

# INFLUÊNCIA DE CONTAMINANTES NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO DO CALDO DA CANA-DE-AÇUCAR

## INFLUENCE OF CONTAMINANTS IN FERMENTATION BROTH OF SUGAR CANE

<sup>1</sup>LARA, L. C. S.; <sup>2</sup>HIRGA, R.; <sup>3</sup>FRANCISCO, O.

<sup>1,2e3</sup>Departamento de Ciências Biológicas – Faculdades Integradas de Ourinhos - FIO/FEMM

### RESUMO

O etanol, produto economicamente muito importante para o país, é produzido através da fermentação alcoólica. É comum em seu processo a infecção por meio de bactérias contaminantes causando queda da viabilidade celular das leveduras, consequentemente menor rendimento, devido as toxinas e ácidos excretados no mosto. Outro problema é a competição de leveduras selvagens com as leveduras selecionadas que podem ultrapassar seu número em pouco tempo devido ao seu caráter agressivo tomando conta do processo e ocasionando um rendimento inferior e causando diversos problemas operacionais, como a produção de espumas que diminuirá a capacidade de fermentação da dorna levando a contaminação do meio, a floculação, provocando o assentamento de leveduras no fundo das dornas e a conseqüente perda destas células nas centrifugas. O objetivo deste trabalho foi comentar sobre a influência de contaminantes no processo fermentativo, citando os tipos mais comuns e agravantes, e sobre o procedimento de cura como: o controle do pH por ácido sulfúrico, e uso de um biocida ou antibiótico mais adequado para seu controle, contribuindo para uma melhor produção do etanol. Os resultados mostraram que a presença de contaminantes causa diversos problemas como: a queda de rendimento na fermentação diminuindo a produção do álcool, problemas operacionais, maior gasto com o uso de antiespumantes, dispersantes, biocidas e antibióticos para seu controle.

Palavras-chave: leveduras, contaminantes, fermentação, rendimento.

### ABSTRACT

The ethanol, set as an product very important and economically for Brazil, are produced by fermentation. It is common in infection process by means of contaminant bacteria, causing a decrease in cell viability of yeast, causing lower ethanol production, due to toxins and acids excreted in the must. Another problem is the competition with the wild yeast which may exceed their number in a short time due to its aggressive, damaging the process, being produced a lower income and causing several operational problems, such as foam production, that reduce the fermentation capacity in the vat and lead to contamination of syrup, causing flocculation and precipitating the yeast in the bottom of the vats, with the consequent loss of these cells in the centrifuge process. The objective was to comment the influence of contaminants in the fermentation process, disseminating the most common and aggravating contaminants types, and the cured management applied to control of pH by sulfuric acid, and use of an antibiotic most appropriate for the control, contributing to improved production of ethanol. The results showed that the presence of contaminants, causing various problems with: such as declining income in the fermentation, reducing the production of alcohol, operational problems, leading to more spending on the use of inhibitors, dispersants, biocides and antibiotics to control it.

Keywords: yeast, contaminants, fermentation, yield.

## INTRODUÇÃO

A contaminação do mosto consiste em um problema muito comum nas usinas de açúcar e álcool devido à formação de diversos compostos indesejáveis numa fermentação normal e do consumo de parte do álcool produzido, provocando prejuízos, sendo, portanto um fator muito importante, o qual tem que ser considerado durante processo de fermentação para obtenção do álcool. O número de bactérias pode aumentar significativamente desde um tempo de corte prolongado até a sua moagem, como também pela falta de higienização das moendas, filtros, tubulações etc. que ficam em contato com o caldo durante o processo até a obtenção do produto final. (ALQUATI, 1990).

A qualidade da cana é muito importante, pois ela é a principal entrada de contaminantes, além de outros fatores que podem influenciar no nível de contaminantes como: o tempo de queima, pragas (broca, cupim, e etc.), tipo de colheita (manual ou mecanizada, influenciando na quantidade de terra que vem junto), armazenamento e o clima. Uma temperatura alta (800 a 1000 °C) na queima durante a colheita, poderá causar danos a casca da cana possibilitando a entrada de microorganismos e sua contaminação. (VALSECHI, 2006).

Também segundo dizem Yokoya (1991) e Stupiello (1981), desde o corte da cana até o final do processo de produção do álcool, esses contaminantes já estão presentes.

De acordo com Ludwig, Neto e Angelis (2001), o assentamento de células de levedura no fundo das dornas causará queda do rendimento na fermentação e a perda destas células nas centrífugas, isso é causado devido a contato com gomas sintetizadas por bactérias floculantes, como por exemplo, a floculação da *Saccharomyces cerevisiae* pelo *Lactobacillus fermentum*, pelo contato das leveduras com as próprias bactérias contaminantes ou também com algumas leveduras floculantes.

Segundo uma pesquisa feita por Nobre, Horii e Alcarde (2007), das bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus* testados somente as bactérias *Lactobacillus fermentum* e *Bacillus subtilis* causaram uma queda no rendimento da *Saccharomyces cerevisiae* em cultivo misto. Apenas a presença dos metabólicos celulares das outras bactérias não foi o suficiente para reduzir a viabilidade. A principal causa da diminuição da viabilidade celular *Saccharomyces cerevisiae* foi a acidez do meio com a presença das bactérias.

Conforme Cabrini e Gallo (1998), outro problema sério que afeta o rendimento da fermentação alcoólica, são as leveduras selvagens que podem ultrapassar o número de leveduras selecionadas do meio fermentativo em pouco tempo devido seu caráter agressivo na competição pelo açúcar, causando prejuízos na fermentação como a queda no rendimento, maior tempo de fermentação no processo, problemas operacionais ou também apresentar efeito contrário, tendo um bom desempenho, sendo então selecionadas para uma utilização em um processo de fermentação posterior.

Em um estudo feito por Gomes et al. (2000), pesquisou-se sobre um gene marcador para identificação de células e colônias contaminantes de detecção rápida e fácil de realizar além de outros marcadores que podem auxiliar na visualização da cultura marcada. O gene utilizado é o GFP (green fluorescent protein), este se mostrou eficiente na marcação de células, visualização das populações e tecidos marcados. É um método muito eficiente no controle de células contaminantes em processos fermentativos, além de servir também como proteção industrial do material genético.

O presente trabalho teve como objetivo, comentar a influência de contaminantes no rendimento do processo fermentativo, levantar as possíveis causas da presença dos mesmos, identificar os tipos mais comuns e mais agravantes de contaminantes e por fim comentar sobre o procedimento de cura da infecção através do método mais adequado contribuindo para uma melhor produção do etanol.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Para a avaliação do efeito de contaminantes no processo fermentativo, foram utilizadas informações coletadas na Usina São Luiz da cidade de Ourinhos/SP, a pesquisa foi direcionada para o laboratório de Microbiologia com o químico responsável Sr. Antônio Geraldini Sobrinho, além de um acompanhamento das análises e combate as infecções da fermentação com analistas do setor, e também com o responsável pela área de fermentação, o Supervisor de Produção Industrial Sr. Marco Jorge Zimak.

As visitas foram realizadas no mês de setembro de 2009.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A levedura utilizada é a *CAT-1* e a levedura de panificação *Fleishman* (Figura 2) no início da safra, para seleção e, já no meio da safra o processo é praticamente dominado por leveduras selvagens (Figura 3).

A contaminação mais comum é por bactérias na forma de bastonetes, como por exemplo, a *Leuconostoc mesenteroides*, que produz uma goma chamada de dextrana provocando incrustações nas tubulações, dornas, etc., sendo necessário o combate físico, por meio de limpeza, aumentando o gasto com mão de obra. E também sofre com bactérias os gêneros *Lactobacillus* (GALLO, 1990) e *Bacillus* e bactérias acéticas, (SHEREVE, BRINK-JR., 1997).

Também existem as Leveduras selvagens, pois produzem espuma, e algumas causam floculação competindo, com as leveduras selecionadas, pelo açúcar, porém, são lentas no processo de produção tendo um rendimento fermentativo inferior (Figura 4). Algumas exceções apresentam um bom rendimento, podem ser selecionadas para uma safra futura.

O nível de contaminação tolerado é de até  $10^7$ /ml, a partir de  $10^8$ /ml, inicia-se o procedimento de cura da infecção, com o abaixamento de pH (até 2,0) através do uso de anti-sépticos como o ácido sulfúrico, se ainda não for o suficiente em seguida o uso de antibióticos a base de Monenzina e Virginia Mecina. Quando o caldo da cana não está com uma boa qualidade, e existe a possibilidade de haver contaminação, faz-se um método preventivo com uso de alguns biocidas não sendo necessário os resultados das análises microbiológicas.

O monitoramento da contaminação é realizado durante todo processo pelo laboratório de microbiologia, com análises para determinação da atividade microbiana pelo Método da Resazurina: do mosto (antes e depois da limpeza nos trocadores de calor de placas), do caldo filtrado primário, do caldo filtrado misto, do caldo da primeira pressão, do caldo misto e caldo residual. Em que a amostra do caldo ou mosto é pipetada e adicionada ao tubo com solução de resazurina (preparado anteriormente por esterilização a  $121^{\circ}\text{C}$ ), é incubado numa estufa bacteriológica (Tecnal TE – 392/1) à  $37^{\circ}\text{C}$  com uma variação de  $0,5^{\circ}\text{C}$ . É observada a alteração de coloração do tubo a cada 30 minutos e anotado o resultado (Tabela 1), e interpretado os resultados obtidos, indicando o tempo que a amostra levou para mudar para incolor (Tabela 2).

**Tabela 1 – Parâmetros para verificação de contaminação no Caldo de cana.**

Data: Hora: Amostra	Tempo de Redução (h)										
	0	½	1,0	1 1/2	2,0	2 1/2	3	3 1/2	4	4 1/2	5
Mosto (Antes da limpeza)	V	V	V	R	R	R	I	I	I	I	I
Mosto (Depois da limpeza)	V	V	V	V	R	R	R	I	I	I	I
Caldo 1ª Pressão	V	R	R	R	I	I	I	I	I	I	I
Caldo Misto	V	R	R	R	I	I	I	I	I	I	I
Caldo Residual	V	V	V	R	R	R	R	I	I	I	I
Caldo Filltrado primário	V	V	V	V	R	R	R	I	I	I	I
Caldo Filltrado Misto	V	V	V	V	R	R	R	I	I	I	I

Legenda: Anotar as alterações do indicado como: V – Violeta - R – Róseo - I – Incolor

**Tabela 2 – Determinação da atividade Microbiana, determinado pelo método da Resazurina para indicação do nível de contaminação.**

Tempo (h) para mudança da coloração	INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS			
	Importância da Contaminação			Tratamento
Violeta	Róseo	Incolor	-	-
-	0,5	≤ 3,0	Muito Grande	Urgente
0,5	2,0	≤ 4,0	Muito Grande	Urgente
1,0	4,0	≤ 6,0	Grande	Urgente
3,0	5,0	≤ 7,0	Fraca	Normal
> 3,0	> 5,0		Desprezível	Preventivo

É realizado análise para determinação da contaminação nas dornas e cuba, com uma diluição se necessário, em um tubo de ensaio adicionado 1,0 ml da amostra e 1,0 ml do corante (solução de Azul de Metileno + Sulfato de Azul de Nilo), e homogeneizado a amostra é transferido 0,004 ml dessa mistura para uma lâmina de vidro 20 x 20 mm e colocado em cima da lâmina uma lamínula, tomando cuidado para não formar bolhas de ar. É adicionada uma gota de óleo de imersão (nujol) sobre a lamínula, e feito a contagem com um microscópio (Nikon Eclipse E 200) em objetiva de 100 x somente de bastonetes não corados (vivos), contando 50 campos uniformemente distribuídos em toda área da lamínula.

Cálculo do número de bactérias(bastonetes)

$$\text{N}^{\circ} \text{ de Bast./ml} = \text{FM} \times \text{V} \times \text{M} \times \text{D},$$

onde:

**FM** = 12,732 - Fator de Microscópio

**V** = volume de amostra (0,004 ml)

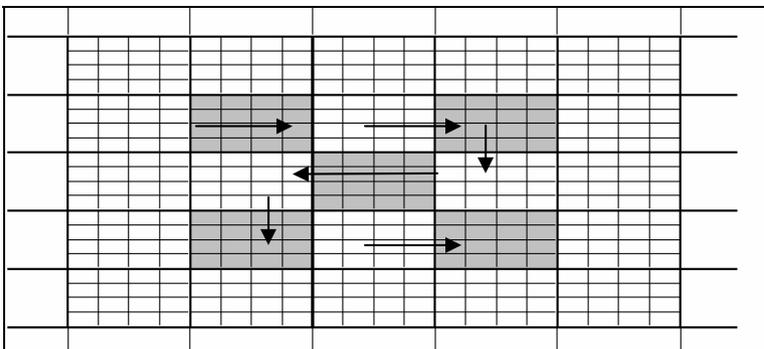
**M** = média de número de microorganismos por campo

(nº Bastonetes encontrados dividido por nº campos contados)

**D** = diluição da amostra ( 8 = cuba, 4 para o mosto)

Observação: no caso da amostra com baixa população bacteriana deve aumentar o número de campos a serem contados. Quando em 100 campos uniformemente distribuídos, nenhum bastonete for encontrado, deve-se expressar a contagem como sendo menor que  $10^4/\text{ml}$  ( $<10^4/\text{ml}$ ) que é o limite de precisão da metodologia.

Com a mesma amostra coletada das dornas e cuba, é realizada a análise de viabilidade e brotamento a fresco por microscopia, realizando a diluição necessária (de 100 x para as dornas e a de 200 x para a cuba), homogeneizar 1,0 ml da amostra diluída com 1,0 ml de Azul de Metileno, e pipetar para a câmara de Newbauer ( Figura 1) de modo que a câmara fique toda preenchida pela amostra, e realizar a contagem no microscópio em objetiva de 40 x, contando 5 dos 25 campos existentes.



**Figura 1** - Câmara de Newbauer (em escuro são as câmaras a serem contadas)

## Cálculo de Viabilidade e Brotamento das Leveduras

$$\frac{\text{Total de bastonetes} \times 4.000}{\text{Total de retículos contados}} \times \text{Diluição da amostra} \times 1.000$$

$$T_c = C_v + C_m$$

$$V_b = \frac{C_v}{T_c} \times 100$$

$$B = \frac{B_v}{T_c} \times 100$$

$$R_i = \frac{B_a}{C_v} \times 100$$

Onde:

$T_c$  = Total de células

$C_v$  = número de células vivas

$C_m$  = número de células mortas

$V_b$  = número de viabilidade

$B_v$  = número de brotos vivos

$B$  = número de brotamento

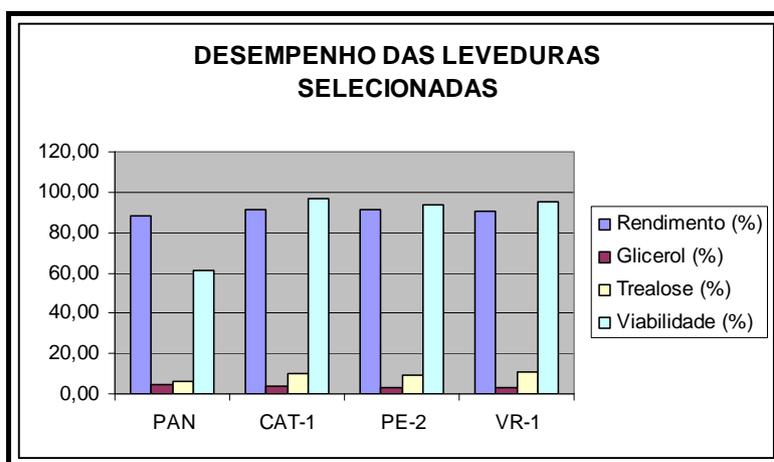
$R_i$  = número razão de infecção

$B_a$  = número de bastonetes

$\%V$  = Porcentagem de células viáveis

$$\% V = \frac{C_v}{\text{Nº de quadrados contados}} \times \text{Diluição} \times 250.000$$

Fez-se também a análise Açúcares Redutores Residuais (ARR), do vinho, pé-de-cuba e do vinho centrifugado (Figura 5), por meio de titulação com Licor de Fehling, para ver se no final da fermentação ainda contem açúcar acima do tolerado (até 0,18 %), que não foi metabolizado pelas leveduras, se estiver acima indicará que o mosto está indo para a fermentação com °Brix alto, sendo necessário a diluição do mosto, a quantidade ideal para trabalho é de 20 a 22 °Brix. E a temperatura ideal para a fermentação alcoólica é entre 32 e 34°C, ficando na faixa dos 33°C (Figura 6).



**Figura 2** – Comparativo de desempenho entre a levedura CAT-1 e de panificação Fleischman (Utilizadas pela Usina São Luiz) com outras leveduras selecionadas mais usadas em usinas.

Fonte: Fermentec

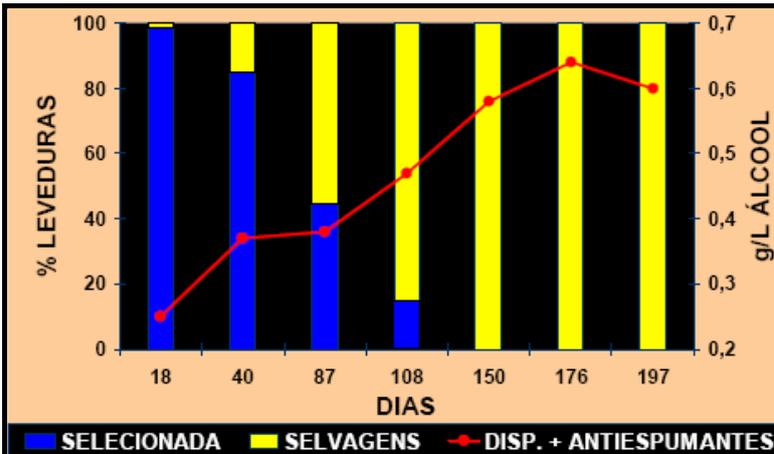


Figura 3 – Consumo de Antiespumantes e Dispersantes.  
Fonte: Fermentec

Conforme Figura 3, observa-se que o aumento da porcentagem de leveduras selvagens, ocasionará maior gasto com o uso de antiespumantes e ácido sulfúrico (dispersantes) e, do meio da safra em diante, o processo é praticamente dominado pelas leveduras selvagens.

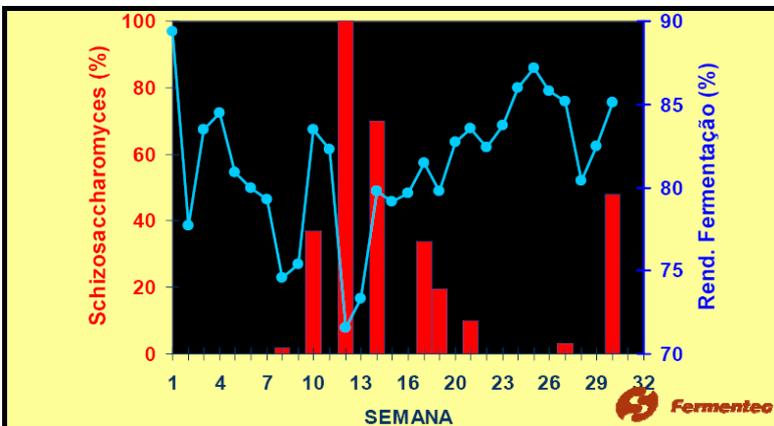
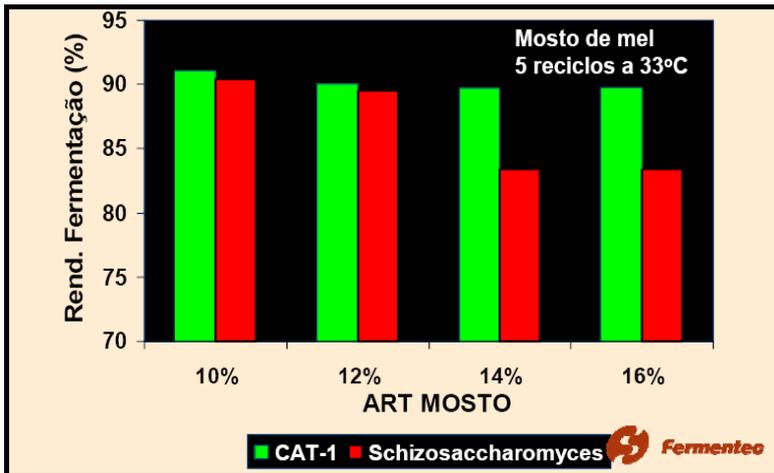


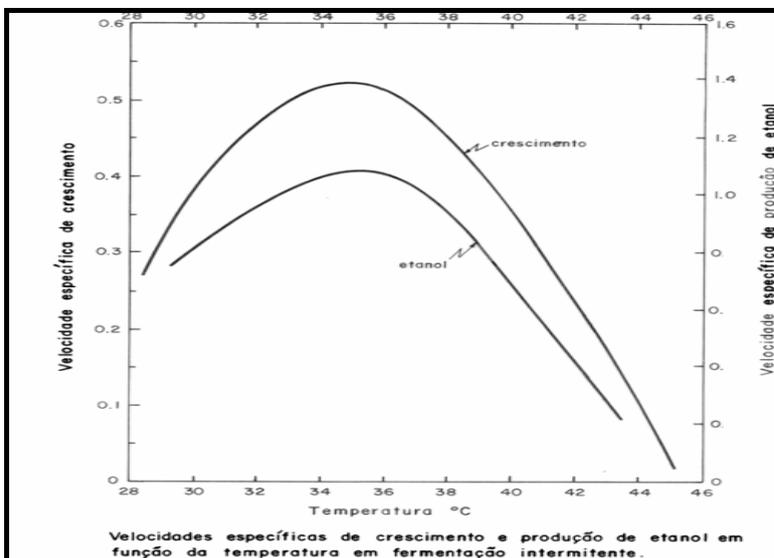
Figura 4 – Rendimento Da Fermentação - Fonte: Fermentec

Segundo a Figura 4, verificou-se que quando maior o percentual da Levedura Selvagem, menor é o rendimento da fermentação



**Figura 5** – Rendimento Da Fermentação X % Art No Mosto -  
Fonte: Fermentec

A Figura 5 mostra, que a partir da concentração de 14 % de açúcar no mosto, é mais visível a diferença no rendimento fermentativo, a levedura CAT-1 aproveita mais o açúcar do meio, enquanto que levedura selvagem (*Schizosaccharomyces*) não.



**Figura 6** – Velocidade de Fermentação - Fonte: Cysewski;Wilke, 1997

Verifica-se, conforme Figura 6, que para uma boa velocidade de fermentação, a temperatura ideal é entre 34°C e 36°C

## CONCLUSÃO

Os resultados permitiram observar que a presença de contaminantes devido a má qualidade da cana, tempo de queima prolongado, pragas, tipo de colheita,

armazenamento, clima, falta de higienização etc. no processo fermentativo causam diversos prejuízos, como: a queda de viabilidade das leveduras devido a liberação de metabólitos por parte de bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus* em especial *Lactobacillus fermentum* e *Bacillus subtilis*, deixando o meio mais ácido, inibindo o crescimento e a produção de álcool pela levedura. Também ocorrem leveduras selvagens como a *Schizosaccharomyces* e outras espécies, que competem com as leveduras selecionadas aumentando também o tempo de fermentação provocando problemas operacionais diminuindo assim o rendimento da fermentação e aumentando desta forma, o gasto com produtos como ácido sulfúrico (dispersante), antiespumantes, biocidas e antibióticos.

## REFERÊNCIAS

- ALQUATI, P. H. Caracterização e controle de microorganismos contaminantes em microdestilaria de álcool. APOSTILA - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 1990.
- CABRINI, K. T.; GALLO, C. R. Identificação de leveduras no processo de fermentação alcoólica em usina do Estado de São Paulo, Brasil. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 56, n.1, 1999.
- GALLO, C. R. Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica. 1990. 338 f. **Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos)** – Faculdade de Engenharia de alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 1990. IN: Costa, V. M. et all. Produções de ácido acético, etanol e dos isômeros óticos do ácido láctico por linhagens de *Lactobacillus* isoladas de fermentações alcoólicas industriais. **Ciência. agrotec.**, Lavras, v. 32, n. 2, p. 503-509, 2008.
- GOMES, L. H.; DUARTE, K. M. R.; ANDRINO, F. G.; GIACOMELLI, A. M. B.; TAVARES, F. C. A. Um vetor com o gene da GFP (Green fluorescent protein) para a marcação de leveduras em processos fermentativos. **Scientia Agrícola**, v.57, n.4, p.713-716, 2000.
- LUDWIG, K.M.; NETO, P OLIVA; 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.
- 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.
- STUPIELLO, J. P. Curso de Qualidade da Matéria-prima. 2006 CD-Room. YOKOIA, F.; Problemas com contaminantes na fermentação alcoólica. STAB, Piracicaba, p.38-39, Jul./Ago.,1991. IN: MUTTON, M. J. R. **Reflexos da qualidade da matéria-prima sobre a fermentação etanólica**, UNESP – campus Jaboticabal, Lorena, 30/05/2008.
- SHEREVE, R. N.; BRINK-JR, J. A. **Indústrias de Processos Químicos**, 4ª Edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.483 1997.
- VALSECHI, O. A. **Perdas no processo: do campo à indústria** – Curso Teórico e Prático da fermentação etanólica. APOSTILA - UNESP/UFSCar – 2006.