOYA, F. Microbiologia do processo de fermentação. In: EGUCHI, S.Y.; YOKOYA, F.; CANHOS, V.P.; GALLO, C.R. Pontos críticos microbiológicos em usinas de açúcar e álcool. Campinas: Fundação tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, p.1-22, 1989.

YOKOYA, F; de OLIVA-NETO, P. Characteristics of yeast flocculation by *Lactobacillus fermentum*. Review of Microbiology 22, 21–27, 1991.

ZARATTINI, RA; WILLIAMS, JW; ERNANDES, JR; STEWART, GG. Bacterial induced flocculation in selected brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae* and Biotechnology, Cerevisia and Biotechnology, 18, 65-75, 1993.

ARTIGO: Controle de *Lactobacillus* sp. no processo agroindustrial de fermentação etanólica por compostos do metabolismo secundário de *Pseudomonas aeruginosa*

Cíntia Greice Matsuoca Góis¹, Lucilene de Paula Lopes¹, Jamile Priscila de Oliveira Beranger¹, Admilton Gonçalves de Oliveira¹, Flavia Regina Spago¹ and Galdino Andrade¹. *

Corresponding author: Galdino Andrade, Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana, Caixa Postal 6001, CEP 86051-990, Londrina, PR Brazil. Phone/Fax: +55-43-3371-4791; E-mail: andradeg@uel.br

¹ * Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana, Londrina, Brazil

GOIS, Cíntia Greice Matsuóca. **Controle de *Lactobacillus* sp. no processo agroindustrial de fermentação etanólica por compostos do metabolismo secundário de *Pseudomonas aeruginosa***: 2012. 62f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina.

RESUMO

A contaminação bacteriana na indústria sucroalcooleira, causada principalmente por *Lactobacillus* sp., é um dos principais problemas que afetam a fermentação etanólica, pelo fato deste contaminante reduzir os rendimentos na produção do álcool. A fração F4 é produzida por *Pseudomonas aeruginosa* e extraída a partir do tratamento com diclorometano e em seguida fracionada por cromatografia líquida a vácuo com solventes com polaridade crescente e obtida na fase metanol. O objetivo deste estudo foi avaliar o controle de *Lactobacillus* sp. no microcosmo da dorna durante a fermentação alcoólica. Foi testado a ação da fração F4 em combinação ou não com produtos já utilizados no controle de bactérias contaminantes na indústria sucroalcooleira tais como o ácido sulfúrico e o antibiótico Kamoram[®]. A atividade antibiótica da fase metanol (F4) foi determinada por testes de difusão em agar, bioautografia e determinação da concentração inibitória mínima. A avaliação de eficiência da fermentação foi determinada pela formação de espuma e a floculação, teor alcoólico, acidez total e açúcar redutor residual. Também foi determinado a viabilidade celular, brotamento, viabilidade de brotamento, e as populações de *Saccharomyces cerevisiae* e de *Lactobacillus* sp. Os resultados deste estudo revelam que a fração F4 em comparação com os demais tratamentos possui também atividade antibiótica frente à *Lactobacillus* sp. sem causar efeitos adversos na levedura e melhora o processo de fermentação devido a diminuição de espuma e da floculação. Conclui-se que F4 apresenta atividade antibiótica contra *Lactobacillus* sp. e pode ser uma alternativa no controle da contaminação na fermentação etanólica.

Palavras chave: Fermentação alcoólica. Antimicrobiano. *Pseudomonas aeruginosa*. *Lactobacillus* SP. Eficiência de fermentação.

GOIS, Cíntia Greice Matsuóca. Control of *Lactobacillus* sp. in agro-ethanol fermentation process by secondary metabolic compounds of *Pseudomonas aeruginosa*: 2012. 62f. Dissertation (MSc in Microbiology) -Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina.

ABSTRACT

Bacterial contamination in the sugar industry, mainly caused by *Lactobacillus* sp., is one of the main problems affecting the ethanol fermentation, because these contaminants reduce yields in the production of alcohol. Fraction F4 is generated by *Pseudomonas aeruginosa* and extracted from the treatment with dichloromethane and then fractionated by vacuum liquid chromatography with increasingly polar solvent and obtained from the methanol phase. The objective of this study was to evaluate the control of *Lactobacillus* sp. in the microcosm of the vat during fermentation. We tested the action of the F4 fraction or in combination with products already in use in the control of bacteria in the sugar industry such as sulfuric acid and antibiotic Kamoram[®]. The antibiotic activity of the methanol phase (F4) was determined by agar diffusion test, bioautography and minimal inhibitory concentration determination. The evaluation of the fermentation efficiency was determined by foaming and flocculation, alcohol content, total acidity and reducing sugar residue. It was also determined cell viability, budding, brotamente viability, and the populations of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus* sp. These results show that the F4 fraction compared with other treatments also has antibiotic activity against the *Lactobacillus* sp. without causing adverse effects on the yeast fermentation process improves because of the decrease of foam and flotation. We conclude that F4 has antibiotic activity against *Lactobacillus* sp. and can be an alternative to control contamination in ethanol fermentation.

Keywords: Fermentation. Antimicrobial. *Pseudomonas aeruginosa*. *Lactobacillus* sp. Fermentation efficiency.

INTRODUÇÃO

A plantação de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) e a extração de seus derivados (açúcar e álcool) é uma das mais importantes atividades agroindustriais e econômicas do país, sendo o Brasil o maior exportador mundial de açúcar e álcool (BERG, 2004). Depois do petróleo, a cana-de-açúcar é a segunda principal fonte de energia do país, considerada uma das melhores alternativas para fornecimento de energia limpa e renovável. Desde o surgimento do Programa Nacional do Álcool (PROÁLCOOL), o setor sucroalcooleiro ganhou maior importância econômica e social (AMORIM; LEÃO, 2005).

Um dos grandes problemas encontrados na indústria sucroalcooleira é a contaminação por bactérias no processo fermentativo (NARENDRANATH et al, 1997). O solo é um grande reservatório biológico de microorganismos e a contaminação que atinge a indústria em sua maior parte tem nele sua origem. Dependendo do nível de contaminação podem ser gerados diversos danos como o consumo da sacarose; a formação de goma, que pode causar entupimentos de tubulações, peneiras, centrífugas e trocadores de calor; o aumento da floculação do fermento, que diminui a velocidade de fermentação, acarreta perda de células de levedura pelo fundo da dorna e dificulta a operação das centrífugas; a redução da viabilidade das leveduras e/ou formação de produtos indesejáveis que, conseqüentemente, levam a reduções na produção de álcool no processo fermentativo (CHERUBIN, 2003; AMORIM; LEÃO, 2005).

O ácido sulfúrico e os antibióticos usados na indústria sucroalcooleira para controle da contaminação por *Lactobacillus* sp. na dorna, pode selecionar bactérias resistentes, o que diminui a eficiência destes produtos. Além da diminuição da eficiência no controle das bactérias os produtos utilizados geram resíduos que quando eliminados no meio ambiente pode causar graves impactos na comunidade microbiana do solo, selecionando resistentes aos antibióticos usados e alterando os ciclos biogeoquímicos e a fertilidade o solo, por serem estes fatores medidos basicamente pela atividade microbiana do solo.

Devido a estes fatores, é urgente e necessária a busca por novos produtos que controlem a contaminação bacteriana da dorna e melhorem a fermentação alcoólica.

Compostos do metabolismo secundário produzidos por espécies antagonistas, quando em competição, podem apresentar atividade antimicrobiana (HARMAN, 2000; OLIVEIRA et al., 2011). O uso de metabólitos secundários com atividade antibiótica no controle de bactérias contaminantes da fermentação pode ser uma estratégia promissora para a redução das perdas em razão da degradação da sacarose e a formação dos ácidos láctico

e acético, que ocasionam perda de açúcar, inviabilização das leveduras e é responsável por dificuldades operacionais na indústria (OLIVA-NETO; YOKOYA, 1997).

O uso desses compostos no controle das principais bactérias contaminantes no processo industrial de fermentação alcoólica em associação ou em substituição aos antibióticos demonstra ser uma alternativa viável, e a aplicação desta estratégia pode cooperar com o desenvolvimento tecnológico do processo industrial na produção de álcool, tornando o processo fermentativo mais eficiente e sustentável, além de ecológico, do ponto de vista de geração de resíduos (LU et al., 2003; CHIBANI et al., 2004; VINDEROLA et al., 2007), já que resíduos como a vinhaça são utilizados como fertirrigantes no plantio da cana.

Visto a importância da agroindústria de álcool no Brasil e os problemas que a contaminação bacteriana apresenta para esse setor, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da fração F4 (fase metanol) produzida por *Pseudomonas aeruginosa* (cepa LV) e das demais frações F obtidas de FD após o fracionamento por cromatografia líquida a vácuo (CLV), no controle de contaminantes bacterianos – *Lactobacillus* sp. – do processo agroindustrial de fermentação etanólica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CEPAS BACTERIANAS

A cepa (*Lactobacillus* sp.) utilizada no estudo foi isolada da dorna durante o processo de fermentação na Cooperativa Agroindustrial Vale do Ivaí LTDA (COOPERVAL), e cultivada em meio MCC, (caldo de cana-de-açúcar clarificado diluído com água destilada para $5.0 \pm 0,1^{\circ}$ brix, extrato de levedura 10 g.L^{-1} , peptona 10 g.L^{-1}) (NOBRE, 2005).

O agente de biocontrole utilizado foi a *Pseudomonas aeruginosa* (cepa LV), isolada no Município de Astorga, PR, Brasil (RAMPAZO, 2004).

A partir do mosto fermentado foi realizado um estudo da composição da comunidade bacteriana, sendo que a população de *Lactobacillus* sp. foi a mais representativa, compondo mais de 90% da comunidade. Cinco cepas de *Lactobacillus* sp. foram isoladas e uma de *S. cerevisiae* utilizadas nos experimentos atividade antibiótica do composto. A partir dos experimentos exploratórios foi escolhida uma cepa de *Lactobacillus* sp., que foi utilizada nos experimentos.

As cepas utilizadas nos experimentos foram criopreservadas em solução de glicerol 20% em nitrogênio líquido (-196°C).

2.2 PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E FRACIONAMENTO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS COM ATIVIDADE ANTIBIÓTICA

A produção, extração e fracionamento dos compostos antibióticos foram realizados de acordo com Oliveira et al. (2011) (figura 1), (Patente 2008; Processo de produção, purificação e obtenção de substâncias com atividades antibióticas para o controle de doenças causadas por bactérias em plantas, 10 de setembro -PI 0803350-1; www.inpi.gov.br).

A cepa LV foi cultivada em meio líquido (caldo nutriente adicionado de 100 mg L⁻¹ de CuCl₂ · 2 H₂O) (CASIDA JR, 1992) por 15 dias a 100 rpm 28 °C⁻¹. Para obter o sobrenadante livre de células, a cultura da cepa LV foi centrifugada a 9.000 rpm por 20 minutos em refrigeração à 4 °C. O sobrenadante livre de células foi transferido para funis de separação de 2000 mL, onde foi realizada partição líquido-líquido na razão 1:1 (v/v) em alíquotas de 500 mL do sobrenadante e 500 mL de diclorometano.

A fase diclorometano (FD) obtida foi concentrada em evaporador rotatório a 40 °C a 100 rpm, e em seguida, o volume final foi evaporado com o auxílio de ventilador a temperatura ambiente ao abrigo da luz. O composto concentrado foi congelado em nitrogênio líquido e liofilizado por 24h.

Posteriormente a FD obtida no processo de partição foi fracionada pelo método de cromatografia líquida a vácuo (CLV), em coluna de vidro (20 mm Φ x 350 mm altura), acoplada a uma bomba de vácuo 51 kPa. Como fase estacionária foi utilizada sílica gel 60 (0.063 – 0.200 mm, Merck), e como fases móveis solventes orgânicos com polaridade crescente: hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol, metanol e água destilada na razão 1:1 (v:v) e água destilada. As seis frações obtidas: (F1) hexano; (F2) diclorometano; (F3) acetato de etila; (F4) metanol; (F5) metanol e água destilada e (F6) água destilada foram concentradas em evaporador rotatório a 40 °C a 100 rpm, em seguida, o volume final foi evaporado com o auxílio de ventilador a temperatura ambiente ao abrigo da luz. O composto concentrado de cada fração foi congelado em nitrogênio líquido e liofilizado por 24 h.

2.3 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

A CCD foi realizada para avaliação analítica qualitativa dos componentes das frações obtidas nos processos de separação, utilizando-se cromatoplasmas de sílica gel 60 F254 (Merck®) em suporte de alumínio. O sistema eluente (fase móvel) utilizado foi uma mistura de clorofórmio/acetona/metanol. As bandas obtidas foram reveladas pela exposição à luz ultravioleta em dois comprimentos de onda ($\lambda = 254$ nm e 366 nm).

2.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA

2.4.1 Difusão em Ágar

A avaliação da ação antibiótica de todas as frações foi realizada utilizando discos de antibiograma feitos de papel filtro de 6 mm. O desenho experimental foi conduzido com 2 inóculos, 7 frações e 2 concentrações, com duas repetições cada ($2 \times 7 \times 2 \times 2$, $n = 56$). O inóculo de *Lactobacillus* sp. (10^8 UFC mL⁻¹ D.O 0.14, $\lambda = 590$ nm) foi semeado em meio MCC, utilizando swab umedecido no inóculo. O inóculo de *S. cerevisiae* (10^8 UFC mL⁻¹ D.O 0.22, $\lambda = 590$ nm) foi semeado em meio MCC, utilizando swab umedecido no inóculo. Alíquotas de 5 μ L de cada fração, contendo 250 e 500 μ g, foram adicionadas nos discos e incubados 32 °C 24 h⁻¹. Os resultados foram considerados como (-) para ausência de halo de inibição e (+) para presença de halo de inibição.

2.4.2 CCD Bioautografia

A fim de determinar qualitativamente a atividade antibiótica das frações FD e F4, o teste de bioautografia em CCD (RAHALISON et al. 1991) foi realizado, onde as cromatofolhas foram depositadas em placas de Petri inoculadas com suspensão de *Lactobacillus* sp. (10^8 UFC mL⁻¹, D.O 0.14, $\lambda = 590$ nm) e *S. cerevisiae* (10^8 UFC mL⁻¹, D.O 0.22, $\lambda = 590$ nm), separadamente, pelo método de *pour plate*. As placas foram incubadas 32 °C 24 h⁻¹, e a leitura foi realizada através da presença ou ausência do halo de inibição e reveladas em solução de cloreto de 2,3,5-trifenil-1H-tetrazólio (TTC) a 1%. Os resultados foram considerados como (-) para ausência de halo de inibição e (+) para presença de halo de inibição.

2.4.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM da fração F4 foi realizada em placas de cultura de células com 24 poços. O desenho experimental foi de 8 concentrações da F4 com 4 repetições cada (6 x 4, n = 24). Como controle negativo foi considerado o meio de cultura em caldo inoculado com água destilada estéril e como controle positivo, meio de cultura em caldo inoculado com suspensão de 10^8 UFC mL⁻¹ de *Lactobacillus* sp. e *S. cerevisiae*, separadamente. Foram adicionados em cada poço, 100µL de MMC, 100µL de suspensão da bactéria e 100µL de F4 diluídos em água destilada, nas concentrações de 48; 97; 195; 390; 781; 1562; 3125 e 6250 µg mL⁻¹. Após a incubação de 32° C 24 h⁻¹, foram adicionados 10µL de solução de cloreto de 2, 3, 5-trifenil tetrazólio (TTC) a 1% em cada poço, e incubados por mais 20 min 32 °C⁻¹. A leitura foi realizada observando a mudança de cor, causada pela viabilidade celular, considerada sensível (-) na ausência de cor e resistente (+) na presença de coloração rosa -avermelhada.

2.5 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE FERMENTAÇÃO POR SUBPRODUTOS

O experimento foi conduzido durante as safras de 2009/10 e 2010/11 na planta industrial da Cooperativa Agroindustrial Vale do Ivaí LTDA (COOPERVAL). Nos ensaios de fermentação foi preparado caldo fermentado (vinho de levedados) com 60% de mosto (caldo de cana) e 40% de fermento mantidos sob agitação à 32° C. Todos os ensaios de fermentação foram com amostras de 500 mL de mosto, durante o ciclo fermentativo de 32° C 24h⁻¹ simulando o procedimento fermentativo realizado na indústria. Os tratamentos foram adição de ácido sulfúrico (98%) até pH 2.5; 10 ppm de antibacteriano Kamoran[®]; 1562µg mL⁻¹ de fração antibiótica F4; ácido sulfúrico + fração antibiótica F4; 10 ppm Kamoran[®] + fração antibiótica F4. Sendo considerado como controle o caldo fermentado.

Após incubação foram determinados no vinho a concentração de açúcares redutores residuais (%), concentração de etanol (%), acidez total (g.L⁻¹), e pH.

O desenho experimental foi em bloco com arranjo fatorial de 5 x 3, com três repetições. As análises foram determinadas após 32° C 6 h⁻¹ da fermentação do mosto. Os resultados foram submetidos à análise estatística, sendo realizado o teste de ANOVA e teste de Tukey ($p < 0.05$).

2.5.1 Avaliação da Formação de Espuma e da Floculação

A formação de espuma foi realizada por observação visual e a avaliação da floculação foi realizada através de microscópio óptico, utilizando uma escala de 1 à 5, onde 1 indica baixa floculação e 5 indica alta floculação.

2.5.2 Determinação do Teor Alcoólico

A determinação do grau alcoólico em vinho de fermentação presente nas amostras foi avaliada pelo método do densímetro eletrônico, mediante a destilação prévia de 25 mL da amostra em microdestilador Kjeldhal adaptado para álcool, seguido por densimetria, utilizando-se um densímetro digital eletrônico (Anton-Paar modelo dma 4500). O cálculo para concentração alcoólica em °GL (% v/v de etanol a 20 °C) da solução foi obtido através de tabela de conversão de densidade em grau alcoólico.

2.5.3 Determinação da Acidez Total

A acidez total das amostras do mosto foi determinada por titulação com solução de hidróxido de sódio (1 N) e azul de bromotimol (1%) como indicador (AMARINE; OUGH, 1976). Foram utilizados em cada titulação 10 mL do mosto diluído em 50 mL com água destilada e 3 gotas de azul de bromotimol (1%).

A acidez total foi expressa em g H₂SO₄ L⁻¹, e representa o volume gasto de NaOH 0.1N que é expresso em mg de ácido acético L⁻¹, e é baseado na equação $At = (Vg \times N \times 60 \times f \times 1000)/v$. Onde At = acidez total (mg de ácido acético L⁻¹); Vg = volume de solução de NaOH 0,1 N gasto (mL); N = normalidade da solução de NaOH; 60 = equivalente do ácido acético; f = fator de correção do NaOH 0,1 N; v = volume da amostra (mL), neste caso 20 mL.

2.5.4 Determinação do Açúcar Redutor Residual (ARR)

O açúcar redutor residual (%) foi determinado pelo método volumétrico de Lane-Eynon (1934), onde 50 g do vinho previamente filtrado foi transferido para balão volumétrico e adicionado 20 mL da solução de açúcar invertido 1% e 4 mL de EDTA 4% e

agitado com a mão sendo depois filtrado e adicionado 10 mL de licor de Fehling. A solução foi aquecida até a mudança de cor em seguida foi adicionado 5 gotas da solução de azul de metileno (1.0%) e feita a titulação.

2.6 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

2.6.1 Viabilidade Celular de *Sacharomyces cerevisiae*

Após o término do ciclo fermentativo foi retirada uma alíquota de 0.2 mL de vinho bruto para determinação da viabilidade celular de *S. cerevisiae* que corresponde à relação entre células vivas e o total de células, segundo Bonneu et al. (1991).

A viabilidade foi realizada por contagem das células viáveis em câmara de Neubauer em microscópio mediante coloração diferencial das células pela solução de eritrosina em tampão fosfato.

Os resultados foram expressos em porcentagem, baseados na equação viabilidade celular (% de células vivas): $(n. \text{ de células vivas} \times 100) / n. \text{ de células contadas}$.

Também foram determinadas as taxas de brotamento, viabilidade de brotamento e a população de leveduras ($\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$).

A taxa de brotamento foi realizada por meio da contagem de brotos vivos em relação ao número de células viáveis. A viabilidade de brotamento foi determinada através da razão entre o número de brotos vivos e o número de brotos vivos somado ao número de brotos mortos. A população de células de *S. cerevisiae* foi calculada estabelecendo-se uma relação entre células vivas, volume da câmara e total de retículos contados. Os resultados foram submetidos à análise estatística, sendo realizado o teste de ANOVA e teste de Tukey ($p < 0.05$).

2.6.2 Determinação da População de *Lactobacillus* sp.

Foi determinada o número de unidades formadoras de colônias ($\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$) pelo método de diluição seriada 1:10 inoculado por semeadura em profundidade (*pour plate*) (NEDER, 1992) em placas de Petri com meio MCC. Para cada amostra, foram utilizadas nove diferentes diluições seriadas (de 10^{-1} à 10^{-9}) sendo inoculados 50 μL de cada diluição em ágar MCC em triplicata. As placas foram incubadas ($32 \text{ }^\circ\text{C}$ 24 h^{-1}) e o número de colônias avaliado

nas diluições que apresentaram entre 30 a 300 colônias para cada placa. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC mL⁻¹). Os resultados foram submetidos à análise estatística, sendo realizado o teste de ANOVA e teste de Tukey ($p < 0.05$).

3 RESULTADOS

3.1 DIFUSÃO EM ÁGAR

Foi avaliada a atividade antibiótica da fase FD e das seis frações obtidas a partir do fracionamento. A fase FD e as frações F3 e F4 apresentaram atividade antibiótica contra o *Lactobacillus* sp. No entanto apenas a fração F4 não apresentou atividade contra o *S. cerevisiae*, demonstrando ser seletivo somente para *Lactobacillus* sp. (Tabela 1).

3.2 CCD BIOAUTOGRAFIA

Na bioautografia em CCD, também foi observada a presença de halo de inibição nas bandas de FD e F4 para a cultura de *Lactobacillus* sp. e o *S. cerevisiae* apresentou halo de inibição somente na fração FD (dados não apresentados).

3.3 DETERMINAÇÃO DA CIM

A CIM de F4 para o *Lactobacillus* sp. foi de 1562 µg mL⁻¹, no plaqueamento de amostras da cultura não foi observada a presença de colônias nas placas, demonstrando a inexistência de células viáveis (dados não apresentados).

Em todas as concentrações de fração F4 não houve inibição do crescimento de *S. cerevisiae*.

3.4 EFICIÊNCIA DE FERMENTAÇÃO POR SUBPRODUTOS E PH

3.4.1 Formação de Espuma e Floculação

A fração F4 diminuiu significativamente a formação de espuma durante a fermentação, também foi observada a diminuição da floculação quando comparada com o vinho não tratado e com os demais tratamentos que são utilizados na indústria.

Os tratamentos F4 e KM+F4 apresentaram baixa floculação no final do ciclo fermentativo, indicando um nível de floculação 1. Todos os demais tratamentos apresentaram um nível de floculação elevado entre 3 e 5.

3.4.2 pH

A presença de ácido sulfúrico diminuiu significativamente o pH do vinho, em relação aos demais tratamentos e o controle, que apresentaram valores de pH maiores sem diferenças entre si (Figura 2).

3.4.3 Teor Alcoólico do Vinho

O antibiótico Kamoram® (KM), a fração F4 e o tratamento KM + F4, aumentaram significativamente a produção de álcool quando comparadas ao controle. Os demais tratamentos não diferiram entre si (Figura 3).

3.4.4 Acidez Total

A presença de ácido sulfúrico aumentou o nível de acidez total, entre os demais tratamentos e o controle os níveis de acidez total foram menores e não tiveram diferenças significativa entre si (Figura 4).

3.4.5 Açúcar Redutor Residual

O tratamento KM+F4 mostrou ser mais adequado para o melhor aproveitamento dos açúcares do substrato. Os demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas com o controle (Figura 5).

3.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

3.5.1 Saccharomyces cerevisiae

A viabilidade celular, de *S. cerevisiae* foi elevada (acima de 75%), não sendo observada diferença significativa entre os tratamentos (Figura 6).

Em relação ao brotamento, viabilidade do brotamento e a população de *S. cerevisiae* não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos e ao controle (Figuras 7, 8 e 9).

3.5.2 População de Lactobacillus sp.

A fração F4 apresentou um alto poder de controle da população de *Lactobacillus sp.* demonstrando ser mais eficiente que os demais tratamentos, inclusive quando comparado com o Kamoran[®] que é o produto amplamente utilizado na indústria para o controle do *Lactobacillus sp.* Todos os tratamentos que incluíam a fração F4 também foram efetivos contra o *Lactobacillus sp.* Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos HS e KM em relação ao controle (Figura 10).

4 DISCUSSÃO

Vários estudos relatam a presença de bactérias com atividade antagonista de fungos ou bactérias, normalmente são isolados da rizosfera de plantas e pertencem principalmente aos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*, e podem ser usados como agentes de biocontrole (Byrne et al., 2005; Mafia, 2009; Lemessa e Zeller, 2007; Todorova e Kozhuharova, 2010). No entanto, há poucos relatos sobre o uso de microrganismos ou de compostos de metabolismo secundário no controle de microrganismos contaminantes de processos agroindustriais.

Os testes de bioautografia em CCD, difusão em ágar e CIM, mostraram que a fração F4 inibe o crescimento de *Lactobacillus sp.* e preserva o crescimento de *S. cerevisiae*. Em todas as concentrações testadas da fração F4 não houve inibição do crescimento de *S. cerevisiae* o que demonstra o grande potencial para o seu uso no controle de *Lactobacillus sp.* Na tentativa de controle de bactérias contaminantes do vinho durante a fermentação Oliva-

Neto e Yokoka (2001) testaram vários biocidas; entre eles, metilditiocarbamato, tiocianato, bromofenato, penicilina V Ácida, clindamicina, sulfito, nitrito, sulfato de cobre; e observaram que vários biocidas afetavam seriamente o crescimento de *S. cerevisiae*, nas dosagens similares que inibem o crescimento bacteriano. Sendo assim, os resultados apresentados neste trabalho demonstram que a fração F4 pode ser uma boa alternativa de controle contra a contaminação presente na fermentação, já que a mesma não afeta o crescimento de *S. cerevisiae*. Em relação ao Kamoran[®], produto utilizado no controle de bactérias contaminantes na dorna, quando comparado a efetividade deste produto com a fração F4, não foi observado diferenças significativas entre eles. A F4 mostrou-se ainda melhor que o Kamoram[®] por diminuir a floculação e a produção de espuma, e por ser um bio-produto a levedura restante da fermentação pode ser utilizada na alimentação animal, fato que não ocorre com o Kamoram[®].

Os tratamentos F4 e KM+F4 apresentaram baixa floculação (nível 1) no final do ciclo fermentativo, em relação aos demais tratamentos com níveis 3 e 5, sugerindo que a fração F4 também apresenta atividade contra a floculação, podendo também ser utilizada como desfloculante. Segundo Calleja (1987) a mudança de pH acarreta efeito na floculação, e o pH ótimo depende da cepa do microrganismo. Nesse sentido, dos tratamentos que continham a fração F4, o tratamento HS+F4 foi o único que não desfloculou, e o mesmo apresentava pH mais baixo do que os demais devido a presença do ácido sulfúrico. Esse fato pode ser comparado com Momose et al. (1969) que constataram que a floculação era causada por *Lactobacillus plantarum* em pH entre 2.0 e 4.0.

As taxas de teor alcoólico também apresentaram resultados semelhantes entre o antibiótico Kamoram[®] e a fração F4, demonstrando que estes tratamentos foram mais satisfatórios quando comparado com o controle. A contaminação bacteriana é inversamente proporcional à produção de álcool, pois cada molécula de açúcar é convertida em ácido lático ao invés de etanol (INGLEDEW, 2005).

O tratamento KM+F4 mostrou ser mais adequado para o melhor aproveitamento dos açúcares do substrato, o que pode estar relacionado com o baixo nível de contaminação por *Lactobacillus* sp., já que a molécula de açúcar fica disponível para a produção de moléculas de etanol. Apesar disso, as taxas de teor alcoólico neste tratamento, não demonstraram diferenças significativas quando comparadas com os demais tratamentos.

Em todos os tratamentos a viabilidade celular de *S. cerevisiae* foi elevada (acima de 75%), não sendo observada diferença significativa entre todos os tratamentos. De

certa maneira, esta observação foi interessante pelo fato de demonstrar que os tratamentos não afetaram a parte fisiológica de *S. cerevisiae*.

Quando comparados os principais processos utilizados no controle de bactéria a fração F4 mostrou ter a mesma atividade antimicrobiana que o Kamoram[®], e foi melhor no controle da floculação e produção de espuma. No entanto, a quantidade utilizada da fração F4 ainda é alta, mas também o nível de purificação pode ser melhorado aumentando assim a concentração do princípio ativo e conseqüentemente diminuindo a concentração inibitória mínima fato este já observado com a fração F3 que é utilizada no controle de bactérias Gram negativas (OLIVEIRA et al., 2011).

CONCLUSÕES

- A fração F4 não influenciou no desenvolvimento e viabilidade de *S. cerevisiae*, nestas condições de cultivo.
- A presença da fração F4 na fermentação reduziu a formação de espuma e a redução da floculação além de reduzir totalmente a população de *Lactobacillus* sp.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que possibilitou a realização deste estudo concedendo bolsas de estudos para PIBIC, MSc. E PhD.

REFERÊNCIAS

Amerine, MA; Ough, CS. *Análisis de vinos y mostos*; Zaragoza: Editorial Acribia, 1976.

Amorim, HV; Leão, RM. *Fermentação Alcoólica: Ciência e Tecnologia*; Piracicaba: Fermentec, 2005.

Berg, C. World fuel ethanol – analysis and outlook. URL (<http://www.distill.com/WorldFuel-Ethanol-A;O-2004.html>). Acesso em : 3 Out. 2010).

Bonneu, M; Crouzet, M; Urdaci, M; Aigle, M. Direct sietection of yeast mutants with reduced viability on plates by erythrosine Bstaining, *Analytical Biochemistry*. **1991**, 193, 225-230.

Byrne, JM; Dianese, AC; Jia, P; Campbell, HL; Cuppels, DA; Louws, FJ; Miller, SA; JONES, JB; WILSON, M. Biological control of bacterial spot of tomato under Weld conditions at several locations in North America, *Biological Control*. **2005**, 32, 408 -418.

Calleja, GB. *Cell agregation*. In: ROSE, AH; HARRISON, JS. eds. *The yeasts*. 2.ed. London, Academic Press, v.2. p. 165-237, 1987.

Casida Jr, LE. Competitive ability and survival in soil of *Pseudomonas* strain 679-2, a dominant, nonobligate bacterial predator of bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **1992**, 58, 32-37.

Cherubin, AR. Efeitos da Viabilidade da Levedura e da Contaminação Bacteriana na Fermentação Alcoólica. Dissertação, Doutorado em Agronomia, Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, 2003.

Chibani-Chennoufi, S; Dillmann, ML; Marvin-Guy, L; Rami-Shojaei, S; Bru Ssow, H. *Lactobacillus plantarum* bacteriophage LP65: a new member of the SPO1-like genus of the family *Myoviridae*. *J Bacteriol*. **2004**, 186, 7069–7083.

Harman, GE. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*. **2000**, 84, 377 -393.

Lane, JH; Eynon, L. *Determination of reducing sugars by Fehling's solution with methylene blue indicator*. London: Norman Rodger, 1934, 8p.

Lemessa, F; Zeller, W. Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia. *Biological Control*. **2007**, 42, 336 -344.

Lu Z; Breidt F; Fleming HP; Altermann E; Klaenhammer TR. Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage JL-1 from a cucumber fermentation. *Int. J. Food Microbiol*. **2003**.

Mafia, RG; Alfenas, AC; Maffia, LA; Ferreira, EM; Binoti, DHB; Mafia, GMV. Plant growth promoting rhizobacteria as agents in the biocontrol of eucalyptus mini-cutting rot. *Tropical Plant Pathology*. **2009**, 34, 10-17.

Momose, H; Iwano, K; Tonoike, R. Studies on the aggregation of yeast caused by *Lactobacilli*. IV. Force responsible for aggregation. *Journal of General Applied Microbiology*. **1969**, 15, 19-26.

Narendranath NV; Hynes, SH; Thomas, KC; Ingledew, WM. Effects of lactobacilli on yeast - catalyzed ethanol fermentations. *Appl Environ Microbiol*. **1997**, 63, 4158–4163.

Neder, RN. *Microbiologia: manual de laboratório*. São Paulo: Nobel, 1992.

Nobre, TP. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. Master thesis, Dissertation, ESALQ/USP, São Paulo, 2005.

Oliva-Neto P; Yokoya F. Effects of nutritional factors on growth of *Lactobacillus fermentum* mixed with *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation. *Revista de Microbiologia*. **1997**, 28, 25-31.

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*. **2001**, 32, 10-14.

Oliveira Junior, AG; Murate, LS; Spago, FR; Lopes-Santos, L; Beranger, JPO; Sam Martin, JAB; Nogueira, MA; Mello, JCP; Andrade, CGT; Andrade, G. Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. *Biological Control*. **2011**, 56, 125-131.

Rahalison, L; Hamburguer, M; Hostettmann, K; Monod, M; Frenk, E. Bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. *Phytochemical Analysis*. **1991**, 2, 199-203.

Rampazo, LGL. Evaluation of the effect of biological agents and their products into the incidence of citrus canker lesions. Master thesis, UEL -Universidade Estadual de Londrina, 2004.

Todorova, S; Kozhuharova, L. Characteristics and antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* strains isolated from soil. *World J Microbiol Biotechnol*. **2010**, 26, 1207-1216.

Vinderola V; Briggiler MM; Guglielmotti D; Perdigón G; Giraffa G; Reinheimer J; Quiberoni

A. Phage resistant mutants of *Lactobacillus delbrueckii* may have functional properties that differ from those of parent strains. *International Journal of Food Microbiology*. **2007**, 116, 96–102.

TABELA

Tabela 1 – Avaliação da atividade antibiótica do extrato bruto FD (fase diclorometano) e das suas frações purificadas por cromatografia líquida a vácuo utilizando seis fases móveis com polaridade crescente (F1, 100% de hexano; F2, diclorometano 100%; F3 acetato de etila 100%; F4, metanol 100%; F5 metanol / água (1:1, v / v) e F6, água 100%), frente à *Lactobacillus* sp. e *Saccharomyces cerevisiae*.

| AMOSTRAS (Presença ou Ausência do Halo de inibição) | | | | | | | | |
|---|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Frações | FD | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 | F6 | CN |
| <i>Lactobacillus</i> sp. | + | - | - | + | + | - | - | - |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | + | - | - | + | - | - | - | - |

(-) Ausência de halo de inibição; (+) Presença de halo de inibição; CN Controle Negativo.

FIGURAS E LEGENDAS

Figura 1 – Esquema da produção do metabólito com atividade antibiótica (Oliveira et al., 2011).

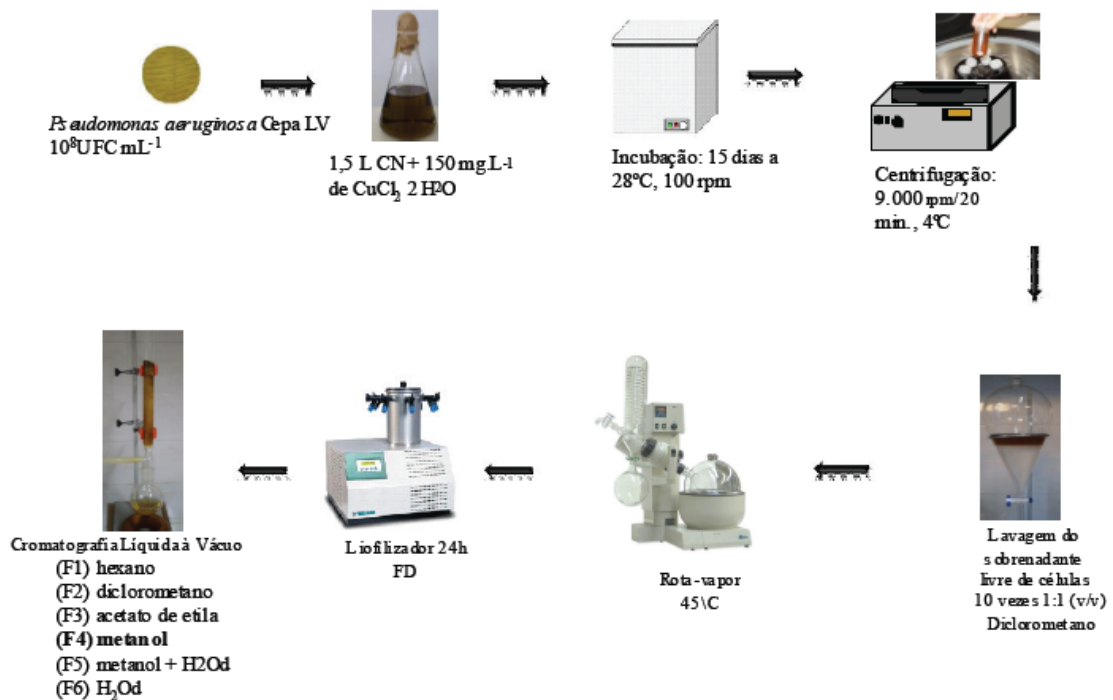


Figura 2 – pH do vinho após fermentação (32 °C 6 h⁻¹) tratado com ácido sulfúrico (98%) (HS); Kamoran® 10 ppm (KM), fração F4 (F4) 1562 µg mL⁻¹, ácido sulfúrico (98%) + Kamoran® 10 ppm (HS+KM), Kamoran® 10 ppm + fração F4 1562 µg mL⁻¹ (KM+F4). As barras representam médias de três repetições e quando seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0.05$).

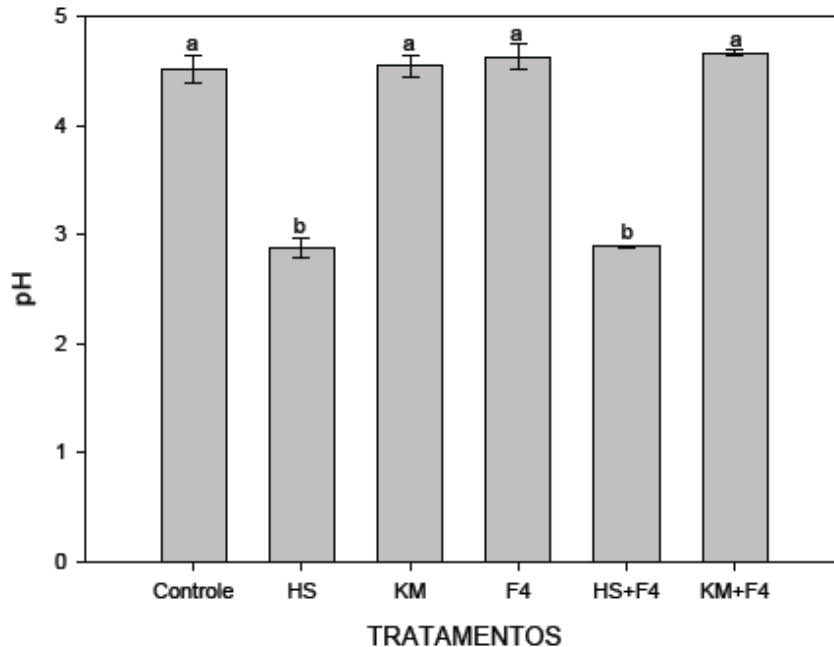


Figura 3 – Teor alcoólico do vinho após fermentação (32 °C 6 h⁻¹) tratado com ácido sulfúrico (98%) (HS); Kamoran® 10 ppm (KM), fração F4 (F4) 1562 µg mL⁻¹, ácido sulfúrico (98%) + Kamoran® 10 ppm (HS+KM), Kamoran® 10 ppm + fração F4 1562 µg mL⁻¹ (KM+F4). As barras representam médias de três repetições e quando seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0.05$).

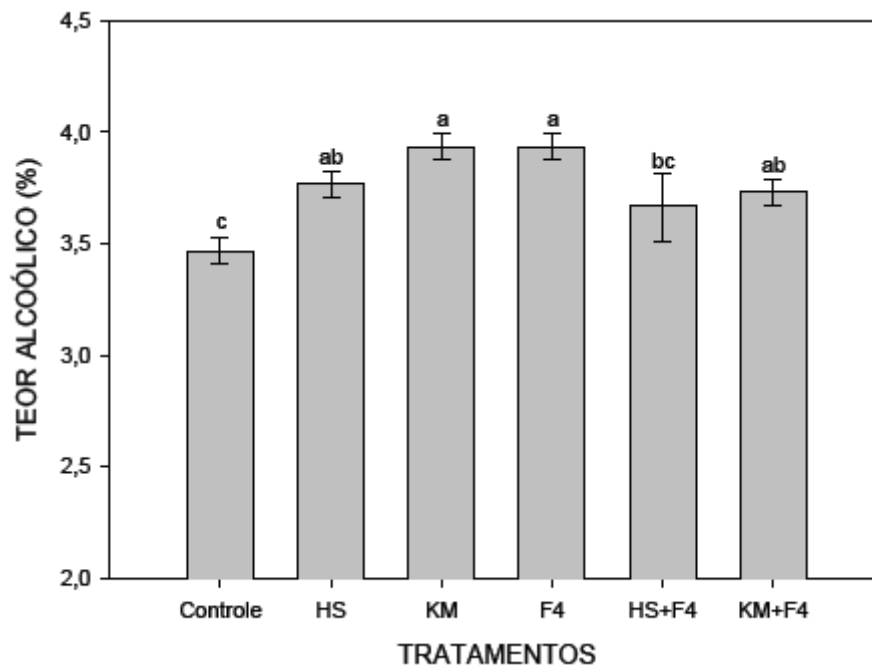


Figura 4 – Acidez total do vinho após fermentação (32 °C 6 h -1) tratado com ácido sulfúrico (98%) (HS); Kamoran® 10 ppm (KM), fração F4 (F4) 1562 µg mL⁻¹, ácido sulfúrico (98%) + Kamoran® 10 ppm (HS+KM), Kamoran® 10 ppm + fração F4 1562 µg mL⁻¹ (KM+F4). As barras representam médias de três repetições e quando seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0.05$).

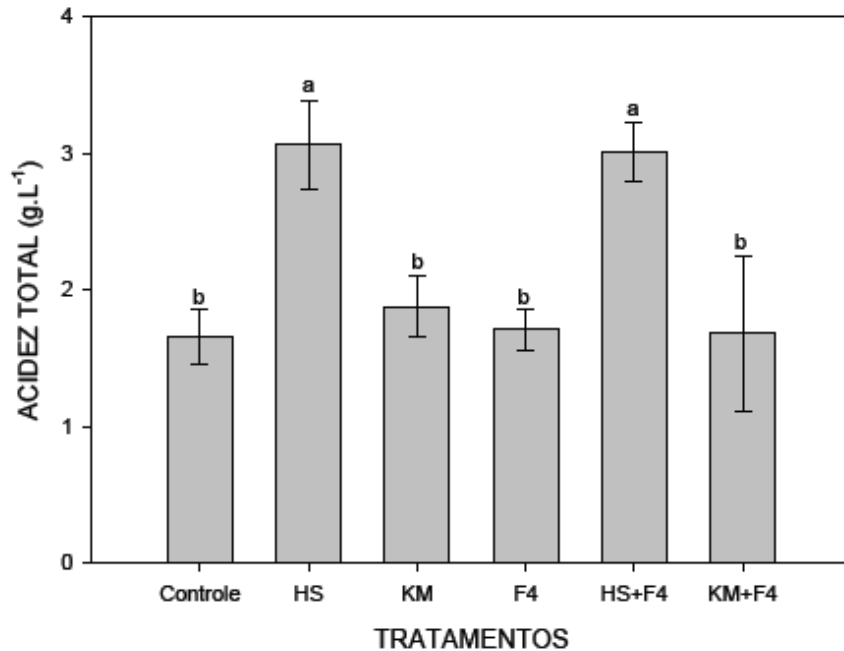


Figura 5 – Açúcares Redutores Residuais do vinho após fermentação (32 °C 6 h -1) tratado com ácido sulfúrico (98%) (HS); Kamoran® 10 ppm (KM), fração F4 (F4) 1562 µg mL⁻¹, ácido sulfúrico (98%) + Kamoran® 10 ppm (HS+KM), Kamoran® 10 ppm + fração F4 1562 µg mL⁻¹ (KM+F4). As barras representam médias de três repetições e quando seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0.05$).

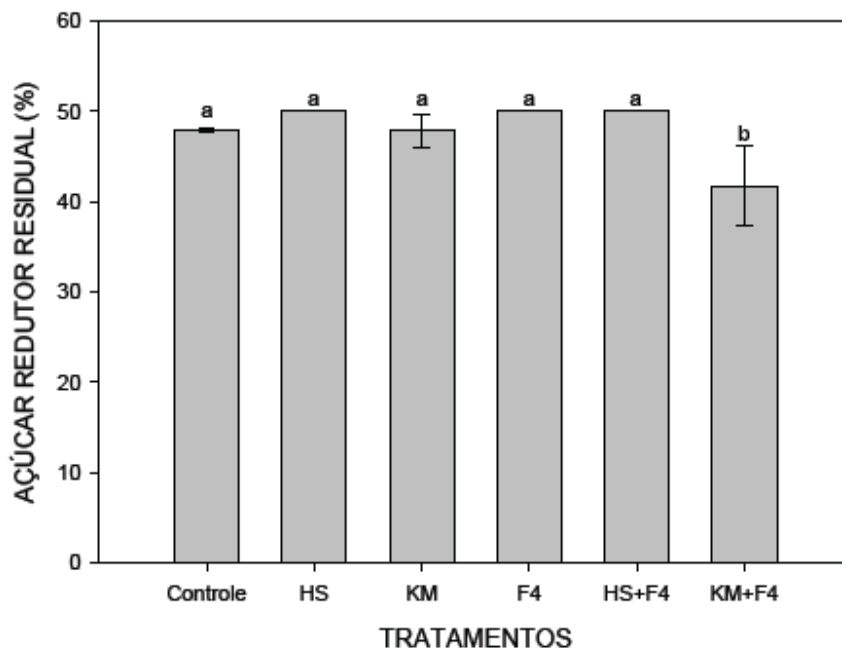


Figura 6 – Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* após fermentação (32 °C 6 h -1) tratado com ácido sulfúrico (98%) (HS); Kamoran® 10 ppm (KM), fração F4 (F4) 1562 µg mL⁻¹, ácido sulfúrico (98%) + Kamoran® 10 ppm (HS+KM), Kamoran® 10 ppm + fração F4 1562 µg mL⁻¹ (KM+F4). As barras representam médias de três repetições e quando seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0.05$).

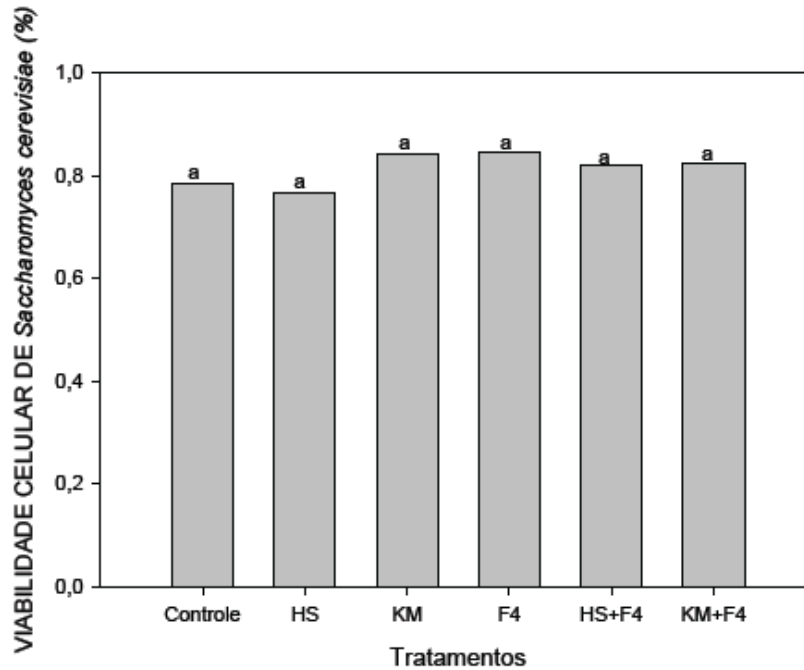


Figura 7 – Brotamento celular de *Saccharomyces cerevisiae* após fermentação (32 °C 6 h -1) tratado com ácido sulfúrico (98%) (HS); Kamoran® 10 ppm (KM), fração F4 (F4) 1562 µg mL⁻¹, ácido sulfúrico (98%) + Kamoran® 10 ppm (HS+KM), Kamoran® 10 ppm + fração F4 1562 µg mL⁻¹ (KM+F4). As barras representam médias de três repetições e quando seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0.05$).

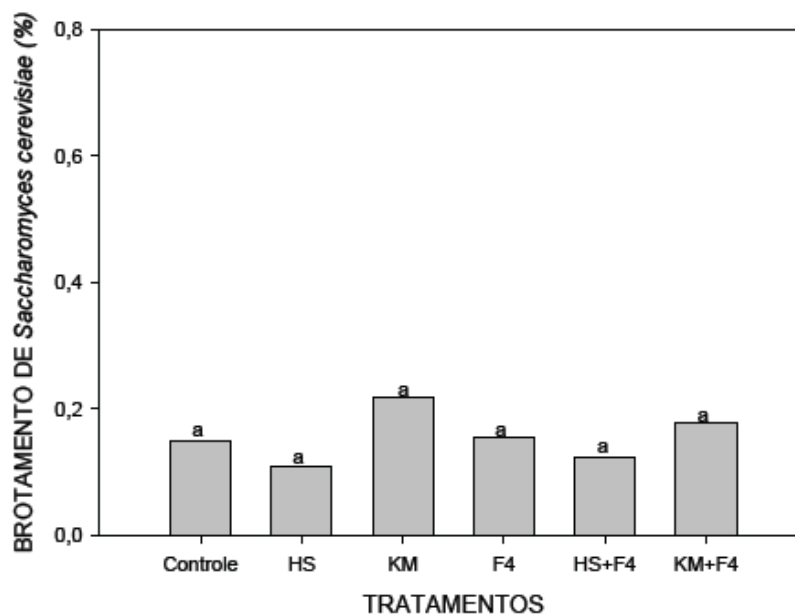


Figura 8 – Viabilidade de brotamento de *Saccharomyces cerevisiae* após fermentação (32 °C 6 h⁻¹) tratado com ácido sulfúrico (98%) (HS); Kamoran® 10 ppm (KM), fração F4 (F4) 1562 µg mL⁻¹, ácido sulfúrico (98%) + Kamoran® 10 ppm (HS+KM), Kamoran® 10 ppm + fração F4 1562 µg mL⁻¹ (KM+F4). As barras representam médias de três repetições e quando seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0.05$).

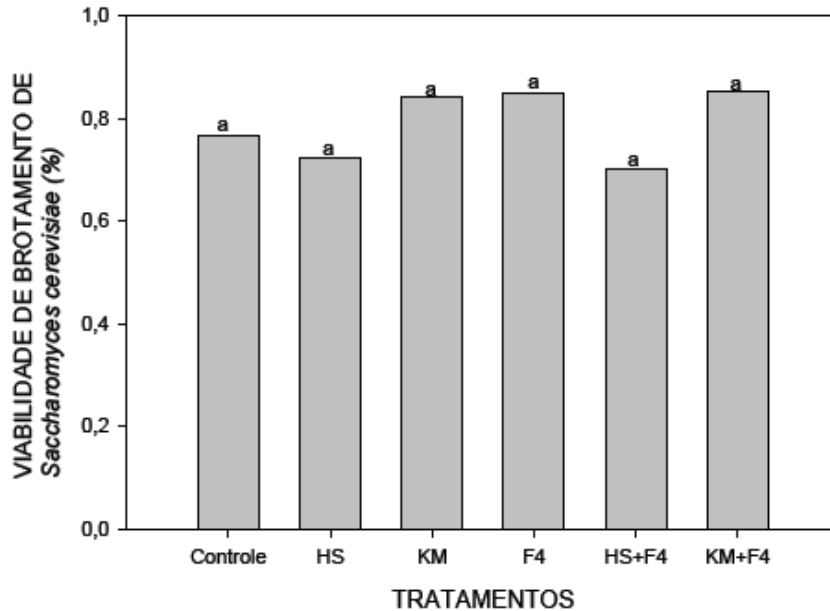


Figura 9 – População de *Saccharomyces cerevisiae* após fermentação (32 °C 6 h⁻¹) tratado com ácido sulfúrico (98%) (HS); Kamoran® 10 ppm (KM), fração F4 (F4) 1562 µg mL⁻¹, ácido sulfúrico (98%) + Kamoran® 10 ppm (HS+KM), Kamoran® 10 ppm + fração F4 1562 µg mL⁻¹ (KM+F4). As barras representam médias de três repetições e quando seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0.05$).

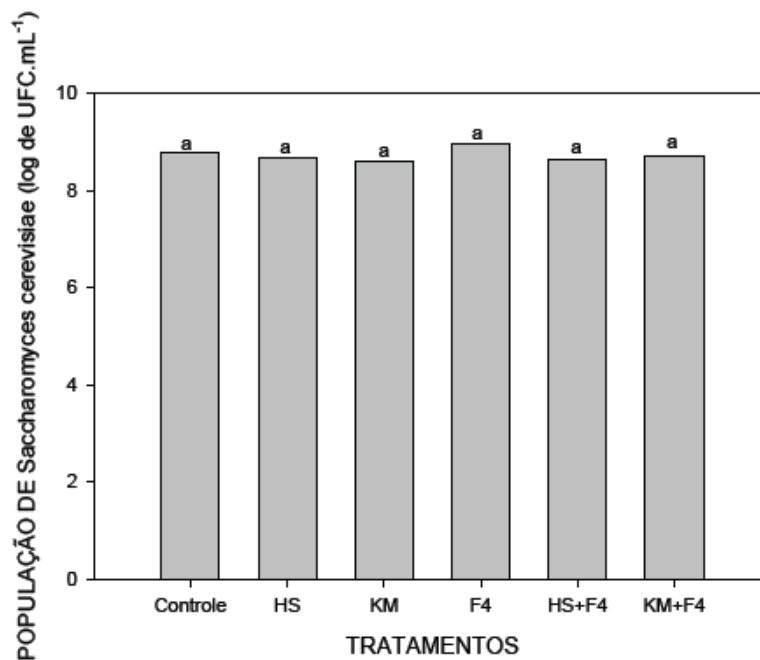


Figura 10 – População de *Lactobacillus* sp. após fermentação (32 °C 6 h -1) tratado com ácido sulfúrico (98%) (HS); Kamoran® 10 ppm (KM), fração F4 (F4) 1562 µg mL⁻¹, ácido sulfúrico (98%) + Kamoran® 10 ppm (HS+KM), Kamoran® 10 ppm + fração F4 1562 µg mL⁻¹ (KM+F4). As barras representam médias de três repetições e quando seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si ($p < 0.05$).

