

Tipos de contaminações bacterianas presentes no processo de fermentação alcoólica

FREITAS, Marcela Domingues
ROMANO, Flavia Piacentini

Resumo

A fermentação alcoólica é o principal processo adotado para a produção de etanol pelas indústrias sucroalcooleiras. Esse processo ocorre de forma biológica, onde as leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) transformam o açúcar do meio em etanol e CO₂. Todavia, é um processo que exige alguns cuidados, em especial na assepsia, para obter um processo fermentativo sadio, o nível de contaminação bacteriana deve ser próximo a 10⁵ células.mℓ⁻¹. Pois, níveis superiores a 10⁷UFL.mℓ⁻¹, levam a prejuízos significativos. Os microorganismos contaminantes de maior ocorrência no processo fermentativo são bactérias Gram-positivas, que dependendo do gênero da bactéria e do nível de contaminação, pode ocasionar diversos problemas como o consumo de açúcar pelos contaminantes, floculação do fermento, queda da viabilidade das leveduras e outros inconvenientes que se somados causam queda no rendimento alcoólico do vinho, além de dificuldades operacionais.

Palavras-chave: contaminação bacteriana, fermentação alcoólica, *Saccharomyces cerevisiae*.

Abstract

The alcoholic fermentation is the main process used for producing ethanol by sugar and alcohol industries. This process occurs in a biological form, in which the yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) transform the sugar into ethanol and CO₂. However, it is a process that requires some care, especially in aseptic fermentation, so it is possible to obtain a sound fermentation process with levels of bacterial contamination near 10⁵ cells.m ℓ⁻¹. For contamination levels exceeding 10⁷UFL.m ℓ⁻¹ leads to significant losses. The highest occurrence of contaminating microorganisms in the fermentation process are Gram-positive bacteria, which depending on the gender of the bacteria and the level of contamination, can cause many problems such as the consumption of sugar by contaminants, yeast flocculation, drop in viability of yeast and other drawbacks which together decrease the income alcoholic of wine, and also generate operational difficulties.

Keywords: bacterial contamination, alcoholic fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*.

Resumen

La fermentación alcohólica es el proceso principal que se utiliza para la producción de etanol por las industrias de azúcar y alcohol. Este proceso se produce en una forma biológica, en la cual la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) convierte el azúcar en alcohol y CO₂. Sin embargo, es un proceso que requiere algunos cuidados, especialmente en la asepsia, por lo que es posible obtener un proceso de fermentación saludable, con niveles de contaminación bacteriana cercana a 10⁵ cells.m ℓ⁻¹. Niveles de contaminación superiores a 10⁷UFL.mℓ⁻¹ conduce a pérdidas significativas. La incidencia más alta de contaminación de microorganismos en la fermentación son las bacterias Gram-positivas, que de acuerdo con el género de la bacteria y el nivel de contaminación, pueden causar muchos problemas, como el consumo de azúcar por los contaminantes, floculación de la levadura, reducción en la viabilidad de levaduras y otros inconvenientes que en conjunto reducen el contenido alcohólico de el vino, y también generan dificultades operacionales.

Palabras clave: contaminación bacteriana, fermentación alcohólica, *Saccharomyces*.

INTRODUÇÃO

No processo industrial de fabricação de álcool, a contaminação bacteriana devido ao desenvolvimento de microrganismos na fermentação alcoólica, consiste num fator limitante à otimização do processo, podendo ocasionar diversos problemas, como o consumo de açúcar e etanol por eles, produção de gomas, inibição e queda da viabilidade das leveduras devido às toxinas e ácidos excretados no meio durante a fermentação alcoólica, principalmente, ácidos láctico e acético (Gallo, 1990; Freitas & Romano, 2012), perda das células de levedura no fundo das dornas ou nas centrífugas, causadas pela floculação do fermento, devido à produção de goma por bactérias (Serra *at al.*, 1976; Oliva-Neto, 1995; Freitas & Romano, 2012), floculação causada pelo contato de bactérias floculentas e leveduras (Oliva-Neto, 1995) e outros inconvenientes que somados causam consequente queda no rendimento alcoólico do vinho.

As bactérias que habitam a matéria prima não estão restritas a determinados grupos de microrganismos, considerando que o caldo de cana é um meio de cultivo extremamente rico em nutrientes (FREITAS & ROMANO, 2012).

Tilbury *at al.*¹ citado por Gallo (1990) e Cherubin (2003), relatam que estudos realizados no Reino Unido, na Índia e na África do Sul, indicam que a maior parte das perdas de sacarose é causada pelo crescimento bacteriano nas moendas, que corresponde a cerca de 62%. Podendo os contaminantes presentes na linha do caldo ocasionar perdas de sacarose que variam de 1 kg.ton⁻¹ de cana, quando as condições higiênicas e operacionais são satisfatórias, até chegar a 2,5 kg.ton⁻¹ quando não adequadas (CHERUBIN, 2003).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* responsáveis pela fermentação alcoólica competem pelo substrato com bactérias que normalmente habitam as dornas de fermentação. Um processo de fermentação considerado sadio apresenta níveis de bactéria próximo a 10⁵ células.mℓ⁻¹ (ANDRIETTA *et al.*, 2006). Sendo níveis de contaminação acima de 5,0x10⁶UFL.mℓ⁻¹ consideradas prejudiciais, níveis acima de 10⁷UFL.mℓ⁻¹, causam prejuízos significativos e acima de 10⁸UFL.mℓ⁻¹ ocorrem queda no rendimento fermentativo, dificultando as operações das centrífugas e consequente aumento do consumo de ácido e antibiótico.

Segundo Vermelho *et al.* (2006), a célula bacteriana é formada por glicoproteínas e glicolipídeos, o que torna importante para a virulência celular e para a fixação dessa célula a diversas superfícies. Possuem também ácido diaminopimélico (DPA), ácido murâmico e ácido

¹ TILBURY, R.H.; *at al.* Mill sanitation: a fresh approach to biocide evaluation. In: *Proc. XVI Congress of the International Society of Sugar Cane Technology*, 1977. Proceedings. V. 3, p. 2749-2768.

teicóico (AMORIM, 2000). Como meio de locomoção, algumas bactérias possuem flagelo ou fímbria de adesão (*pili*), onde além da locomoção é responsável também pela reprodução celular.

Dentre os principais grupos de bactérias existentes, podemos citar a Gram-positiva, Gram-negativa, espiroquetas, clamídias, micoplasmas, nocárdias, cianobactérias, entre outras (VERMELHO *et al.*, 2006). As bactérias Gram-negativas possuem uma fração menor de peptoglicano na parede celular, quando comparada com as Gram-positivas, porém estas possuem um conteúdo maior de lipídeos, além de sua estrutura ser mais complexa (AMORIM, 2000; FREITAS & ROMANO, 2012).

Serra *et al.* (1976) e Amorim e Oliveira (1982), citam como principais contaminantes na fermentação alcoólica os gêneros *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Streptococcus* e *Leuconostoc* e geralmente associados ao baixo rendimento fermentativo na fermentação alcoólica, devido à formação de ácido lático e outros ácidos orgânicos, além de estarem associados à floculação (FREITAS & ROMANO, 2012).

Rosales², *apud* Cherubin (2003), avaliou amostras de fermento centrifugado, fermento após tratamento com ácido sulfúrico, mosto, vinho inicial e final, em que todas as amostras provenientes de destilarias se identificaram com as principais bactérias contaminantes do processo, as do tipo *Lactobacillus sp* (45,0%), *Leuconostoc mesenteroides* (14,4%), *Bacillus sp* (9,5%), *Acetobacter sp* (7,4%), *Enterobacter sp* (6,7%), *Sporolactobacillus sp* (3,6%), *Pseudomonas fluorescens* (1,3%), *Escherichia coli* (1,3%) e *Citrobacter sp* (0,5%).

Segundo Gallo³ *apud* Cherubin (2003) e Freitas & Romano (2012), as bactérias predominantes na fermentação alcoólica e identificadas em seu estudo, as do tipo Gram-positivas (98,52%), em forma de bastonetes (87,76%) e não esporuladas (73,95%), principalmente as do gênero *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, linhagens pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, *Pediococcus* e *Streptococcus*, sendo em sua maioria *Lactobacillus* (59,75%) e *Bacillus* (26,58%).

Naves *et al.* (2010), citam como principais contaminantes que interferem no processo fermentativo as bactérias Gram-positivas dos gêneros *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Leuconostoc*, sendo as do tipo *Lactobacillus* e *Bacillus* sempre presente na fermentação industrial e dependendo de sua intensidade, comprometem o rendimento do processo fermentativo.

Diversos autores identificaram em seus estudos a predominância de bactérias Gram-positivas e em forma de bastonetes no processo de fermentação alcoólica (CHERUBIN, 2003; ANDRIETTA *et al.*, 2006; BREGAGNOLI, 2006; FREITAS & ROMANO, 2012), com destaque para os gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus*.

Assim entre os problemas encontrados na fermentação alcoólica podem-se mencionar fermentações indesejáveis como a fermentação acética, atribuída principalmente aos gêneros

² ROSALES, S.Y.R. **Contaminantes bacterianos da fermentação etanólica: isolamento em meios diferenciais, identificação e avaliação de desinfetantes.** Rio Claro, 1989. 200p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

³ GALLO, C. R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação.** Campinas, 1990, 338p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.

Acetobacter e *Pseudomas*, como as espécies *Acetobacter aceti*, *A. pasteurianum*, *A. acetosum*, *A. kuntzeianum* e *A. suboxydans*, fermentação láctica principalmente aos gêneros *Lactobacillus* e *Streptococcus* e espécies *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei* e *L. leischmanii* e *Streptococcus lactis*, a fermentação butírica às espécies *Clostridium pasteurianum* e *C. Saccharobutyricum* e a produção de goma dextrana a espécie *Leuconostoc mesenteroides* e a levana às espécies dos gêneros *Bacillus*, *Aerobacter* e *Streptococcus* (OLIVA-NETO, 1995; NAVES *et al.*, 2010).

Oliva-Neto (1995) relata em seu estudo, que dentre os contaminantes mais frequentes nas dornas e mais resistentes ao etanol, destacam-se as bactérias lácticas, especialmente o gênero *Lactobacillus*.

De acordo com Oliva-Neto (1995) e Cherubin (2003), as bactérias lácticas são acidófilas, crescendo a uma faixa ótima de pH 5,5 a 6,2, mas também em valores abaixo de 5,0, são tolerantes a temperaturas elevadas, apresentam habilidade de desenvolvimento rápido e comportamento não fastidioso e são capazes de inibir a viabilidade celular da levedura devido à pressão osmótica no meio de cultivo. Além de exercer ação inibidora ao crescimento bacteriano e produzir peptídeos, com a função de executar a comunicação célula-célula. A redução do rendimento fermentativo causada pela presença de bactérias lácticas é óbvia, pois consequentemente quando uma molécula de glicose é convertida em duas de ácido láctico, deixam de serem produzidas duas moléculas de álcool pela levedura.

Oliva-Neto (1995) menciona em seu estudo que o ácido acético é solúvel nos lipídios da membrana celular e inibe por interferência química o transporte de fosfato através da membrana. Já o ácido láctico contém uma hidroxila extra e é muito menos solúvel em lipídios do que o ácido acético, ocorrendo à inibição das células de leveduras em concentrações mais elevadas (10 - 40 g.ℓ⁻¹), o que torna o ácido acético com maior poder de toxicidade sobre a levedura que o ácido láctico. Oliva-Neto (1995) menciona ainda que, esta ação inibitória por sua vez, pode ser diminuída com a simples lavagem da célula de levedura com água.

Gallo (1990) chama a atenção para o fato de que a fermentação acética se estabelece principalmente quando o mosto fermentado permanece por um longo período de tempo na dorna, à espera da destilação e que açúcares redutores como glicose e frutose, e substâncias relacionadas com o manitol e glicerol promovem o crescimento das espécies do gênero *Acetobacter*, produtoras de ácido acético. Essas bactérias por sua vez, também se desenvolvem principalmente em locais onde o contato com ar é muito intenso.

O pH relativamente baixo do caldo, oriundo das moendas, favorecem as espécies consideradas acidófilas de gêneros como *Leuconostoc* e *Lactobacillus*, por outro lado, altas temperaturas associadas ao pH favorecem o crescimento de alguns microrganismos termófilos esporulados (CHERUBIN, 2003).

Oliva-Neto (1995) relata em seu estudo que o gênero *Leuconostoc* apesar de contaminar a fermentação alcoólica proveniente do caldo de cana, raramente chega a causar grandes infecções, devido a sua relativa baixa resistência ao etanol, onde teores alcoólicos superiores a 6% impactaram na interrupção total do crescimento bacteriano.

Segundo Andrietta (2006), entre as bactérias do ácido lático o gênero *Leuconostoc* possui o papel mais importante como contaminante, principalmente na produção de açúcar, onde esta bactéria utiliza o açúcar para a produção de goma. A presença de *L. mesenteroides* é considerada como o principal agente formador de goma (Serra *et al.*, 1976), promovendo o aumento da viscosidade, o que além de dificultar a recuperação da sacarose, aumenta a presença desse açúcar no melaço, causando problemas na indústria e dificultando as operações de clarificação, evaporação e entupimento de trocadores de calor, centrífugas e peneiras. Outros microrganismos como algumas bactérias Gram-negativas como *Klebsiella* e *Enterobacter* apresentam algumas espécies produtoras de biopolímero de forma gomosa (OLIVA-NETO, 1995). Naves *et al.* (2010) também citam outros grupos que estão associados à formação de goma, como o *Bacillus*, *Aerobacter*, *Streptococcus*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, sendo que as espécies *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* e *B. polymyxa* também podem produzir gomas levana ou dextrana.

Egan⁴ citado por Oliva-Neto (1995) verificou que a deterioração da cana cortada com mais de 1 dia, é muito rápida, encontrando valores de 6-11% de perda de açúcar por finais de semana, além do aumento de goma.

Oliva-Neto (1995) relata ainda em seu estudo, perdas de até 3 kg.ton⁻¹ de cana em unidades industriais, devido à formação de gomas dextrana em cana cortada, sendo que esse tipo de contaminação não se encontra em cana cortada com menos de 10 dias de armazenagem.

Outro problema é a floculação do fermento, que ocorre na fermentação alcoólica por leveduras, as células agrupam-se formando flocos ou conglomerados, que muitas vezes maior em comparação à célula individualizada (Naves *et al.*, 2010). Oliva-Neto (1995) e Naves *et al.* (2010), assim como outros autores relacionam a floculação das células de leveduras a várias causas, como a presença de leveduras selvagens floculentas, à produção de polissacarídeos como a dextrana, à bactérias que podem ser adsorvidas à parede das células de leveduras e causar a floculação do fermento, devido uma capa proteica, de natureza gelatinosa, ocorrendo assim a fixação das células de leveduras, causado principalmente pelo aumento do tempo de fermentação, como várias espécies de *Bacillus*, que não são resistentes ao tratamento ácido, bem como uma linhagem resistente ao tratamento ácido, à pHs de 1,9 a 2,0, identificada como *Sporolactobacillus inulinus* (Serra *et al.*, 1976; Gallo, 1990; Andrietta *et al.*, 2006) e algumas linhagens de *Lactobacillus* (GALLO, 1990).

Segundo Amorim (2000), a interação entre as células das bactérias com as células das leveduras é afetada pela variação de pH, ou seja, presença de íons. Pois, para a ocorrência de floculação é preciso que íons Ca⁺² estejam em concentrações a baixo de 10⁻¹M, pois acima disso as células de bactérias e leveduras se repelem, ocorrendo a desfloculação.

Gallo (1990) segue a mesma linha de raciocínio mostrando a importância do tratamento ácido para amenizar a contaminação bacteriana, devido ao processo químico que ocorre no

⁴EGAN, B. T. Post-harvest deterioration losses in sugar cane in Queensland. *Proc. Congress ISSCT*, 13th, 1729-1734. 1968.

interior das células bacterianas, as injúrias celulares. Oliva-Neto (1995) também relaciona a necessidade do tratamento térmico à destruição das propriedades floculentas da bactéria.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nessa revisão bibliográfica foi possível verificar que as bactérias Gram-positivas são as bactérias de maior ocorrência no processo de fermentação alcoólica, sendo que, níveis de contaminação superiores a 10^7 UFL.mL⁻¹, levam a prejuízos significativos, podendo ocasionar queda no rendimento fermentativo, dificuldades operacionais e aumento do consumo de ácido e antibiótico, elevando o custo de produção.

O controle bacteriano no processo de fermentação alcoólica é importante não somente para obter rendimento etanólico satisfatório, mas também para garantir a qualidade do produto final. No intuito de controlar ou inibir a contaminação no processo fermentativo é frequentemente utilizado na indústria produtora de etanol a lavagem da massa de fermento com ácido sulfúrico no pré-fermentador e reforçado pela adição de antibióticos de origem sintética ou natural. Pois, para esta finalidade, é necessário utilizar produtos que especialmente controle ou iniba a contaminação no processo de fermentação alcoólica, sem afetar a viabilidade das leveduras, e conseqüentemente, mantendo teores elevados de grau alcoólico, além de sempre manter o rendimento fermentativo elevado com baixo custo de tratamento.

REFERÊNCIAS

AMORIM, H. V.; OLIVEIRA A. J. Infecção na fermentação: como evitá-la. *Açúcar e Alcool*, v. 5, p. 12-18, 1982.

AMORIM, H. V. Controle microbiológico no processo de fermentação alcoólica. *Apostila Fermentec*, 2000. P. 9-18.

ANDRIETTA, M. G. S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S. R. Bioetanol: Brasil, 30 anos na vanguarda. *Revista Multiciência: Construindo a História dos produtos naturais*, 2006, Campinas. *Anais...Campinas: UNICAMP*, 2006. p.1-16.

BREGAGNOLI, F.C.R. *Comportamento fisiológico de microrganismos submetidos a biocidas convencional e natural na produção de cachaça orgânica*. 2006. 80p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2006.

CHERUBIN, Rudimar A. *Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica*. 2003. 137p. Tese (Doutorado) - “Escola Superior Luiz de Queiroz” - ESALQ, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

EGAN, B. T. Post-harvest deterioration losses in sugar cane in Queensland. *Proc. Congress ISSCT*, 13th, 1729-1734. 1968.

FREITAS, Marcela. D.; ROMANO, Flavia P. *Avaliação do controle bacteriano na fermentação alcoólica com antibióticos naturais*. Piracicaba, 2012, 70p. TCC (Graduação) - Faculdade de Tecnologia de Piracicaba "FATEC".

GALLO, C. R. *Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação*. Campinas, 1990, 338p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.

OLIVA-NETO, P. *Estudos de diferentes fatores que influenciam o crescimento da população bacteriana contaminante da fermentação alcoólica por leveduras*. Campinas, 1995. 183p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

NAVES, R. F.; FERNANDES, *et al.* Contaminação microbiana nas etapas do processamento e sua influência no rendimento fermentativo em usinas alcooleiras. *Enciclopédia Biosféra*, Centro Científico Conhecer, Goiânia, vol. 6, N.11, 16p. 2010.

ROSALES, S.Y. R. *Contaminantes bacterianos da fermentação etanólica: isolamento em meios diferenciais, identificação e avaliação de desinfetantes*. Rio Claro, 1989. 200p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

SERRA, G.R. CEREDA, M.P., FERES, R.J. BERTOZO, M.T. VICENTE, A.T. Contaminação da fermentação alcoólica. Flocculação do fermento. *Brasil Açucareiro*, v. 93, n. 6, p. 26-31. 1976.

TILBURY, R.H.; *at al.* Mill sanitation: a fresh approach to biocide evaluation. In: *Proc. XVI Congress of the International Society of Sugar Cane Technology*, 1977. Proceedings, v. 3, p. 2749-2768.

VERMELHO, A.B. PEREIRA, A.F. COELHO, R.R.R. SOUTO-PADRÓN, T. *Prática de Microbiologia*. Rio de Janeiro-RJ: Guanabara Koogan, 2006.

1 Marcela Domingues FREITAS é Tecnóloga em Biocombustíveis pela FATEC Piracicaba (2012).

2 Flávia Piacentini ROMANO é Tecnóloga em Biocombustíveis pela FATEC Piracicaba (2012). Atualmente é assistente de laboratório - Fermentec Internacional Assistência Técnica em Fermentação Alcoólica. Tem experiência na área de Bioquímica, com ênfase em Bioquímica, em microbiologia e na área de fermentação alcoólica.