

A INTERFERÊNCIA DA CONTAMINAÇÃO BACTERIANA NO RENDIMENTO DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

THE INTERFERENCE OF BACTERIAL CONTAMINATION IN ALCOHOLIC FERMENTATION EFFICIENCY

¹LUCIO, C. A.; ²FRANCISCO, O.

^{1e2}Departamento de Ciências Biológicas –Faculdades Integradas de Ourinhos - FIO/FEMM

RESUMO

O processo fermentativo para a obtenção de etanol em escala industrial é muito afetado por contaminações provocadas por bactérias do gênero *Bacillus sp*, provenientes dos mais diversos focos, desde o solo onde se encontra e é retirada a matéria-prima até os modernos equipamentos que compõem a planta industrial de uma destilaria. A contaminação bacteriana deve ser controlada, pois afeta diretamente o rendimento fermentativo ocasionando perdas substanciais ao processo e acarretando prejuízos enormes a indústria. Os resultados foram obtidos por meio de análises microbiológicas realizadas no ano de 2009 pelo laboratório microbiológico, seguindo a metodologia na qual as amostras foram coletadas com total assepsia, utilizando-se de septo instalado em locais de amostragem, agulhas autoclavadas para evitar ao máximo qualquer contaminação das amostras. O objetivo deste trabalho foi observar e indicar pontos críticos de contaminação e principais indicadores que afetam o rendimento fermentativo. Com a pesquisa de pontos de contaminação e métodos operacionais convenientes, é possível estabelecer parâmetros para controle de contaminações bacterianas a níveis toleráveis visando um máximo rendimento no processo com diminuição dos custos e melhor aproveitamento da matéria prima.

Palavras- Chave: bactérias, contaminação, fermentação, leveduras, rendimento

ABSTRACT

The fermentation process to obtain alcohol on an industrial scale is strongly affected by contamination caused by bacteria called *Bacillus sp*, from many different focuses, from the ground where it is and comes from the raw material to modern equipment that make up the industrial plant of a distillery. Bacterial contamination must be controlled because it directly affects the yield fermentation causing substantial losses to the process and causing huge losses to industry, the results was obtained from microbiology analysis, realized in the 2009, in the microbiology laboratory, with the method in that the samples were realized in cleaned, with pins to avoid the contamination. The objective was to observe and indicate the critical points of contamination and key indicators that affect the fermentation yield. With the research points of contamination and methods of operation convenient, you can establish parameters to control bacterial contamination to tolerable levels aiming at a maximum yield in the process with lower costs and better utilization of raw material.

Keywords: bacteria, contamination, fermentation, yeast, yield

INTRODUÇÃO

O cultivo da cana-de-açúcar no Brasil é uma das mais antigas atividades agro econômicas, tendo como finalidade principal a produção de açúcar e etanol e é considerada a cultura com maior índice de crescimento mundial. (MAGALHÃES, 2005).

Devido a grandeza do setor sucroalcooleiro no Brasil, não se pode tratar da cana de açúcar, apenas como mais um produto, mas sim como o principal tipo de biomassa energética do país. O etanol tem o importante papel na solução do problema da octanagem da gasolina, substituindo o chumbo altamente tóxico e prejudicial a saúde humana, na mistura de gasolina – etanol, hoje aceita e usada por todo mundo. (www.iee.usp.br – acessado em 10/04/2010; as 18h: 45min).

O processo de fermentação alcoólica consiste na transformação química de açúcares (glicose e frutose) em etanol e CO₂ por leveduras do gênero *Saccharomyces cerevisiae*. O objetivo do processo industrial é a obtenção de etanol, já o objetivo da levedura é a multiplicar-se, para isso necessita de energia que é retirada dos açúcares existentes no mosto. A produção industrial de etanol busca como qualquer outra atividade obter o máximo de rendimento com o mínimo de perdas, para tanto é necessário que haja um controle da contaminação bacteriana, uma vez que o aumento da contaminação eleva os gastos com ácido sulfúrico e antibióticos, além de influenciar negativamente o rendimento do processo fermentativo levando a perdas na produtividade. (LOPES, 2003).

Dentre os gêneros de bactérias encontradas no meio fermentativo predominam bactérias Gram-positivo, do gênero *Bacillus* e *Lactobacillus*, (GALLO,2004).

Também é comum encontrar bactérias do gênero *Leuconostoc* que também causam danos ao processo fermentativo. (AMORIM, 1982).

Os principais danos causados por esses microorganismos contaminantes na fermentação alcoólica são: formação de goma, flocculação, aumento da acidez do meio, inibição e queda da viabilidade da levedura devido a excreção de compostos tóxicos (ácido orgânicos), acarretando a redução no rendimento fermentativo. (ALTERTHUM. 1984, AMORIM, 1982; YOKOYA, 1991).

Um rendimento considerado ideal para o processo fermentativo seria em torno de 91 a 92% ou maior, para tanto a contaminação bacteriana deve ser

controlada em nível de 10^5 a 10^6 Bastonetes/ml, o que é considerado ótimo. (AMORIM, 2000).

De acordo com (GODOY, 2002) contaminação bacteriana na fermentação ainda é o principal problema, resultando em perdas significativas do rendimento da fermentação, porém com o passar do tempo, houve mudanças no controle da contaminação bacteriana, devido a um rigoroso controle das etapas do processo industrial, que tem início desde a colheita, passando pelo armazenamento da matéria prima, extração do caldo, eficiência do tratamento térmico do caldo, assepsia das dornas, controle de temperatura da fermentação, tratamento do levedo, qualidade microbiológica da água de diluição do levedo e do mosto a ser fermentado e pontos mortos em tanques, tubulações, curvas e trocadores de calor.

Dentre as principais causas de redução no rendimento fermentativo destaca-se a produção de ácidos pelas bactérias lácticas que levam a uma inibição ou mesmo a morte das leveduras em função da quantidade de ácidos excretados, conseqüentemente haverá um aumento da acidez o que acarreta uma sobra de açúcares no final da fermentação, ocorrendo significativas perdas na eficiência fermentativa (CHERUBIM, 2002).

Conforme (LUDWIG et al, 2001) a floculação bacteriana é um fenômeno reversível de agrupamentos celular que comumente se desenvolve no final da fase exponencial de crescimento ou na fase estacionária, pode ser causado por agentes químicos ou microbiológicos, causa uma redução da superfície de contato entre as leveduras e o mosto, levando a um aumento no tempo de fermentação ou até fermentações incompletas, com grandes perdas de açúcares ao final do ciclo fermentativo e até a morte de células saudáveis.

O presente trabalho teve como objetivo, observar e comentar a interferência da contaminação bacteriana no rendimento da fermentação alcoólica, destacando os pontos mais críticos de contaminação e evidenciando os principais indicadores como floculação e acidez, que afetam diretamente o rendimento fermentativo.

MATERIAL E MÉTODOS

Os dados aqui apresentados foram coletados numa usina sucroalcooleira no município de Ipaussu - SP, os resultados foram obtidos através de estudo de análises de amostras microbiológicas realizadas no ano de 2009 pelo laboratório microbiológico, seguindo a seguinte metodologia:

As amostras foram coletadas com total assepsia utilizando-se de septo instalado em locais de amostragem, agulhas autoclavadas para evitar ao máximo qualquer contaminação das amostras.

As vidrarias utilizadas foram: câmara de Newbauer espelhada, lâmina para microscopia (26 x 76 mm), lamínula para microscopia (22 x 22 mm), tubos de ensaio, provetas de 50 ml, becker de 250 ml, pipetas de 0,1 ml e 1 ml, pipeta de 20 ml, proveta de 50 ml e balhão de fundo chato. Os reagentes utilizados para análise de infecção bacteriana foram os corantes azul de metileno 0,2% e sulfato azul de nilo a 2,0 % e óleo de imersão; Para determinação da viabilidade celular de leveduras foi utilizado o corante eritrozina, tampão fosfato, papaína, óleo de imersão e hidróxido de sódio. Os equipamentos utilizados foram o microscópio óptico, contador de células, agitador de tubos, delta acidez, pHmetro, agitador magnético e bureta digital.

O software utilizado e também metodologia empregada foram de desenvolvimento interno da respectiva empresa.

Os procedimentos analíticos foram:

a) Procedimento analítico para determinação da viabilidade celular – homogenizar a amostra coletada, transferir uma alíquota da amostra para o tubo de ensaio, adicionar papaína homogenizar em agitador de tubo e aguardar cinco minutos, homogenizar novamente e diluir a amostra com água destilada o tanto necessário para ser encontradas entre 300 a 500 células por câmara, transferir 1 ml da amostra diluída para tubo de ensaio com 1 ml de corante eritrosina e agitar, transferir uma alíquota desta mistura para câmara de Newbauer juntamente com a lamínula adicionando uma gota de óleo de imersão e proceder a contagem em objetiva de 100 vezes contando 25 quadrículos num total de 100 retículos, observando que células não coradas (vivas), células coradas (mortas), brotos não corados (vivos) e brotos corados (mortos).

Cálculos:

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

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

$$\% \text{ viabilidade de brotamento} = \frac{\text{n.º brotos vivos}}{\text{n.º brotos vivos} + \text{n.º brotos mortos}} \times 100$$

$$\text{Nº células vivas / ml} = \frac{\text{Total células vivas}}{\text{Total retículo contado}} \times 4.000 \times 1.000 \times \text{Diluição.}$$

b) Procedimento analítico para determinação de infecção bacteriana – transferir uma alíquota para tubo de ensaio adicionar papaína e agitar, aguardar cinco minutos agitar novamente e transferir 1 ml da amostra para tubo de ensaio e adicionar 1 ml de corante sulfato azul de nilo mais azul de metileno. Com auxílio de uma pipeta de 0,1 ml transferir para uma lâmina (26 x 76 mm) 0,003 ml da amostra, colocar sobre a amostra uma lamínula de vidro (22 x 22 mm) tendo cuidado para não formar bolhas, adicionar uma gota de óleo de imersão e proceder para contagem de bastonetes. Bastonetes não corados (vivos), bastonetes corados (mortos) presentes em um total de 50 campos distribuídos por toda área da lamínula, utilizando objetiva de 100 vezes.

Cálculo:

$$\text{População bastonetes / ml} = \frac{\text{FM} \times \frac{1}{\text{Volume da amostra}} \times \text{M} \times \text{D}}$$

Onde:

FM = fator do microscópio;

M = média total de bastonetes vivos / número de campos contados;

D = diluição utilizada;

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

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

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

c) Procedimento analítico para teste de floculação – homogenizar a amostra, transferir para uma proveta de 100 ml, cronometrar 15 minutos e fazer a leitura quantificando de cima para baixo o espaço existente entre o volume total e o início de separação do levedo. O resultado é expresso em porcentagem.

d) Procedimento analítico para determinação de acidez fixa – Centrifugar a amostra e pipetar 20 ml do sobrenadante, adicionar 50 ml de água destilada e colocar em um

balhão de fundo chato, levar para o aparelho Delta Acidez e cronometrar 5 min após levantar fervura, ao retirar aguardar que a amostra chegue em temperatura ambiente. Transferir para um becker e com auxílio de um agitador magnético e bureta digital fazer a titulação utilizando Hidróxido de Sódio 0,1N até pH 8,5.

Cálculo:

$$\text{g H}_2\text{SO}_4 / \text{Litro} = Vg \times 0,245 \times F$$

Onde:

F = Fator do Hidróxido de Sódio 0,1N;

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através dos dados obtidos pode-se observar que o aumento na contaminação bacteriana afeta diretamente a eficiência fermentativa bem como o rendimento da destilaria. (Tabela 1).

Verificou-se também que com o aumento da infecção bacteriana houve surgimento de floculação no meio fermentativo e conseqüentemente ocorreu a elevação da acidez do meio o que leva a inibição do crescimento, morte das células e conseqüentemente diminuição da viabilidade celular, esses fatores somados levaram a uma queda na produção de álcool pelas leveduras e por seguinte a queda na eficiência do processo conforme Basso (2005).

Tabela 1. Comparação entre as médias mensais do rendimento geral da destilaria, eficiência da fermentação e infecção bacteriana obtidas em uma usina do Município de Ipaussu-SP.

Meses	Rendimento Geral Destilaria %	Eficiência da Fermentação %	Infecções Bacterianas $\times 10^7$
Março	90,21	90,68	$0,13 \times 10^7$
Abril	88,11	88,62	$1,06 \times 10^7$
Maio	87,94	88,46	$1,12 \times 10^7$
Junho	86,69	87,22	$1,50 \times 10^7$
Julho	88,04	88,62	$1,62 \times 10^7$
Agosto	89,09	89,67	$1,88 \times 10^7$
Setembro	87,80	88,45	$1,66 \times 10^7$
Outubro	85,83	85,94	$2,02 \times 10^7$
Novembro	86,14	86,72	$1,71 \times 10^7$
Dezembro	86,84	87,44	$1,97 \times 10^7$
	Média =87,669 (SD = 1,34)	Média =88,182 (SD = 1,39)	$1,46 \times 10^7$ (SD = $0,569 \times 10^7$)
			1,467

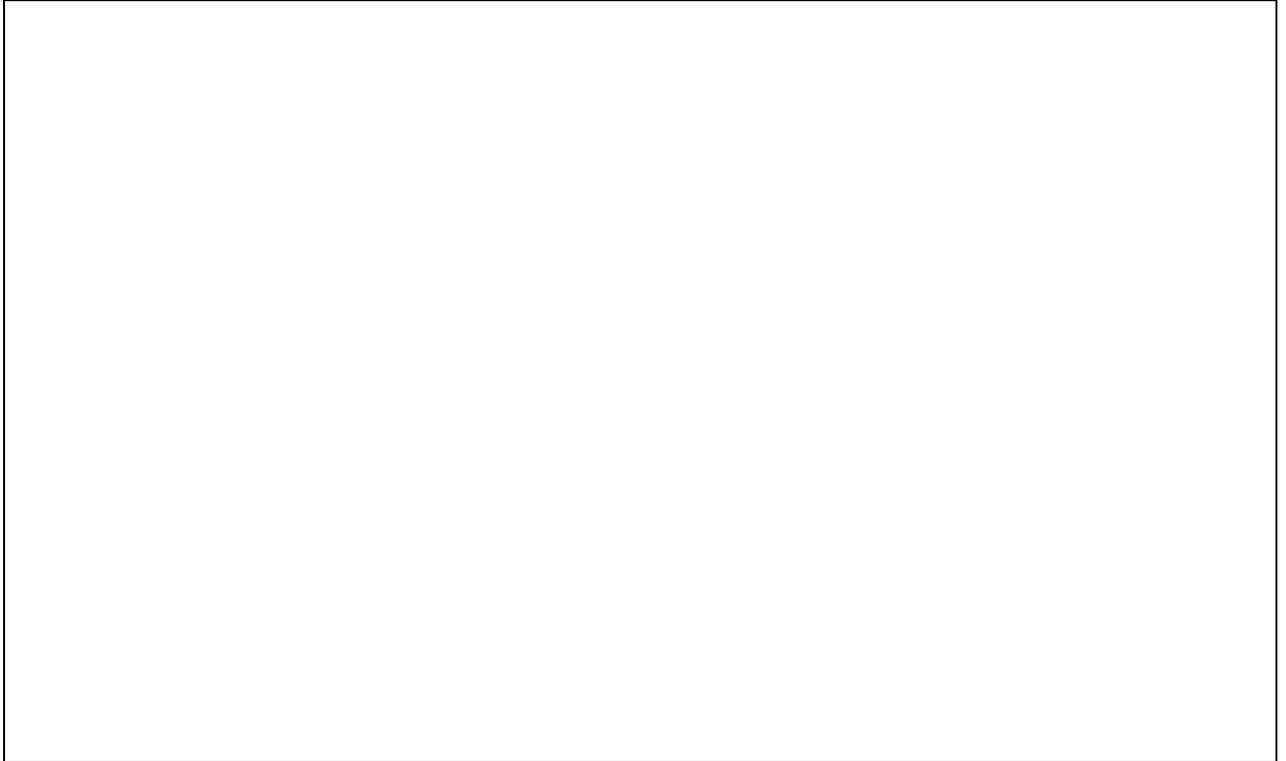


Figura 1. Características Morfológicas e Bioquímicas de Leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e bactérias *Bacillus sp.* **A)** Imagem Bactérias sp, ao microscópio eletrônico de varredura. (Fermentec - Piracicaba, 2002). **B)** Leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, ao microscópio óptico (Fermentec – Piracicaba, 2002) **C)** Bastonetes encontrados no processo fermentativo de uma usina no município de Ipaussu - SP. **D)** Formação da floculação causada por infecção de bactérias, ao microscópio de varredura. (Fermentec – 2005).

Conforme figura 2, verifica-se que com o aumento da infecção bacteriana houve também o aumento significativo da acidez da dorna.

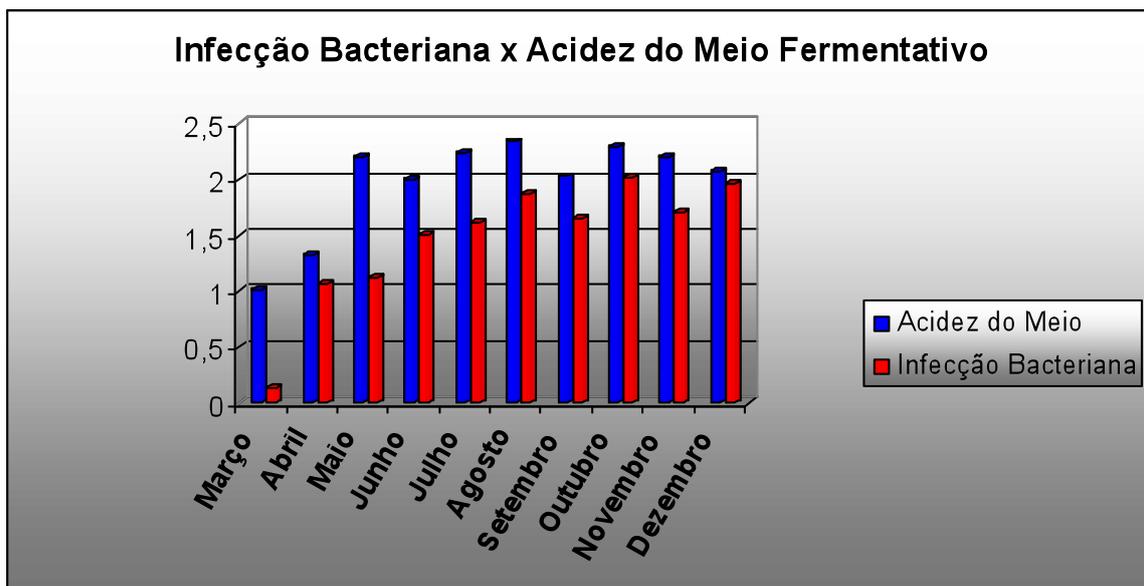


Figura 2. Comparação das médias mensais entre a infecção bacteriana e a acidez do meio fermentativo.

Conforme figura 3, verifica-se que houve um aumento significativo na floculação no meio fermentativo, comparando-se com a eficiência da fermentação apesar do controle da infecção bacteriana através de ácido sulfúrico e antibióticos usados para controlar a proliferação do meio.

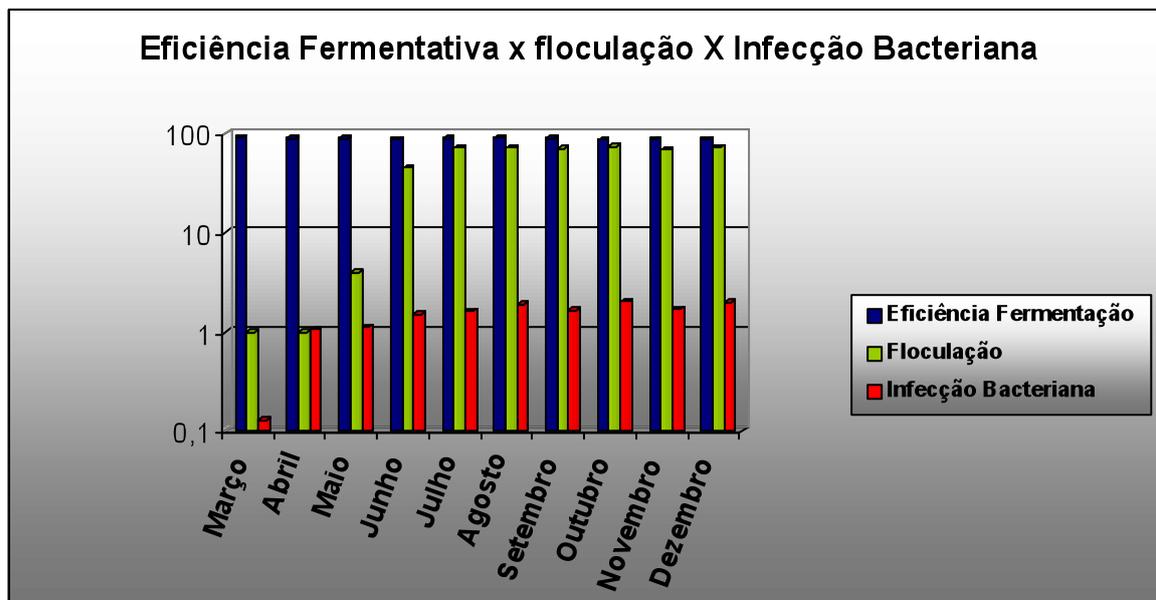


Figura 3 - Comparação das médias mensais entre a eficiência fermentativa, floculação e infecção bacteriana.

CONCLUSÃO

Concluiu-se, portanto que a infecção bacteriana afeta diretamente o rendimento do processo fermentativo, além de elevar os gastos com insumos como ácido sulfúrico e antibióticos sendo necessário, portanto um controle rigoroso de todas as etapas do processo, a fim de minimizar a introdução de microorganismos na fermentação e assim manter sob controle os níveis de contaminação, observando parâmetros como floculação, acidez do meio, tempo de fermentação, fatores que podem indicar aumento da infecção. Verificou-se então que o controle da contaminação eleva o rendimento fermentativo, diminui perdas e gastos levando a uma maior produção de etanol.

REFERÊNCIAS

- ALTERTHUM, F. Efeito dos microorganismos contaminantes da fermentação alcoólica nas microdestilarias. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Campinas, v.3, n.1, p. 42-49, 1984.
- AMORIM, H.V. OLIVEIRA, A.J. Infecção na fermentação: como evitá-la. **Álcool e Açúcar**, Piracicaba, v.2, n.5, p. 12-18, 1982.
- BASSO, L.C. Fisiologia e Ecologia da fermentação alcoólica. **Sci.Agric.** Depto de Agroindústria, Alimentos e Nutrição ESALQ / USP. Piracicaba v. 56, n.1, 2005
- CHERUBIM, R; BASSO, L.C. Alta Viabilidade e Baixa Contaminação Bacteriana. **Sci.Agric.** Depto de Agroindústria, Alimentos e Nutrição ESALQ / USP. Piracicaba v.7, n.1, 2002.
- GALLO, C.R; CANHOS, V.P. Contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica-revisão, **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Campinas, v. 9, n.1, p. 35-40, 1991.
- GODOY, A. Contaminação bacteriana:efeitos na fermentação, **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Campinas, v. 5, n.1, p. 35-40, 2002.
- LOPES, M.L. **Curso de Fermentação Alcoólica**. Piracicaba, Cd Room, 2002.
- 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.
- MAGALHÃES, P.G. 30 anos de Pro álcool no centro de debate. **Jornal da Unicamp**, Campinas, v. 309, p.11, 2005.
- [USP]UNIVERSIDADE SÃO PAULO. Cana-de-açúcar. Disponível em <http://infoener.iee.usp.br>- Acesso em 10 abril. 2010, 18H:45min.
- YOKOYA, F. Problemas com contaminantes na fermentação alcoólica. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Campinas, v. 9, n. 6, p. 38-39, 1991.