

**COMPETIÇÃO ENTRE LEVEDURAS *Saccharomyces cerevisiae* (LEEUWENHOEK, 1680) (Saccharomycetales: Saccharomycetaceae) E BACTERIAS *Bacillus sp.* DO PROCESSO FERMENTATIVO DA AGROINDÚSTRIA SANTA MARIA DE MANDURI - SP**

**COMPETITION AMONG YEAST *Saccharomyces cerevisiae* (LEEUWENHOEK, 1680) (Saccharomycetales: Saccharomycetaceae) and *Bacillus sp.* AND FERMENTATION PROCESS IN AGROINDUSTRIA OF SANTA MARIA DE MANDURI - SP**

<sup>1</sup>GUIDIO, A. S.; <sup>2</sup>FRANCISCO, O.

<sup>1e2</sup>Departamento de Ciências Biológicas –Faculdades Integradas de Ourinhos-FIO/FEMM

**RESUMO**

As contaminações e o baixo rendimento quando caminham juntos na fermentação alcoólica, tornam-se um problema de difícil resolução. Fundamentalmente é preciso conhecer o processo fermentativo, que vem sendo constantemente aprimorado no intuito de estabelecer formas relevantes e com baixo custo, na tentativa de resolver os problemas de contaminação que consiste em mais de uma forma de custo para a empresa de produtos para controle. O objetivo deste trabalho foi observar a competição existente entre leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e bactérias do gênero *Bacillus sp.*, pelo mesmo substrato (mosto) e principalmente o impacto causado na produção e rendimento industrial. Foi constatado também que, devido a esta competição, as perdas são de dimensões irreparáveis por causar queda significativa na produção do etanol e estas infecções, quando não controladas com os meios adequados podem ocasionar a perda total da fermentação. Este estudo mostra a partir de dados que corroboram com outros estudos já realizados e que chegam ao resultado de que a melhor forma de controle microbiológico é a prevenção, não deixando a produção chegar a perdas extremas.

Palavras-chave: bactérias, competição, fermentação, leveduras, rendimento.

**ABSTRACT**

The contamination and low income when they walk together in the fermentation becomes a problem difficult to solve. Basically you need to know the fermentation process, which has been constantly improved in order to establish relevant forms and low cost in an attempt to solve the problems of contamination that turns out to be another form of cost to the company's control products. The objective of this study was to observe the competition between *Saccharomyces cerevisiae* and bacteria of the genus *Bacillus*, the substrate (must) and especially the impact on industrial production and income. It was also found that because of this competition, the losses are irreparable dimensions to cause a significant decrease in the production of ethanol and these infections, if not controlled with the means can cause the total loss of fermentation. This study shows from data corroborate other previous studies that reach the result that the best way to microbiological control is prevention, not leaving the production to reach extreme losses.

Keywords: bacteria, competition, fermentation, yeast, yield.

## INTRODUÇÃO

Desde pesquisas realizadas por Alcard et al. (2003) a respeito da contaminação na fermentação alcoólica, mostrou que bactérias do gênero *Bacillus* e *Lactobacillus* são microorganismos que normalmente contaminam o processo de fermentação realizada por leveduras, sendo que esta contaminação pode causar queda da viabilidade das leveduras e da eficiência da fermentação, provocando a diminuição do rendimento da produção de álcool, sendo que muitos são os tratamentos para seu controle, sendo usado também a irradiação que torna se também bastante eficaz.

Enfatizam Cabrini e Gallo (1999), que a maioria das espécies de leveduras obtidas num processo de fermentação para a produção de álcool foi a do gênero *Saccharomyces* e a espécie foi *S. cerevisiae*.

Já em outros estudos, realizados por Meneghin et al. (2008), verificaram que a produção de etanol, tanto no processo de fermentação contínuo, quanto num processo de fermentação batelada, tem muitos problemas com contaminantes bacterianos, sendo que esses, competem com a levedura pelo mesmo substrato (açúcar), diminuindo a produção.

Verifica-se também, que o assentamento de células de leveduras no fundo das dornas e perdas de células na centrifugação, podem também ser causados por bactérias floculantes. A floculação do fermento usado nas indústrias sucroalcooleiras faz com que esse assentamento dificulte a conversão do açúcar em álcool, já que as leveduras devem ficar suspensas no meio fermentativo, levando a queda do rendimento, tal como, a produtividade do etanol, tendo a necessidade de repor essas células que se perdeu na centrifugação. (LUDWIG et al., 2001).

Mas ainda, conforme Noris e Joseph (1977), para um melhor rendimento e um menor uso de subproduto, têm que haver o selecionamento de cepas de levedura que são mais resistentes e produtivas para levar o possível custo da fermentação para o mínimo.

Outros estudos mostram que a infecção causada por bactérias da fermentação alcoólica do gênero *Bacillus* e *Lactobacillus*, bem como seus produtos metabólicos, quando associados no mesmo processo fermentativo, podem causar danos ao processo, assim como podendo ocorrer significativa queda no rendimento. (NOBRE, 2007).

Conforme Marques e Serra (2004), nas usinas sucroalcooleiras o método mais utilizado é o processo de reciclagem das células de levedura por centrifugação, porém, juntamente com essas células acumulam também os compostos tóxicos à fermentação produzidos no processo, o que ocasiona baixa eficiência e queda na viabilidade, afetando a produtividade.

Pesquisas realizadas por Alquati e Antunes (1990), a contaminação por bactérias num processo de fermentação deve ser considerado, pois há uma bioconversão dos açúcares em outros subprodutos que não seja o etanol e pelo fato das transformações da matéria prima fermentável em outros compostos, por influência da competição das leveduras com outros contaminantes, o que provoca perdas irreparáveis de grande dimensão no rendimento fermentativo.

Já estudos feitos por Yokoia (1991) e Stupiello (1981), mostram que parte dos microorganismos que atrapalham o processamento da cana de açúcar, já vem com a própria planta, porém essa carga bacteriana aumenta ao longo do processo de fermentação, degradando a sacarose que resulta em subprodutos que causam perdas diretas na produção.

Trabalhos realizados por Borzani (2006), também mostram que o rendimento fermentativo pode cair com o aumento da concentração de biomassa, fato que influencia no processo de produção do álcool.

O presente trabalho tem como objetivo observar e comprovar a competição entre leveduras e bactérias pelo mesmo substrato e o impacto causado no rendimento, devido à competição, assim como verificar as espécies de cepas de leveduras utilizadas no processo, como também as bactérias que mais acometem a fermentação alcoólica; constatando que por conta desta competição há uma queda na produção de álcool, sendo que estas infecções precisam ser controladas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

As amostras foram feitas no ano de 2008 na Agroindústria Santa Maria, localizada na Estrada Municipal dos Nunes, Sítio dos Nunes, em Manduri SP. As amostras foram coletadas em frascos limpos, sendo analisadas imediatamente após as coletas.

O material utilizado como vidrarias foram: Tubos de ensaio com tampa esmerilada, proveta de 50 ml, câmara de Neubauer espelhada, lamínula para microscopia (22.0 x 22.0 mm), lâminas para microscopia (26 x 76 mm), Becker de

250 ml, pipetas de 0,1 ml e 1 ml. Os equipamentos utilizados foram: Microscópio; contador de células Phoenix, agitador de tubos Phoenix, usando como reagentes para contagem de Bactérias foram utilizados o corante Azul de Metileno + Sulfato Azul de Nilo e óleo de imersão. Para contagem de leveduras foram utilizados o corante de Eritrosina e óleo de imersão.

Os Softwares utilizados para armazenar os dados foram as planilhas do Programa Excel e os gráficos. A metodologia utilizada foi a da Fermentec de Piracicaba, onde:

**a)** Para a contagem de bactérias – Diluiu-se a amostra adequadamente, utilizando água destilada. Transferiu-se para um tubo de ensaio, 1,0 ml da amostra diluída e adicionou-se 1,0 ml do corante azul de metileno + sulfato azul de Nilo, agitando o tubo de ensaio no agitador. Limpou-se a pipeta com papel higiênico antes de transferir o volume para a lâmina, transferiu-se 0,003 ml de amostra para uma lâmina de vidro (26 x 76), colocando sobre a amostra uma lamínula de vidro (22 x 22), tendo o cuidado para a formação de bolhas, adicionando-se uma gota de óleo de imersão e procedendo à contagem dos bastonetes.

$$\text{Cálculo: Bast/ml} = \text{FM} \times \frac{1}{\text{Vol amostra}} \times \text{M} \times \text{D}$$

Onde: 0,003 - é o volume da amostra;

FM - é o fator do microscópio;

M - é o total de bactérias vivas / n.º campos contados;

D - é a diluição utilizada;

Fator do microscópio = área da lamínula / área do campo do microscópio.

$$\text{Área do microscópio} = \frac{\pi \times D^2}{4}$$

$$\text{Área da lamínula} = 22 \times 22 = 484$$

**b)** Para viabilidade e brotamento celular das leveduras - As amostras foram homogeneizadas e analisadas imediatamente após a coleta, seguindo a metodologia: Homogeneizou-se a amostra, colocando 50 ml de água para tubo de ensaio (ou outro volume se fosse necessário), adicionou 1 ml de amostra e homogeneizou, transferiu 1 ml desta mistura para um tubo de ensaio, adicionou 1 ml de corante Eritrosina ao tubo de ensaio e agitou, transferindo uma alíquota desta mistura para câmara de Neubauer, retirando o excesso com o auxílio de um papel higiênico. Colocou-se a lâmina sobre os retículos da câmara de Neubauer,

adicionou uma gota de óleo de imersão sobre a lamínula e procedeu-se à imersão da objetiva de 100 vezes, foram feitas as contagens das células não coradas (vivas), das células coradas (mortas), dos brotos não corados (brotos vivos) e dos brotos corados (brotos mortos); Contou-se os quatros retículos centrais de cada quadrículo, que na soma dá 100 retículos, considerando todas as células que estão no interior deles e as que estão até  $\frac{1}{2}$  para dentro, considerando como brotamento as células que for menor ou metade do tamanho da célula-mãe, contou-se em média 500 células na amostra, caso fosse maior que isso, era mudada a diluição.

$$\text{Cálculo: } \% \text{ viabilidade celular} = \frac{\text{n.}^\circ \text{ células vivas}}{\text{n.}^\circ \text{ células vivas} + \text{mortas}} \times 100$$

$$\% \text{ brotamento} = \frac{\text{n.}^\circ \text{ brotam. vivos}}{\text{n.}^\circ \text{ células vivas}} \times 100$$

$$\% \text{ viabilidade de brotamento} = \frac{\text{n.}^\circ \text{ brotos vivos}}{\text{n.}^\circ \text{ total de brotos}} \times 100$$

$$\text{N}^\circ \text{ células vivas / ml} = \frac{\text{Total células vivas}}{\text{Total retículo contado}} \times 4.000 \times D \times 10^3$$

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Foi revelado pelos dados obtidos que, quando a viabilidade das células de leveduras está alta e a infecção do vinho está baixa, a produção e o rendimento da fermentação aumentam, levando em consideração outros aspectos do próprio processo, sendo que, quando ocorre a competição com as bactérias, a tendência é cair o rendimento e conseqüentemente a produtividade, conforme visto por Meneghin et al. (2008).(Ver tabela 1).

Foi observado também que a medida que a infecção de certas amostras foi aumentando, a floculação também acompanhou esses resultados, levando a formação de aglomerados de células de leveduras devido ao aumento do número de bactérias ,ocasionando concentração de fermento no fundo da dorna, a morte de células de leveduras e assim como citaram Ludwig et al. (2001).

**Tabela 1.** Comparação entre as médias altas e médias baixas (mensal) de Rendimento Geral, eficiência da fermentação e infecção obtidas na Agroindústria de Manduri -SP.

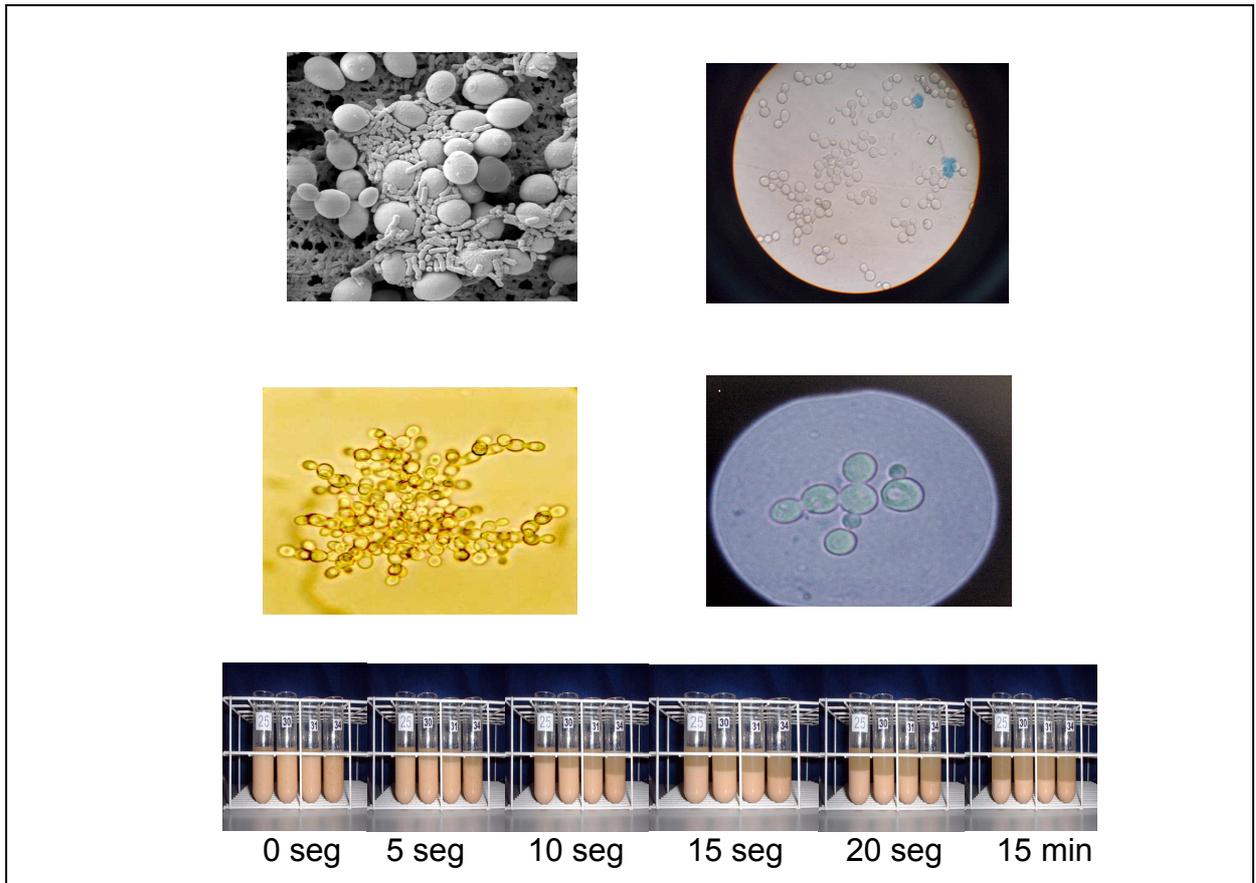
Meses	Rendimento Geral %	Eficiência da Fermentação %	Infecções Bacterianas $\times 10^6 / \times 10^7$
Maio	84.26	90.33	$2.0 \times 10^6$
	72.59	80.29	$3.0 \times 10^6$
Junho	83.32	89.39	$1.0 \times 10^7$
	56.83	61.02	$2.5 \times 10^7$
Julho	83.17	89.76	$1.5 \times 10^7$
	68.45	74.55	$2.4 \times 10^7$
Agosto	57.72	64.86	$1.2 \times 10^7$
	82.31	89.72	$1.0 \times 10^7$
Setembro	80.69	87.19	$1.9 \times 10^7$
	64.44	70.42	$2.2 \times 10^7$
Outubro	81.42	90.20	$1.2 \times 10^7$
	66.30	74.73	$1.8 \times 10^7$
Novembro	84.59	91.80	$1.2 \times 10^7$
	65.49	80.80	$1.8 \times 10^7$
Dezembro	80.37	93.12	$1.4 \times 10^7$
	74.14	82.23	$1.6 \times 10^7$

\* significativamente sendo controlados com bactericidas e antibióticos.

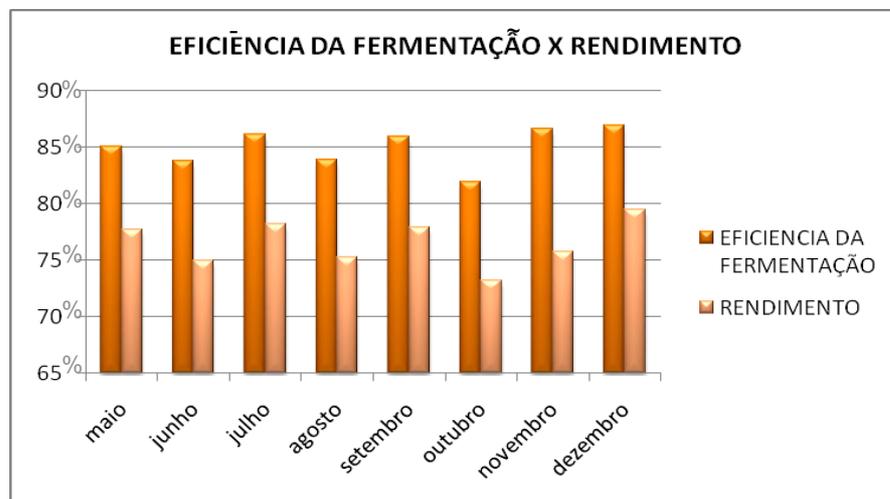
Concordando com estudos já realizados, dos microorganismos observados no processo de fermentação da Agroindústria Santa Maria, foram encontradas bactérias do gênero *Bacillus* e *Lactobacillus*, conforme Alcard et al. (2003).

As leveduras encontradas foram as do gênero *Saccharomyces* e espécie *cerevisiae*, tal como já observou Gallo (2003).

Conforme pode ser visualizado na figura 2, a produção aumenta de acordo com a eficiência fermentativa.



**Figura 1.** Características Morfológicas e Bioquímicas de Leveduras *Saccharomices cerevisiae* e bactérias *Bacillus* sp. **A)** Imagem de células de Leveduras sp em competição com Bactérias sp, ao microscópio eletrônico de varredura. (Fermentec - Piracicaba, 2002). **B)** Leveduras *Saccharomices cerevisiae*, encontradas nas amostras coletadas na Agroindústria Santa Maria de Manduri SP. **C)** Formação de aglomerados de células de Leveduras dando origem às floculações. **D)** Leveduras *Saccharomices cerevisiae*, encontradas no processo fermentativo da Agroindústria Santa Maria de Manduri – SP. **E)** Formação da floculação causada por infecção de bactérias em amostras representando o impacto causado no fundo das dornas de Fermentação Alcoólica.



**Figura 2 –** Comparação da medias mensais entre a eficiência da fermentação e o rendimento geral da Agroindústria Santa Maria de Manduri – SP.

## CONCLUSÃO

Concluiu-se então, com o presente trabalho que, ao controlar os níveis de infecção e conseqüentemente a competição nas dornas de fermentação, a eficiência de fermentação aumenta e por seguinte a produtividade.

## REFERÊNCIAS

- ALCARDE, A. R.; WALDER, J. M. M.; HORII, J. Fermentation of irradiated sugarcane must. **Sci.Agric.** v. 60, n. 4, p. 677-681, 2003.
- ALQUATI, P.H. Caracterização e controle de microorganismos contaminantes em microdestilarias de álcool. Pelotas, 1990. Tese (Doutorado em Agronomia) Universidade Federal de Pelotas.
- BORZANI, W. Fermentação alcoólica descontínua: a correlação entre o rendimento da fermentação e a concentração inicial de biomassa depende do que se considere etanol produzido. **Braz. J. Microbiol.** v.37, n.1, p. 87-89, 2006.
- CABRINI, K. T.; GALLO, C. R. Identificação de leveduras no processo de fermentação alcoólica em usina do Estado de São Paulo, Brasil. **Sci.Agric.** Depto de Agroindústria, Alimentos e Nutrição ESALQ / USP. Piracicaba v.56, n. 1, 2003
- LUDWIG, K.M; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS D.F. Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** , Campinas, v.21, n.1, p. 63-68, 2001.
- MARQUES, T.A; SERRA, G.E. Estudo da reciclagem de células na produção biológica de etanol. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.24, n.4, p. 532-535, 2004.
- MENEGHIN, S. P.; REIS, F. C.; ALMEIDA, P. G.; ANTONINI, S. R.C. Dióxido de cloro contra bactérias e leveduras da fermentação alcoólica. **Braz. J. Microbiol.** v.39, n.2, p.337-343, 2008.
- NOBRE, T. P.; HORII J.; ALCARDE, A. R. Viabilidade celular de *Saccharomyces Cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** , Campinas, v. 27, n.1, p. 20-25, 2007.
- NORIS R.S.; JOSEPH A. B.J. **Indústria de processo Químico**, 4º ed.,1977, 717p.
- STUPIELLO, J.P. **Curso de qualidade da matéria prima**. Cd Room, 2006.
- YOKOIA, F. Problemas com contaminantes na fermentação alcoólica. **STAB**, Piracicaba, v.1, n.1, p. 38-39, 1991.