

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Efeito da radiação ultravioleta em microrganismos,
composição físico-química e isolamento de leveduras
selvagens resistentes em caldo de cana-de-açúcar
variedade RB-867515**

Autora: Valéria Cristina Ferreira da Silva
Orientadora: Prof. Dr^a. Marney Pascoli Cereda

“Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA, no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Agropecuária.

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Abril – 2010

RESUMO

Apesar da importância da produção de etanol no Brasil, as destilarias de etanol de cana-de-açúcar convivem com contaminação no processo de fermentação. A radiação ultravioleta tipo C tem sido utilizada há muito tempo para superfícies e líquidos transparentes, mas há pouca informação sobre desinfecção de líquidos turvos e coloridos como caldo de cana. Para avaliar o efeito da UV C na redução da carga microbiana foi selecionada cultivar RB-7515, de cana-de-açúcar com colmos de primeiro e segundo corte, cultivada em 20°26'34" Sul, 54°38'47" Oeste, 630 metros. Para tratamento do caldo de cana com UVC foi utilizado lâmpada de média pressão com 3 tipos de reatores em sistema contínuo para tratamento do caldo. Da empresa Surepure foram avaliados dois reatores, identificados por 1.0 doses de 0, 250, 500, 1000, 2000 e 4000 Joules. L⁻¹ e comprimento de onda (241.1nm) e o reator 1.3 com doses de 500, 1000, 2000 e 4000 Joules. L⁻¹ e comprimento de onda (254.1 nm). A confirmação da resistência à radiação UV foi feita com uma lâmpada germicida com comprimento de onda entre 235 a 280 nm da empresa Germetec que proporcionou doses de radiação UV de 880, 1760, 2640, 3520 e 4400 Joules. L⁻¹. Em cada experimento 120 litros de caldo de cana foram usados. Foram feitas análises físico-químicas para dosar açúcar redutor, açúcar redutor total de acordo com (Somogyi, 1945 e Nelson, 1994); pH, Acidez segundo as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005). A determinação de teor alcoólico foi de acordo com Amerine e Ough (1976) com leitura a 20°C. As análises microbianas compreenderam determinação de leveduras, aeróbios mesófilos totais e coliformes totais e fecais de acordo com American Public Health Association (APHA, 2001) e leveduras selvagens por Ceccato-Antonini (2004). As contagens foram feitas em

placas (ágar-batata e LWYN) e a avaliação com corante vital por Ceccato-Antonini (2004). **O artigo 1** analisou o efeito de radiação Ultravioleta tipo C (reator Surepure 1.0) sobre os microrganismos e a composição físico-química de caldo do cana. O caldo apresentou de 21° com pH 5,3 apresentou 272,83g.L⁻¹ de sacarose e 31.03g.L⁻¹ açúcares redutores (AR), 34,0 aeróbios mesófilos totais (AMT) e 5,3 para leveduras (L) todos expressos em 10⁶ UFC/mL, número de > 1,1. 10⁶ NMP de coliformes totais (CT) e coliformes fecais (CF). Todos os microrganismos resistiram até 1000 Joules.l⁻¹ mas as leveduras e CT foram encontradas até a dose de 4000 Joules. l⁻¹. O teor de ANR aumentou com as doses de UVC enquanto AR foi reduzido. Concluiu-se que nas condições do experimento a redução de carga microbiana depende da carga inicial, mas sobreviventes foram encontrados na dose mais alta. **O artigo 2** avaliou o uso da radiação ultravioleta (UVC) (Reator Surepure 1.3) na fermentação alcoólica de caldo de cana com inoculação de levedura selecionada comercial PE-2. O caldo apresentou composição semelhante ao do **artigo 1** e diluído a 12°B com água tratada a 4000 Joules. l⁻¹/30 minutos e foi inoculado com levedura comercial PE-2 (1% p/v) e incubado entre 9°C e 25°C. O mosto obtido apresentou pH de 3,57 com média de Açúcares Redutores (AR) de 103,6 g.l⁻¹ e Açúcares Não Redutores de 23,2 g.l⁻¹. A microflora apresentou 135,00 aeróbios mesófilos totais (AMT) e 90,00 leveduras (L) e 112,18 leveduras selvagens (LWYN) expressas em 10⁶UFC/ml com coliformes totais (CT) e fecais (CF) de 2,10. 10⁶ NMP /ml. O tratamento eliminou CT e CF na dosagem de 500 Joules. l⁻¹, mas os AMT e L resistiram até a maior dosagem. O controle (Tratamento 0) apresentou perfil semelhante aos demais tratamentos com estabilização ao redor de 24 horas com Brix 4,0. O teor alcoólico foi de 5,0 INPM para todos os tratamentos. Embora a contaminação tenha sido reduzida, a fermentação não foi eficiente o que se comprova pelo baixo teor alcoólico, residual de AR (42,12 g/l⁻¹) e ANR (8,02 g/l⁻¹) e pelo fato de que não proporcionou fermentação mais rápida ou com melhor rendimento alcoólico. Além da temperatura baixa a baixa eficiência pode ser creditada em parte pela sobrevivência de microrganismos e pela redução dos açúcares fermentescíveis. **O artigo 3** avaliou a fermentação de mosto de cana em condições semelhantes a do **artigo 2**. O mosto obtido apresentou pH de 3,6 com média de Açúcares Redutores (AR) de 103,6 g.l⁻¹ e Açúcares Não Redutores de 23,2 g.l⁻¹. A microflora apresentou 135,00 aeróbios mesófilos totais (AMT) e 90,00 leveduras (L) e 112,18 leveduras selvagens (LWYN) expressas em 10⁶UFC/ml com coliformes totais (CT) e fecais (CF) de 2,10. 10⁶ NMP

/ml. O tratamento eliminou CT e CF na dosagem de 500 Joules. l⁻¹, mas os AMT e L resistiram até a maior dosagem. O mosto fermentou com leveduras da microflora no caldo (10⁶ UFC por ml) e estabilizou em 120 horas com Brix 5°. Houve baixo consumo de AR, mas os ANR aumentaram de 0,01 para 1,37%. O teor alcoólico foi 5,0 INPM em todos os tratamentos. Embora a fermentação não tenha sido eficiente considera-se que a sobrevivência de leveduras selvagens e a fermentação que decorreu como resultados promissores que sugerem que essas leveduras devam ser avaliadas como agentes, pensando em seu uso potencial em mostos submetidos a tratamento com radiação. As justificativas da baixa eficiência na fermentação foram semelhantes as do **artigo 2**. O **artigo 4** teve como objetivo isolar leveduras selvagens resistentes a radiação ultravioleta de fermentado de caldo de cana e estabelecer seu potencial como fermento. As cepas isoladas e descritas como morfotipos passaram por teste de fermentação e apenas 3 foram selecionadas, todas com coloração branca e superfície brilhante. As cepas foram receberam as siglas PPG, LB, LBB e foi incluída levedura comercial PE-2 para fins de comparação. Para confirmar a resistência a UVC (Empresa Germetec) foi estabelecido um experimento com caldo da cultivar RB-7515 ajustado a Brix 12 e as cepas selecionadas foram multiplicadas até se obter inóculo suficiente para um volume de mosto de 20 litros. Esse volume inoculado foi amostrado para análises para submetido a doses de 0, 880, 1760, 2640, 3520 e 4400 Joules/l⁻¹. A resistência foi avaliada por contagens em meio Agar-batata e por leitura direta em lâmina de Newbauer com corante vital. A avaliação de resistência foi calculada pela percentagem de células viáveis (expressas em UFC por ml) da testemunha (sem tratamento) em relação a obtida em cada dose. Em relação as doses crescentes a cepa PPG apresentou 74, 62, 41, 56 e 1,27%, a LBB 74, 72, 52, 51 e 46%, a LB 89, 76, 59, 55 e 49%. A PE-2 apresentou 61, 50, 36, 49 e 13%. Quanto a resistência observa-se que as cepas LB e LBB apresentaram a maior resistência a todas as dosagens avaliadas, embora tenham apresentado as menores viabilidades pelo método de corante vital.

Palavras chave: microrganismos, isolamento, coliformes, leveduras selvagens, ultravioleta, fermentação alcoólica.