

CONTAMINAÇÃO MICROBIANA NAS ETAPAS DE PROCESSAMENTO E SUA INFLUÊNCIA NO RENDIMENTO FERMENTATIVO EM USINA ALCOOLEIRA

Raquel Ferreira Naves¹, Fernanda de Sousa Fernandes¹, Osvaldo Gomes Pinto², Plínio Lázaro Faleiro Naves³.

1. Graduandas em Química Industrial na Universidade Estadual de Goiás, Brasil. raquelfnaves@hotmail.com
 2. Graduando em Ciências Biológicas na Faculdade ANHANGUERA, Brasil.
 3. Professor, Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual de Goiás, Brasil.
-

RESUMO

Vários são os fatores que interferem nos processos fermentativos de uma usina alcooleira, dentre eles destaca-se a contaminação microbiana. O controle das bactérias e leveduras contaminantes do processo é importante não somente para obter um bom rendimento alcoólico no processo fermentativo, mas, também, para garantir um produto de qualidade. As etapas prévias e iniciais do preparo do mosto permitem o desenvolvimento de micro-organismos contaminantes, devido as condições tais como: temperatura, higiene, concentração de açúcar, pH, qualidade da cana e preparação do fermento a ser utilizado. Os principais contaminantes são bactérias gram-positivas dos gêneros *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Leuconostoc*. Como consequência, a contaminação bacteriana amplia o risco de inibição da levedura *Saccharomyces cerevisiae* por competição pelo substrato e liberação de metabólitos o que pode ocasionar perda na eficiência e rendimento da destilaria. Essa contaminação pode causar prejuízos como perda de açúcar fermentescível, floculação do fermento, queda da viabilidade das leveduras, redução no rendimento e na produtividade da fermentação.

PALAVRAS-CHAVE: álcool, contaminação microbiana, processamento, leveduras, fermentação.

MICROBIAL CONTAMINATION IN PROCESSING STEPS AND THEIR INFLUENCE ON YIELD IN THE ALCOHOL FERMENTATION

ABSTRACT

There are several factors that interfere with the alcohol fermentation process. Among them we highlight the microbial contamination. The control of bacteria and yeast contamination of the process is important not only to obtain a good yield in alcoholic fermentation, but also to ensure a quality product. The early stages and initial preparation of the sugar cane must allow the development of contaminant micro-organisms, due to conditions such as temperature, hygiene, sugar concentration, pH, cane quality and preparation of the yeast. The main contaminants are gram-positive bacteria of the genera *Lactobacillus*, *Bacillus* and *Leuconostoc*. As a consequence, bacterial contamination increases the risk of inhibition of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by substrate competition and release of metabolites which can cause loss of efficiency and performance of the distillery. This contamination can cause damage

such as loss of fermentable sugar, yeast flocculation, diminution in the yeast viability, reduction in productivity of fermentation.

KEYWORDS: *alcohol, microbial contamination, processing, yeast, fermentation.*

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar, planta semi-perene pertencente à família das gramíneas é a principal matéria-prima utilizada industrialmente para a produção de açúcar e álcool. O seu cultivo no Brasil foi introduzido pelos portugueses no século XVI. Neste período o produto obtido nos engenhos de açúcar, era de grande rentabilidade comercial. Entretanto, com desvalorização do açúcar no mercado externo e o advento da monocultura do café, houve um declínio dos engenhos, que com o passar dos tempos foram substituídos pelas usinas, principalmente para a produção de álcool (RODRIGUES et al., 2010).

Nos anos 70, a alta de preços do petróleo, estimulou a criação do Proálcool (Programa Nacional do Álcool) com o objetivo de se reduzir a dependência de energia por fontes não-renováveis, a diminuição da emissão de gases poluentes na atmosfera e também atender as necessidades do mercado interno e externo, além da política de combustíveis automotivos. Até então, não se esperava todo o impacto desse Programa, mas o país já contava com a matéria-prima, cana-de-açúcar, em abundância. Além disso, houve mais investimentos na forma de financiamento pelo Governo Federal para o aumento das áreas de plantio da matéria-prima e para a instalação de usinas (BERTELLI, 2010).

Atualmente o Brasil tem mais de 400 usinas em funcionamento e a produção para a safra de 2010/2011 é de 29,9 bilhões de litros de álcool de acordo com a União da Indústria de Cana-de-açúcar (Única). Para a safra de 2020/21, a projeção é de 65 bilhões de litros, dos quais 50 bilhões para consumo de veículos. O excedente de 15 bilhões de litros de álcool poderá ser utilizado para outros fins, entre eles para fabricação de bioquerosene (VAREJÃO, 2009).

O álcool pode ser produzido por três vias: destilatória (a partir de fermentações de resíduos semi-sólidos das vinícolas), por via sintética (a partir dos hidrocarbonetos instaurados, como eteno, etino, de gases de petróleo e da hulha) e a via fermentativa. Na via fermentativa a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a principal responsável pela fermentação do substrato e conseqüente produção de álcool. A fermentação da sacarose na produção de álcool e sua degradação pode ser feita por leveduras ou ainda por micro-organismos contaminantes (MOREIRA et al., 2009).

Fundamentalmente, para a produção de álcool é necessário o conhecimento das condições desse processo e de fatores como, por exemplo, a contaminação microbiana durante a fermentação, que pode ser extremamente relevante na produtividade final, pois a presença de certos índices de micro-organismos indesejáveis pode resultar em prejuízos ao processo devido ao consumo de açúcar, formação de goma, floculação do fermento, inibição e queda da viabilidade das leveduras devido às toxinas e ácidos orgânicos liberados no meio e a conseqüente redução no rendimento da fermentação (NOBRE et al., 2007).

Os micro-organismos contaminantes presentes no processo, são os mesmos encontrados no solo da lavoura de cana, já que este é um grande reservatório de micro-organismos. Assim, a contaminação presente no processo é adquirida mediante a introdução de terra aderida às raízes, caule, folhas, água, partículas

carregadas pelas correntes aéreas, além da própria microbiota presente na matéria prima (ANGELIS, 2010).

2. PROCESSOS FERMENTATIVOS

A fermentação alcoólica que ocorre nas dornas de fermentação para a produção de álcool ocorre em três etapas distintas:

A pré-fermentação se inicia quando o fermento (leveduras) é adicionado ao mosto devidamente preparado e se caracteriza por ativa multiplicação das células e elevação lenta e gradual da temperatura do meio. Após cinco a seis horas, com pouca espuma, inicia-se a fermentação principal, que é reconhecida pela elevação rápida da temperatura, queda da densidade do mosto por causa do desaparecimento dos açúcares e da formação equivalente do álcool. A acidez eleva-se abaixando o pH. Essa fase termina quando as espumas desaparecem, durando de nove a 10 horas (ANTONINI, 2004).

A pós-fermentação é caracterizada pela diminuição lenta e gradual da temperatura do mosto, diminuição do desprendimento do gás carbônico e não se formam mais espumas. Essa fase dura de 6 a 8 horas e deve durar o mínimo possível para evitar a infecção do vinho e do pé-de-cuba, que será utilizado em nova fermentação. O mosto totalmente fermentado é denominado vinho (ANTONINI, 2004).

Há várias maneiras de se conduzir a fermentação. O reator biológico pode ser operado de forma descontínua, semicontínua, descontínua alimentada (ou batelada alimentada) ou contínua, todos podendo trabalhar com ou sem recirculação do fermento. Atualmente no Brasil, a maior parte da produção industrial de álcool em grande escala, ocorre em processos fermentativos em batelada e contínuos, representados pelas figuras 1 e 2, sendo que a denominação batelada na prática industrial se refere à batelada alimentada (PACHECO, 2010).

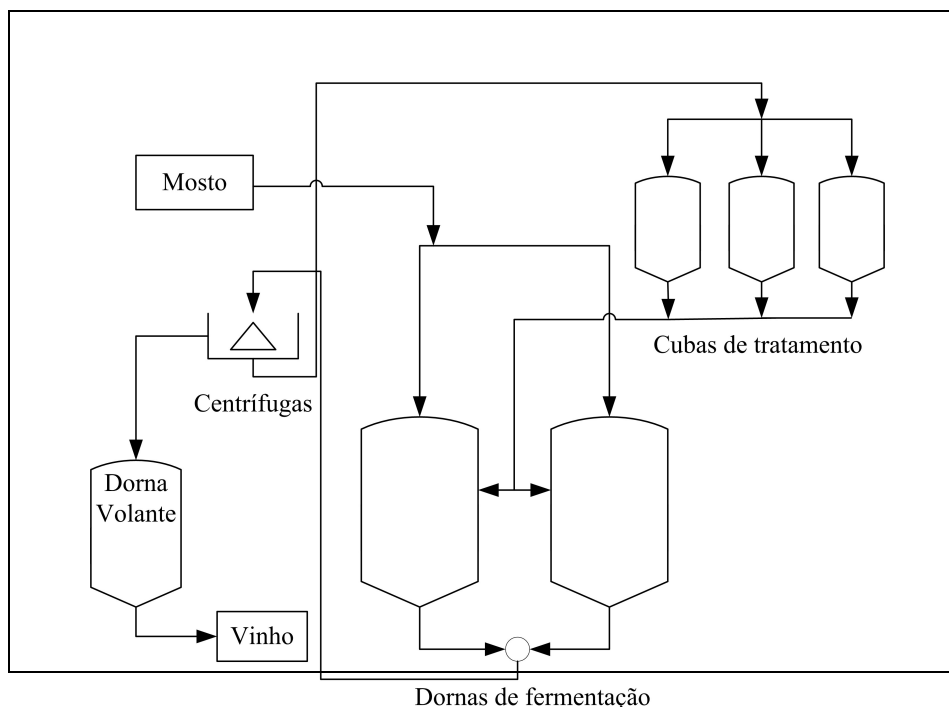
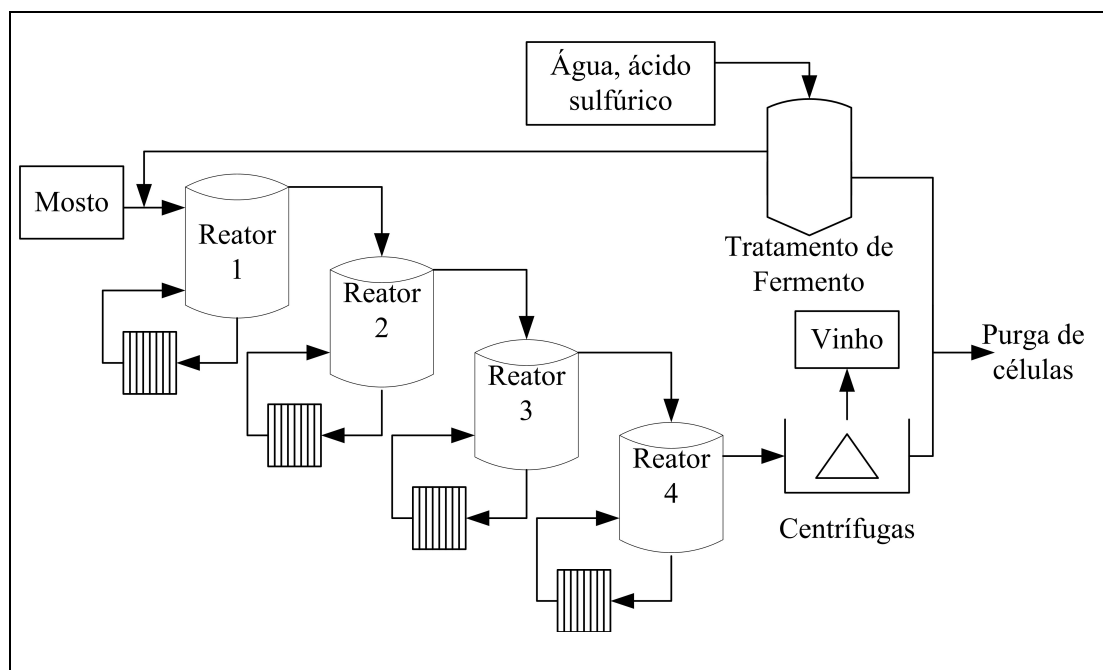


FIGURA 1 - Esquema simplificado do processo Melle-Boinot de fermentação.



FIG

URA 2 - Esquema do processo de fermentação contínua para produção de álcool.

No Quadro 1, estão identificados os tipos de processos fermentativos, seguidos pelas suas respectivas principais características e limitações.

QUADRO 1 – Tipos de processos fermentativos

Tipos de Fermentação	Principais características	Limitações
Descontínua	Processo lento, com um inóculo por tanque e com recirculação de células, ou seja, usando como inóculo o micro-organismo da batelada anterior. Este processo é o mais seguro, quando há problemas de manutenção e condições de assepsia, pois ao final de cada batelada a dorna será esterilizada, recebendo um novo inóculo.	A principal desvantagem da fermentação descontínua é o tempo gasto entre as bateladas. Outra desvantagem são os baixos rendimentos e/ou produtividades, quando o substrato adicionado de uma vez só no início da fermentação exerce efeitos de inibição, repressão ou desvia o metabolismo celular para formação de produtos que não interessam.
Semicontínua	Uma porção da cultura é coletada em intervalos de tempos e o meio fresco é	Há um alto risco de contaminação e mutação

	adicionado a dorna. Nesse processo há uma variação no volume da cultura. Não há necessidade de ter uma dorna separada para o inóculo, exceto no início. O tempo também não é desperdiçado para a limpeza e re-esterilização. Outra vantagem desta operação é que não é requerido muito controle de lavagem das dornas, utilização de biocidas.	devido aos longos períodos de cultivos e as operações manuais. Além disso, são necessários reatores de volumes maiores e os custos de investimento são levemente mais elevados.
Descontínua Alimentada	Um ou mais nutrientes são adicionados ao fermentador durante o cultivo e em que os produtos aí permanecem até o final da fermentação. O processo Melle-Boinot apresenta vantagens como: a economia de açúcar devido a menor reprodução celular (elevando o rendimento em etanol), a eliminação de contaminantes pela centrifugação do vinho (separação de células de levedura), fermentação mais pura devido ao tratamento de leite de levedura (tratamento ácido), eliminação da necessidade de cultura pura no preparo do pé-de-cuba, prática exigida no processo clássico, diminuindo, portanto a complexidade das operações de planta.	A fermentação descontínua alimentada não reduz os efeitos inibitórios do acúmulo de etanol na cultura.
Contínua	O processo de fermentação contínua caracteriza-se por possuir uma alimentação contínua de meio de cultura a uma determinada vazão constante, sendo o volume de reação mantido constante através da retirada contínua do caldo fermentado. Tal processo pode ser mais vantajoso que o de batelada ou batelada alimentada, pois inclui otimização das condições de processo para uma maior produtividade, período longo de produtividade contínua, maior produtividade volumétrica, maior uniformidade do produto, redução dos custos laboratoriais e sanitização das	A maior desvantagem é que as fermentações contínuas são mais suscetíveis à contaminação bacteriana por longo prazo de exposição.

	dornas e maior facilidade de controle automático	
--	--	--

3. FATORES QUE AFETAM A FERMENTAÇÃO

3.1 AGENTES DA FERMENTAÇÃO

Em escala industrial, incontestavelmente, as leveduras pertencentes ao gênero *Saccharomyces*, têm sido largamente utilizadas para a produção de álcool. Representantes desse gênero são os micro-organismos que mais apresentam características favoráveis para transformar açúcares em álcool (STECKELBERG, 2001). O desempenho do processo fermentativo é enormemente afetado pelo tipo de levedura que o executa (LIMA et al., 2001), dependendo de várias circunstâncias, entre as quais o substrato ou matéria prima utilizada, o teor alcoólico desejado no produto final, a duração da fermentação, as propriedades do produto, e outros.

Assim a escolha do agente fermentador correto fornece alta eficiência na produção de álcool, baixa produção de glicerol e alta tolerância a diversos fatores estressantes. Geralmente observa-se durante a fermentação, por técnicas de cariotipagem, que as linhagens que dão início ao processo são substituídas por leveduras comuns à região da destilaria, comumente denominadas de leveduras selvagens. É importante ressaltar que as leveduras selvagens podem dominar o processo ao longo da safra melhorando a eficiência na produção de álcool ou acarretando problemas na fermentação, como baixo rendimento, formação excessiva de espumas e floculação do fermento (LIMA et al., 2001).

3.2 pH

O pH é um fator significativo para as fermentações industriais devido à sua importância tanto no controle da contaminação bacteriana quanto ao seu efeito sobre o crescimento da levedura, taxa de fermentação e formação de subprodutos (SOUZA, 2009)

As fermentações se desenvolvem numa ampla faixa de valores de pH, sendo a adequada entre 4 e 5 (LIMA et al., 2001). Aumentando-se o pH até 7, observa-se, via de regra, uma diminuição do rendimento em álcool, com aumento da produção de ácido acético (SOUZA, 2009). Os valores de pH dos mostos industriais geralmente se encontram na faixa de 4,5 a 5,5. No processo de fermentação com reutilização da levedura faz-se seu tratamento com ácido sulfúrico com pH de 2,0 a 3,2, durante aproximadamente uma hora, visando a redução da carga microbiana (LIMA et al., 2001).

A fermentação alcoólica inicia com valores de pH baixos, finalizando com valores de 3,5 a 4,0. Fermentações conduzidas em meios mais ácidos resultam em maiores rendimentos de álcool, pelo fato de restringir o crescimento do fermento, ao mesmo tempo que reduz a contaminação bacteriana. Os caldos de cana fermentam sem correção da acidez, em pH natural que varia de 5,2 a 6,8. Pelo descrito, a tolerância à acidez é uma característica importante para as leveduras industriais (LIMA et al., 2001).

3.3 TEMPERATURA

A temperatura é uma das condições ambientais que mais afetam a atividade de micro-organismos, influenciando no crescimento, metabolismo, capacidade fermentativa e viabilidade celular em leveduras (BATISTA, 2001).

As leveduras, *S. cerevisiae*, são mesófilas. As temperaturas ótimas para a produção industrial de álcool situam-se na faixa de 26 a 35°C, mas, não raramente, a temperatura nas destilarias alcança 38°C, dependendo das condições climáticas da região. À medida que a temperatura aumenta, eleva-se a velocidade da fermentação, mas favorece a contaminação bacteriana, ao mesmo tempo em que a levedura fica mais sensível a toxidez do álcool, levando a formação de metabólitos secundários como o glicerol. Por outro lado, temperaturas elevadas permitem maior perda de álcool por evaporação em dornas abertas. Tais aspectos justificam o controle da temperatura no processo industrial (LIMA et al., 2001).

Existem três temperaturas chaves de um processo de crescimento de leveduras: T_{maxi} (temperatura máxima inicial de crescimento), T_{maxf} (temperatura máxima final de crescimento) e T_{opt} (temperatura ótima de crescimento). O aumento da concentração alcoólica ao longo da fermentação provoca uma diminuição das 3 temperaturas. Quando T_{maxf} se iguala a temperatura do processo, o crescimento celular torna-se nulo (STECKELBERG, 2001).

3.4 CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES

A espécie *Saccharomyces cerevisiae* é capaz de fermentar os açúcares que compõem a cana-de-açúcar, que são basicamente a glicose, a frutose, e a sacarose (STECKELBERG, 2001). Essas linhagens de levedura normalmente utilizadas nos processos industriais apresentam uma osmotolerância limitada (SOUZA, 2009).

O aumento da concentração de açúcares, consequentemente eleva a velocidade de fermentação, resultando em perdas da atividade de transporte de açúcar, produzindo menos álcool. O estresse induzido pelo aumento da osmolaridade externa leva a redução em crescimento e perda da viabilidade das células das leveduras, devido às perturbações no gradiente osmótico através da membrana plasmática. Isto leva, por sua vez, a perdas em volume das células que se contraem por causa de diferenças em pressão osmótica entre o exterior e o interior das células (SOUZA, 2009).

3.5 CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO

Elevadas concentrações de inóculo na dorna permitem fermentações mais rápidas, seguidas pelo aumento da temperatura, assim com maior produtividade e maior controle sobre as bactérias contaminantes, além de restringir o crescimento da própria levedura. Por outro lado, o elevado teor de levedura exige energia de manutenção maior, isto é, maior consumo de açúcar para manter as células vivas. Como consequência, resulta em maior competição pelos nutrientes do meio, minerais e vitaminas, diminuindo a viabilidade do fermento. Portanto, é importante existir um teor ótimo de levedura na dorna, dependendo das condições especiais do processo industrial (LIMA et al., 2001).

Assim a recirculação das células da levedura permite a manutenção da alta concentração celular e maior eficiência decorrente de um menor consumo de açúcar utilizado para formação de células (STECKELBERG, 2001).

3.6 OXIGÊNIO

Os micro-organismos se comportam de diferentes maneiras na presença de oxigênio livre, ou seja, alguns micro-organismos exigem a presença de oxigênio para sua sobrevivência não tolerando nem sequer pressões normais de O₂ atmosférico (aeróbios), outros não toleram a presença de oxigênio (anaeróbios) e há aqueles que podem se desenvolver tanto na presença como na ausência do oxigênio livre (facultativos) (BORZANI et al., 2001). *Saccharomyces cerevisiae* tem características facultativas respeito à utilização do oxigênio, podendo seguir rotas metabólicas tanto na ausência como na presença de oxigênio. Porém quando há altas concentrações de açúcares ocorre à inibição da atividade de enzimas respiratórias e a formação de mitocôndrias, levando a produção de álcool na presença de oxigênio, processo denominado Efeito Crabtree (LIMA et al., 1986).

A fermentação alcoólica é inibida na presença de grandes concentrações de oxigênio, fenômeno este denominado “Efeito Pasteur”. Este efeito está intimamente associado ao estado fisiológico da célula, sendo que se manifesta principalmente nas leveduras que não estão na fase de crescimento (fase estacionária) nas quais ocorre nítida diminuição do consumo específico de glicose. Nas células em crescimento (fase exponencial), por outro lado, não se observa diferença significativa quanto a velocidade de consumo de glicose entre uma célula aeróbia e outra anaeróbia (STECKELBERG, 2001).

Embora pareça contraditório, sabe-se hoje que a completa falta de oxigênio não é benéfica ao processo de produção de álcool. Níveis mais altos de rendimentos alcoólicos e menos glicerol formado foram obtidos em culturas nas quais havia certa quantidade de oxigênio disponível (SOUZA, 2009).

3.7 ÁLCOOL

O efeito inibitório do álcool produzido por *S. cerevisiae* durante a fermentação é complexo e resulta no principal fator que desencadeia fermentação incompleta e consequentemente diminuição no rendimento do processo. Portanto, o melhor conhecimento do efeito de álcool sobre a levedura pode ser interessante para melhorar a fermentação. O álcool retarda o crescimento da levedura, reduz viabilidade e habilidade fermentativa (FERREIRA, 2002).

Os fatores que influenciam na sensibilidade do álcool (temperatura, aeração, composição do meio) agem direta ou indiretamente sobre as propriedades da membrana plasmática. Entretanto, o álcool parece não ter um efeito único, provocando modificações nas propriedades da membrana lipídica e nos sistemas de transporte de soluto e agindo sobre algumas enzimas (STECKELBERG, 2001).

Algumas análises evidenciaram que o crescimento celular não é inibido em concentrações de álcool inferiores a 26 g/L, mas é inibido totalmente quando a concentração de álcool atinge 68,5 g/L no meio da fermentação. Da mesma forma ao isolar leveduras de destilarias mostraram inibição de suas atividades fermentativa em batelada simples a 30°C quando a concentração de álcool no meio foi superior a

8%. Acima de 8% de álcool a fermentação ocorre de forma gradativamente reduzida (SOUZA, 2009).

3.8 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade é sem dúvida um aspecto importante no controle da fermentação alcoólica. Quanto maior esse número melhor será o desempenho do processo. Como o ambiente das dornas de fermentação não é propriamente ideal para manutenção da viabilidade celular um controle minucioso deve ser feito nas unidades produtoras (STECKELBERG, 2001).

Aumentos da temperatura de fermentação produzem uma forte diminuição da viabilidade celular, devido ao aumento das taxas de produção e acúmulo de álcool no meio e nas células (STECKELBERG, 2001).

3.9 FLOCULAÇÃO

Na floculação, fenômeno que ocorre na fermentação alcoólica por leveduras, as células agrupam-se formando conglomerados de peso muitas vezes superior ao da célula individualizada. Cessada a fase tumultuosa da fermentação, ou quando a agitação mecânica no fermentador é interrompida, esses flocos sedimentam-se rapidamente ou flutam impulsionados por bolhas de gases. A formação de flocos compromete a conversão de açúcar em álcool e CO₂, pela redução da superfície de contato direto entre as células e o meio (MUTTON et al., 2004). Este fenômeno pode causar perda de células na centrifuga e o conseqüente gasto de substrato para a reposição celular, determinando assim, queda no rendimento alcoólico. A floculação dificulta o contato entre o anti-bacteriano usado no processo e a bactéria causando o aumento desses contaminantes, que provocam um aumento de acidez, afetando a qualidade do álcool produzido, seja como combustível ou para a indústria de bebidas alcoólicas (LUDWING et al., 2001).

A floculação ocorre devido a vários fatores dos quais destacam-se o contato com gomas sintetizadas pelas bactérias, ou pelo contato entre bactérias indutoras da floculação e leveduras, ou ainda devido à contaminação por leveduras floculantes. No setor de fermentação e destilação as bactérias lácticas são as principais promotoras de fermentações indesejáveis, especialmente, o gênero *Lactobacillus* que é resistente ao álcool (LUDWING et al., 2001).

3.10 PRESENÇA DE CONTAMINAÇÃO BACTERIANA

Durante o processo industrial de produção de álcool podem estar presentes micro-organismos oriundos da cana-de-açúcar no campo que sobrevivem aos tratamentos do caldo e condições como pH, temperatura e produtos inibitórios no meio fermentativo e se estabelecem nas dornas de fermentação (ANGELIS, 2010).

As leveduras da fermentação alcoólica competem pelo substrato com bactérias que normalmente habitam as dornas. Um processo de fermentação considerado relativamente sadio apresenta níveis de bactéria próximos a 10⁵ células/mL (ANDRIETTA et al., 2006).

A fermentação industrial, pela dimensão do processo não é conduzida em condições ideais de assepsia, a contaminação bacteriana, principalmente de

Lactobacillus e *Bacillus*, está sempre presente e dependendo de sua intensidade, compromete o rendimento do processo fermentativo. As altas temperaturas de fermentação favorecem a contaminação bacteriana, o aumento do tempo de fermentação e o estresse da levedura. A contaminação bacteriana associa-se ao aumento da formação de ácido láctico e, embora não haja uma confirmação definitiva sobre a causa da floculação da levedura, considera-se, na indústria, que esta contaminação é a principal responsável pelos problemas encontrados na fermentação alcoólica (LIMA et al., 2001).

Como as bactérias são distintas das leveduras, existem alguns antimicrobianos seletivos que são usados para o controle bacteriano, os quais podem minimizar os prejuízos causados por estes contaminantes sobre a fermentação (STECKELBERG, 2001).

4. MICRO-ORGANISMOS CONTAMINANTES NA PRODUÇÃO DE ÁLCOOL

A planta de cana-de-açúcar, como todo organismo vivo, encerra uma microbiota característica distribuída tanto no sistema vascular como em sua camada periférica (ALQUATI, 1990).

A presença maciça de micro-organismos tem origem no campo, estes adentram nos colmos através da ocorrência de infestação de pragas, danos provocados nos colmos pelas operações de corte/carregamento/transporte, facilitando assim a infecção. O corte da cana contribui significativamente neste contexto, sendo que o corte manual deixa menor área exposta para penetração de micro-organismos enquanto que o corte mecanizado aumenta esta área (MUTTON, 2003). As canas saudáveis podem conter de 10^1 a 10^8 bactérias/g e 10^1 a 10^3 bolores e leveduras/g (GALLO, 1989).

Esta microbiota é levada juntamente com o caldo bruto no momento de sua obtenção através da moagem das plantas. O número total de bactérias presentes no caldo bruto de cana-de-açúcar pode ser aumentado sensivelmente tanto por períodos prolongados entre o corte e a moagem da planta como por insipiente assepsia na moenda, filtros, bombas e tubulações que entram em contato direto com o referido material, necessitando muitas vezes do emprego de anti-sépticos para o controle da carga bacteriana (MUTTON, 2003).

Além do mais, normalmente, encontra-se nas unidades industriais o “pátio de cana”, que funciona como um estoque para atender as flutuações de entrega da matéria prima, no qual esta reserva deve ser obrigatoriamente renovada em até 24 horas, pois além desse tempo há uma deterioração acentuada da cana e consequentemente, um aumento do nível de contaminantes (MUTTON, 2003).

Por outro lado, durante a lavagem da cana pode-se haver a remoção parcial dos contaminantes, se a qualidade da água e os cuidados operacionais forem adequados, mas também pode ocorrer um aumento drástico desses contaminantes, quando os cuidados não são assumidos corretamente (ANGELIS, 2010). Por isso o pH da água de lavagem determina o nível de sua contaminação, sendo que um pH em torno de 10 a 11 em circuitos fechados, possui contagem de bactérias mais baixas (STROPPIA, 1998). Assim com o controle adequado de matéria-prima, da água de lavagem e do processo de extração, pode-se obter um caldo misto com pH ao redor de 5,5 e com números de contaminantes inferiores a 10^7 ufc/mL (ANGELIS, 2010).

Embora o caldo ou melaço diluído sejam um excelente meio de cultivo para a grande maioria dos micro-organismos, quando este substrato passa a fazer parte do processo de fermentação suas características são completamente modificadas. Os micro-organismos normalmente presentes que se beneficiam de todas as propriedades não restritivas deste substrato, encontram na dorna de fermentação um ambiente hostil, com teores de nutrientes orgânicos e inorgânicos, alta atividade de água, pH e temperatura que ocorrem nos processos industriais de fermentação. Nesse novo ambiente, os micro-organismos contaminantes além de competir com a levedura do processo têm de apresentar características que lhes permitam crescer em condições de altos teores alcoólicos e alta acidez (SOUZA, 2009).

A contaminação bacteriana é um fator importante a ser considerado no processo industrial de produção do álcool através de bioconversão dos açúcares em álcool, não só pelo fato de desviar a transformação das matérias-primas fermentáveis, sacarose, em substâncias outras que não o produto desejado, como ácidos láctico e acético, como também por consumir parte do álcool, provocando assim, perdas irreparáveis no rendimento da fermentação (ALQUATI, 1990).

A redução no rendimento fermentativo devido a presença de bactérias lácticas é óbvia, pois, quando uma molécula de glicose é convertida em duas de ácido láctico, duas moléculas de álcool deixaram de ser produzidas pela levedura. Além do mais, outro problema causado pela presença de bactérias contaminantes é a floculação, que ocasiona a redução na velocidade de fermentação, além de inconvenientes como entupimento de tubulações, aumento de fundo de dorna, dificuldades do tratamento ácido do creme de levedura, além de reduzir a eficiência das centrífugas e dos antimicrobianos utilizados (SOUZA, 2009).

Os micro-organismos mais comumente encontrados no caule da cana são bactérias dos gêneros *Flavobacterium*, *Xanthomonas*, *Pseudomas*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Leuconostoc*, *Bacillus* e *Corynebacterium*, além de bolores e leveduras como, *Candida*, *Saccharomyces*, *Torula* e *Pichia* (GALLO, 1989).

Além do mais, a queima da cana, prática muito comum, eleva a temperatura do caule de 55 à 85°C, que aparentemente não destrói muitas bactérias formadoras de esporos termorresistentes, uma vez que as mesmas têm sido encontradas minutos após a queimada. É o caso de *Leuconostoc mesenteroides*, que aparece com igual frequência antes ou depois da queima. A cera que envolve o colmo parece apresentar uma atividade bacteriostática e com sua remoção através da queima, os micro-organismos passam a crescer mais livremente, utilizando como meio o caldo exsudado (GALLO, 1989).

As canas cortadas manualmente na colheita ou danificadas durante a queimada, são particularmente mais susceptíveis ao crescimento de bactérias e leveduras (STECKELBERG, 2001). As contagens bacterianas são da ordem de 10^5 a 10^7 bactérias/mL quando a cana é sadia, podendo atingir valores de 10^8 bactérias/mL quando a cana não é sadia ou ficou armazenada por longos períodos de tempo aguardando a moagem (GALLO, 1989).

O caldo misto, proveniente da mistura dos caldos das diversas moendas, é um meio favorável ao desenvolvimento de muitas espécies microbianas por apresentar um brix de 10 a 18, pH entre 5,0 e 5,6, temperatura de 25 à 30°C, aminoácidos, sais orgânicos e inorgânicos e outros nutrientes. Entretanto, apesar de ser um meio propício, não proporciona as condições necessárias para que todas as

bactérias sejam capazes de competir e crescer. As bactérias lácticas são as mais adaptadas, particularmente *Leuconostoc mesenteroides* (GALLO, 1989).

Embora o *Leuconostoc* seja constantemente lembrado como causador de problemas na linha de caldo, outros micro-organismos também são importantes e em algumas condições podem tornar-se ainda mais relevantes. Assim, algumas bactérias Gram-negativas como *Klebsiella* e *Enterobacter*, habitantes naturais de plantas, inclusive da cana-de-açúcar, são capazes de desenvolver nos equipamentos de extração e transporte do caldo, e apresentam algumas espécies produtoras de biopolímeros de forma gomosa. Outras como, *Acetobacter*, costumam desenvolver-se em locais onde o contato com o ar é muito intenso, como no “*cush-cush*”, equipamento utilizado para remover o material do caldo misto por peneiramento grosseiro, constituído principalmente por partículas de fibra e caldo (GALLO, 1989).

As bactérias contaminantes produzem ácidos orgânicos e gomas (dextranas) a partir dos açúcares contidos no mosto, que afetam negativamente a viabilidade das células de leveduras. As leveduras viáveis duram menos tempo na dorna de fermentação e tem que ser substituídas por outras, viáveis (MUTTON, 2003).

Assim entre os problemas encontrados na fermentação alcoólica podem-se mencionar as fermentações indesejáveis, entre as quais tem-se a acética, lática, butírica, da dextrana e da levana. A fermentação acética é atribuída principalmente às espécies *Acetobacter acetii*, *A. pasteurianum*, *A. acetosum*, *A. kuntzegianum* e *A. suboxydans*; a fermentação lática principalmente às espécies *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei* e *L. leischmanii* e *Streptococcus lactis*; a fermentação butírica às espécies *Clostridium pasteurianum* e *C. saccharobutyricum*; a fermentação da dextrana a *Leuconostoc mesenteróides* e a fermentação da levana às espécies dos gêneros *Bacillus*, *Aerobacter* e *Streptococcus*. (GALLO, 1989).

A contaminação bacteriana identificada em amostragens de processos industriais de fermentação alcoólica mostrou-se predominantemente como bacilos gram-positivos não esporulantes. Os gêneros mais freqüentes nas amostragens foram *Lactobacillus* e *Bacillus*. Em relação às espécies predominantes destacaram-se *B. coagulans*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *B. stearothermophilus*, *L. plantarum*, *L. animalis*, *L. buchneri* (CHERUBIN, 2003).

Às vezes é necessário optar entre dois fatores estressantes, como caso do tratamento ácido, que exerce um efeito estressante à levedura, mas acaba sendo benéfica por controlar a contaminação. E outro que acaba sendo muito mais prejudicial à levedura e ao processo que é a contaminação, podendo levar a redução da eficiência fermentativa, e assim prejudicando o rendimento de todo o processo (STECKELBERG, 2001).

Nas análises em amostras de creme de leveduras sem tratamento ácido identificaram-se as espécies predominantes e relatou-se a presença e *L. fermentum*, *L. murinus*, *L. vaccinostercus*, *L. plantarum* e *Leuconostoc sp.* O gênero *Lactobacillus* desenvolve-se em meio ligeiramente ácido, com pH entre 4,4 e 6,4 e em condições microaerófilas e anaeróbias (CHERUBIN, 2003).

4.1 IMPACTO DA PRESENÇA DE BACTÉRIAS EM FERMENTAÇÕES INDUSTRIAIS

Ao longo do processo fermentativo ocorrem diversas interações entre leveduras e bactérias, principalmente a inibição das leveduras pelas bactérias.

As bactérias lácticas compreendem um grupo bastante heterogêneo de organismos distribuídos na natureza. Bioquimicamente não possuem o ciclo de Krebs e a cadeia respiratória clássica, o que as limita a ambientes de baixa concentração de oxigênio. Essas bactérias são acidófilas, limitando-se a ambientes de pH relativamente baixos, crescendo numa faixa ótima de pH 5,5 a 6,2, mas também a valores menores que 5,0 (OLIVA-NETO, 1995). Além do mais exercem um efeito inibidor sobre a levedura em função da pressão osmótica exercida pela presença do ácido láctico no meio de cultivo e produzem peptídeos com a função de executar a comunicação célula-célula e exercer atividade antimicrobiana (CHERUBIN, 2003).

A produção de goma por micro-organismos tem contribuído para perdas de açúcar e dificuldade operacional, considerando que o *L. mesenteroides* é o principal agente formador de goma. Porém outros grupos estão associados, como o *Bacillus*, *Aerobacter*, *Streptococcus*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*. As espécies *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* e *B. polymyxa* também podem produzir gomas levana ou dextrana. Vários autores constataram a presença de fermentações paralelas a fermentação alcoólica devido a contaminantes. Estes agentes causam perdas no rendimento fermentativo, através da produção de ácidos, acético, láctico e butírico e gomas dextrana e levana (OLIVA-NETO, 1995).

Outro problema que comumente ocorre na fermentação alcoólica é a floculação do fermento, devido a formação de flocos compostos de células de leveduras e bactérias, em que várias espécies se destacam como *Bacillus*, *Lactobacillus*, assim como linhagens resistentes ao tratamento ácido utilizado, no preparo do pé-de-cuba, identificada como *Sporolactobacillus*. A floculação parece ser devido à presença, nas bactérias, de uma capa protéica que fixa nas células de leveduras, aumentando o tempo de fermentação, com redução de aproximadamente 15% no rendimento fermentativo (GALLO, 1989).

Estudos revelam que a contaminação bacteriana leva a uma queda no rendimento fermentativo na faixa de 14 a 90% do teórico, quando a concentração de bactérias na fermentação atinge níveis de 10^8 a 10^9 células/mL, verificando ainda quedas de 10 a 40% no rendimento, associados a níveis de 10^7 a 10^8 células/mL (OLIVA-NETO, 1995).

4.2 MÉTODOS DE CONTROLE BACTERIANO NO PROCESSO INDUSTRIAL

Nas décadas de 50 e 60 foram realizados vários estudos sobre a utilização da penicilina, como desinfetante industrial na fermentação alcoólica de meios de origem amilácea e em mosto de cana-de-açúcar (STROPPIA, 1998).

Atualmente a lavagem ácida do fermento continua sendo o principal método de controle não só dos contaminantes, mas principalmente, da floculação do fermento. O tratamento com ácido sulfúrico é feito reduzindo o pH do fermento diluído em água a uma faixa entre 2,0 e 3,0 e, às vezes até inferior a 2,0 com prejuízo na viabilidade das células de leveduras. O fermento é mantido na cuba e são adicionados ácido sulfúrico e água, em constante agitação. O tempo de permanência do fermento durante o tratamento é variado (até três horas). Quanto

maior for esse tempo maior será a redução da viabilidade celular (OLIVA-NETO, 1995).

Os biocidas tem sido usados na produção de álcool para a desinfecção de moendas. Porém, vários produtos químicos são utilizados no controle biológico da fermentação, geralmente associados à lavagem ácida do fermento e, as vezes, também a antibióticos (OLIVA-NETO, 1995).

Os antibióticos são agentes quimioterapêuticos especiais, geralmente obtidos a partir de metabólitos de micro-organismos que, em quantidades muito pequenas, podem matar ou inibir outros micro-organismos. Os mais utilizados na fermentação alcoólica são a tetraciclina, cloranfenicol, penicilina e virginiamicina. Uma das séries limitações ao uso contínuo de antibióticos na indústria é a seleção de bactérias cada vez menos sensíveis à sua ação e também a alteração do equilíbrio natural da microbiota presente na linha de produção, já que geralmente as bactérias gram-negativas não são afetadas (STROPPIA, 1998).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGELIS, D. F. **Contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. Disponível em: <http://www.cca.ufscar.br/~vico/Contaminacao%20bacteriana%20na%20fermentacao%20etanolica.pdf>. Acesso em 23 de agosto de 2010.

ALQUATI, P. H. **Caracterização e controle de micro-organismos contaminantes em microdestilaria de álcool**. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 1990.

ANDRIETTA, M. G. S., STECKELBERG, C., ANDRIETTA, S. R., Bloetanol - Brasil 30 anos na vanguarda. Multi-Ciência: **Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da UNICAMP**, v. 7, p. 1-16, Out. 2006.

ANTONINI, S.R.C. **Métodos de análises e monitoramento microbiológico em laboratório de destilaria**. Universidade Federal de São Carlos, Depto. Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Econômica Rural, Centro de Ciências Agrárias, São Carlos, SP, Brasil, 2004.

BATISTA, A.S. **Saccharomices cerevisae em milho armazenado e o efeito na redução de aflatoxinoses**. Tese de Mestrado. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP, Brasil, 2001.

BERTELLI, L.G. **"A verdadeira História do Proálcool"**. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/proalcool/historia/proalcool-historia-verdadeira.html>. Acesso em 21 de julho de 2010.

BORZANI, W., SCHIMIDELL, W., LIMA, U., AQUARONE, E. **Biotechnologia Industrial: Fundamentos**, v.1, São Paulo, SP, Editora Edgard Blucher, 2001.

CHERUBIN, R. A. **Efeito da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP, Brasil, 2003.

FERREIRA, Leonel Vasco. **Estudo da fermentação alcoólica em frascos agitados**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP, Brasil, 2002.

GALLO, C. R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica**. Tese de Doutorado. Universidade de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP, Brasil, 1989.

LIMA, U. de A., AQUARONE, E., BORZANI, W. **Tecnologia das Fermentações**, v.1, São Paulo, SP, Editora Edgard Blucher, 1986.

LIMA, U. A., BASSO, L. C., AMORIM, H. V. **Produção de Etanol**. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Coord.). Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos, v.3, capítulo 1, São Paulo, SP, Editora Edgard Blucher, 2001.

LUDWING, K. M., OLIVA-NETO, P. de, ANGELIS, D. F. Quantificação da floculação de *S. cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, p. 63-68, Jan./Abr., 2001.

MOREIRA, A. L., ALMEIDA, R. J. A., SCABBIA, R. J. A., TEIXEIRA, R. R. P. Dosagem de ácido láctico na produção de etanol a partir da cana-de-açúcar. **Biológico**, São Paulo, v.71, n.1, p. 69-76, Jan./Jun., 2009.

MUTTON, M.J.R. Reflexos da qualidade da matéria-prima sobre a fermentação etanólica. **Workshop sobre: “Produção de etanol: qualidade de matéria-prima”**. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brasil, 2003.

MUTTON, M. J. R., SOUZA, M. A. C. Floculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum* em processos industriais de fermentação alcoólica avaliada através de técnica fotométrica. **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, n.4, p. 893-898, Jul./Ago, 2004

NOBRE, T. P., HORII, J., ALCARDE, A. R. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 20-25, Jan./Mar., 2007.

OLIVA-NETO, P. **Estudo de diferentes fatores que influenciam o crescimento da população bacteriana contaminante da fermentação alcoólica por leveduras**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP, Brasil, 1995.

PACHECO, T. F. **Fermentação Alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. Tese de

Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química, Uberlândia, MG, Brasil, 2010.

RODRIGUES, D., ORTIZ, L. **Em direção à sustentabilidade da produção de etanol de cana de açúcar no Brasil.** Disponível em: http://www.vitaecivilis.org.br/anexos/etanol_sustentabilidade.pdf. Acesso em 11 de agosto de 2010.

SOUZA, C. S. **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *S. cerevisiae*.** Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia (USP), Instituto Butantan (IPT), São Paulo, SP, Brasil, 2009.

STECKELBERG, C. **Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas.** Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP, Brasil, 2001.

STROPPIA, C. T.; **Avaliação da ação de antibióticos utilizados na fermentação alcoólica através do consumo de açúcar por bactérias contaminantes.** Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP, 1998.

VAREJÃO, Solange. O Desafio da Tecnologia. **INOVAÇÃO em pauta**, v. 8, p. 17-20, 2009.