

ANÁLISE DA CONTAMINAÇÃO MICROBIANA NAS ETAPAS DE PROCESSAMENTO E FERMENTAÇÃO DA CANA DE AÇUCAR EM UMA USINA SUCROALCOOLEIRA

Juliano Motta RODERO¹
Anielo RODRIGUES²
Andreia Estela Moreira SOUZA³

RESUMO

O Brasil possui aproximadamente 400 usinas de processamento de cana-de-açúcar, sendo o estado de São Paulo responsável por cerca de 60% da produção nacional. Na produção de etanol, o caldo passa por tratamento térmico e decantação, sendo então resfriado e enviado para as dornas de alimentação, nas quais adiciona-se fermento. Nessa fase, pode ocorrer contaminação por bactérias que competem com a levedura pela glicose e frutose, podendo reduzir a produção. O trabalho objetivou quantificar a contaminação bacteriana nas diferentes fases de processamento em uma usina sucroalcooleira e identificar quais gêneros competem no processo fermentativo. Para isto, foram coletadas amostras nas diferentes fases visando análise do pH, viabilidade e contaminação microbiana. Para identificação das bactérias contaminantes, 0,2 ml das amostras foram inoculados em meio de cultura ágar BHI (“Brain Heart Infusion Agar”), incubados a 37°/ 24 horas e após, seleção de colônias para coloração de Gram. O pH variou de 4,5 a 4,6, sendo que a acidificação previne a contaminação. A viabilidade das leveduras apresentou valores de 92,50% a 90,60%, estando dentro dos padrões adequados. A maior contaminação bacteriana foi encontrada na entrada de caldo misto da moenda (10^7 UFC), diminuindo com a redução de pH e acréscimo do antibiótico monensina a 18%. Pela análise microscópica, detectaram-se cocos Gram-positivos dos gêneros *Leuconostoc* e *Lactobacillus*, descritos como principais contaminantes do processo, além de bacilos Gram-negativos, provavelmente *Klebsiella* e, *Enterobacter*. A contaminação bacteriana compete com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* pelo substrato, ocasionando prejuízos no rendimento e na produtividade da usina.

Palavras-chave: Usina sucroalcooleira. Contaminação microbiana. Leveduras. Fermentação.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui mais de 400 usinas de processamento de cana-de-açúcar, que contam com aproximadamente 70 mil produtores da matéria-prima. A produção concentra-se principalmente no Sudeste de país, sendo que somente o estado de São Paulo é responsável por cerca de 60% da produção nacional. Entretanto, os novos cultivos têm se expandido principalmente à região Centro-Oeste, devido principalmente aos menores preços de terra (VIAN, 1997).

No Brasil, são utilizados mosto de caldo misto (caldo mais melaço) e melaço para início do processo. Em nenhum dos casos, o mosto resultante é estéril. A adição de

¹Graduado em Biologia das Faculdades Integradas de Santa Fé do Sul, SP – FUNEC, jmottarodero@gmail.com

²Graduado em Biologia das Faculdades Integradas de Santa Fé do Sul, SP – FUNEC, anielo.rodrigues@hotmail.com

³Docente das Faculdades Integradas de Santa Fé do Sul, SP – FUNEC, ae_moreira@yahoo.com.br

antibióticos é prática generalizada para criar ambiente favorável ao desenvolvimento das leveduras e desfavorável aos microrganismos indesejáveis ao processo fermentativo. Cada produto age de forma diferente, atuando sobre determinado grupo de microrganismos. A avaliação, tanto de carga microbiana quanto de eficácia dos antibióticos comerciais é que determinará a melhor opção de agente microbiano (VASCONCELOS, 1998).

O caldo proveniente da moenda chega ao início do tratamento térmico com os níveis de pH baixo favorecendo as espécies consideradas acidófilas de gêneros como *Leuconostoc* e *Lactobacillus*. Por outro lado, altas temperaturas associadas ao pH ácido favorecem o crescimento de alguns microrganismos termófilos esporulados (CHERUBIN, 2003). Nesse caldo, podem ser encontradas bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, espiroquetas, clamídias, micoplasmas, nocardias, cianobactérias, entre outras, havendo grande diversidade microbiana (VERMELHO et al., 2006).

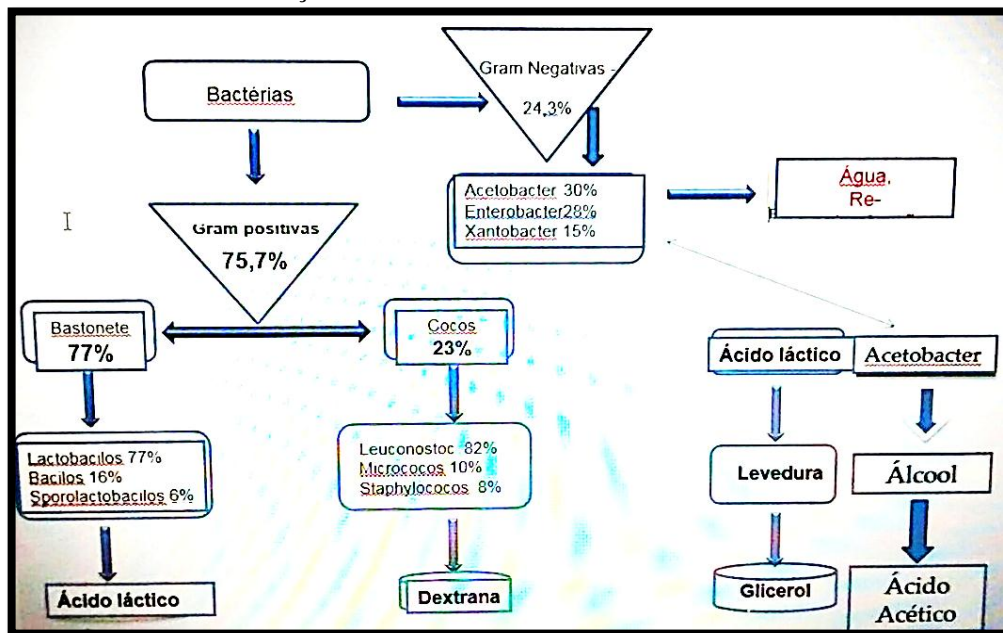
Os principais contaminantes da fermentação alcoólica são as bactérias dos gêneros *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Streptococcus* e *Leuconostoc*. Esses gêneros, geralmente, estão associados ao baixo rendimento na fermentação alcoólica, devido à formação de ácido lático e outros ácidos orgânicos, além de estarem associados à floculação que prejudica o processamento (FREITAS; ROMANO, 2012).

Um estudo experimental de contaminação bacteriana no caldo originado da moenda relata o predomínio de bactérias Gram-positivas (65,1%), dentre as quais, 62,1% são pertencentes ao gênero *Bacillus*, 3%, ao *Lactobacillus* e *Leuconostoc* (RONDINI, 1985). Outro estudo similar comprovou que o gênero mais frequente foi o *Lactobacillus* (59,75%), com a identificação das seguintes espécies: *L. acidophilus*, *L. agilis*, *L. amylophilus*, *L. animalis*, *L. buchneri*, *L. coryniformis subsp. Torquens*, *L. delbruekii subsp. Bulgaricus*, *L. delbruekii subsp. lactis*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. murinus*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. sake*, *L. viridescens*, *L. vitulinus*; seguido pelo gênero *Bacillus* (26,58%) dos quais foram identificadas as espécies *B. brevis*, *B. coagulans*, *B. lentus*, *B. megaterium*, *B. pasteurii*, *B. stearothermophilus*; além de *Staphylococcus* (8,76%); *Micrococcus* (1,56%); representantes da família *Enterobacteriaceae* (1,48%); *Pediococcus* (1,26%) e, em baixa quantidade, *Streptococcus* (0,70%) (SANTOS, 2012).

Esses estudos mostram a grande diversidade de espécies encontradas no caldo, com predomínio de algumas (Figura 1). Uma das bactérias presentes contaminando o caldo e o mosto é *Leuconostoc*, presente no caule da cana-de-açúcar no momento do corte e resistente à queima (GALLO, 1989). Trata-se de um coco gram-positivo que ocorre em pares ou cadeias,

formando pequenas colônias de tamanho menor que 1mm de diâmetro. Essas bactérias apresentam crescimento lento em meio contendo sacarose, são anaeróbicas facultativas, quimiorganotróficas resistentes ao antibiótico vancomicina e adaptadas a crescerem nas condições de altas temperaturas das fases do processamento da cana (JOHNSON et al., 1990).

Figura 1 - Principais gêneros de bactérias contaminantes do processo fermentativo da cana-de-açúcar



Fonte: MC Desinfecção Industrial.

Lactobacillus fermentum, uma bactéria Gram-positiva comumente encontrada em fermentação de materiais de origem animal e vegetal, compete diretamente com a levedura pelo substrato e é responsável pela floculação de leveduras. Essas bactérias produzem ácido láctico e outros ácidos orgânicos em quantidades superiores às normais e podem ser responsáveis por uma queda no rendimento da fermentação, pois ocasionam a inibição da levedura (AMORIM; OLIVEIRA, 1982).

Tendo em vista a grande importância do etanol para a economia e o desenvolvimento do Brasil e sabendo da influência negativa de microrganismos, especialmente bactérias, na produção desta importante fonte de energia, tornam-se necessários o estudo e o entendimento de quais bactérias e em que proporção elas se encontram no sistema fermentativo das usinas sucroalcooleiras. Desta forma, espera-se obter um controle mais eficiente da contaminação projetando tratamentos personalizados e menos prejudiciais ao processo.

O objetivo deste estudo foi analisar a presença de contaminação bacteriológica nas diferentes fases do processo de fermentação da cana-de-açúcar para a produção de etanol e identificar os microrganismos contaminantes.

2 METODOLOGIA

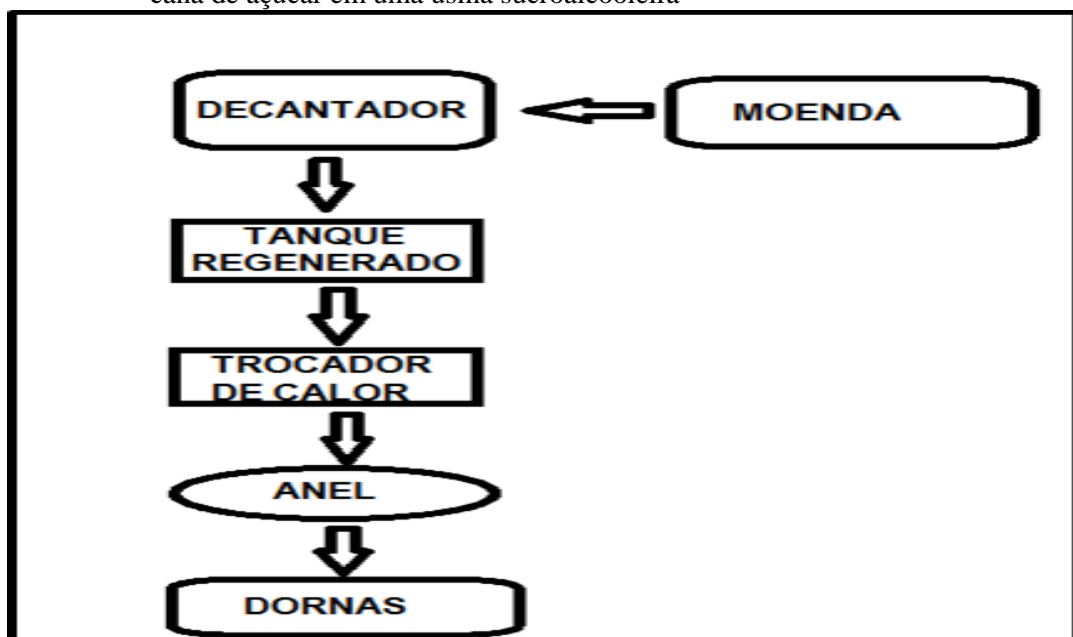
2.1 Tipo de pesquisa e local de estudo

Foi realizada uma pesquisa de campo visando analisar e quantificar a contaminação por bactérias nas dornas de fermentação da cana-de-açúcar. Para isso, o presente trabalho foi desenvolvido com amostras de uma usina sucroalcooleira que produz açúcar e etanol para exportação e para o mercado interno.

2.2 Coleta das amostras

Foram coletadas amostras de mosto na entrada e saída do decantador, entrada e saída do trocador de calor e no anel durante o processamento da cana-de-açúcar (Figura 2), visando acompanhar a contaminação bacteriana e a viabilidade das leveduras.

Figura 2 - Esquema mostrando as etapas de processamento da cana-de-açúcar. Obtido da cana de açúcar em uma usina sucroalcooleira



Fonte: Dos próprios autores.

Nas dornas com vinho levedurado foram coletados 500ml de amostra para a obtenção de dados de pH, contaminação bacteriana, viabilidade, brotamento e número de células, sendo essas análises realizadas no laboratório de análise industrial.

2.3 Análise da contaminação microbiana

Esta técnica é a mais adequada para a contagem de bacilos (bastonetes), embora outros tipos de bactérias (cocos) possam ser quantificados. Para a quantificação da contaminação microbiana, 5 ml de vinho levedurado foram coletados em um tubo de ensaio e acrescidos com 0,2g de papaína. A amostra foi agitada e, em seguida, deixada para descansar por 5 minutos. Um ml dessa mistura foi corado com 1ml de azul do Nilo. Em uma lâmina, foram inseridos 0,03 ml da preparação corada, sendo contados 50 campos em aumento de 1000 vezes, utilizando óleo de imersão. Nesta preparação, as células viáveis aparecem incolores enquanto as não viáveis são coloridas de azul. Após a contagem, foi utilizada a seguinte fórmula para determinar o número de bastonetes:

$$\text{Total de bastonetes} / 50 \text{ campos} \times 15,406.2 \times 333.33 \times (D).(D): \text{ diluição.}$$

2.4 Determinação de viabilidade, brotamento e número de células

A amostra do vinho levedurado coletada acima também foi utilizada para esta análise. Um ml de vinho levedurado misturado com papaína foi diluído em 30ml de água destilada. Dessa mistura, 1ml foi adicionado ao corante eritrosina, na mesma proporção. A amostra foi colocada na câmara de Neubauer até completar todos os campos, sendo contadas tanto as células de leveduras mortas (coradas com eritrosina) como as vivas (incolores). Para determinar a viabilidade usou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Total de células vivas} / (\text{total de células vivas} + \text{total de células mortas}) \times 100$$

Para determinar o brotamento, utiliza-se a fórmula:

$$\text{Broto} / \text{células vivas} \times 100.$$

Para determinar número de células vivas, utiliza-se a fórmula:

$\text{Total de células vivas} \times 4.000 / 100 \times (D) \times 100.D: \text{diluição}$

2.5 Cultivo de bactérias e coloração de Gram

O cultivo das bactérias e a coloração de Gram foram utilizadas para identificar as espécies contaminantes no processo. Foram analisadas amostras de cinco pontos: entrada e saída do decantador, entrada e saída do trocador de calor e saída do anel (Figura 2). Para isso, 0,2ml da amostra foram inoculados em meio de cultura ágar BHI (“Brain Heart Infusion Agar”- Liofilchem) estéril. Após inoculação, as placas contendo os meios de cultura foram incubadas a 37°C em estufa bacteriológica por 48 horas para crescimento microbiano.

Uma colônia de cada ponto de coleta foi selecionada aleatoriamente na placa de petri para coloração de Gram. Para isso, inicialmente procedeu-se ao esfregaço bacteriano em lâmina histológica. O filme fixado foi corado com cristal violeta por 60 segundos. Em seguida, o filme foi lavado com água destilada e coberto com lugol por 60 segundos. Após nova lavagem com água, procedeu-se à descoloração com álcool 99% e coloração com o contra corante Fucsina por 60 segundos. O excesso foi retirado por lavagem com água destilada. As lâminas foram secadas e observadas ao microscópio óptico em objetiva de imersão.

Foram feitas aplicações de antibióticos à base de monensina (Fermaxi) para manter níveis de contaminação aceitáveis de bactérias, já que na fermentação alcoólica, elas interferem diretamente no consumo dos açúcares, afetando a produção do etanol.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao chegar ao decantador, o caldo da moenda apresentou pH inicial de 5,42. O mosto, obtido subsequentemente, apresentou pH 5,25.

As análises obtidas de vinho levedurado nas dornas apresentaram valores de pH, viabilidade, contaminação, brotamento e número de leveduras por ml mostrados na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1 -Valores de pH, viabilidade, contaminação bacteriana (Bastonetes), brotamento de leveduras e número de leveduras por ml obtidos nas quatro dornas da usina sucroalcooleira

DORNA	pH	Bastonetes	Viabilidade	Brotamento	Nº de células
1 – 2	4,5	1,6X10 ⁶	92,50%	17,57%	7,3X10 ⁸
3 – 4	4,6	1,6X10 ⁶	90,60%	12,4%	6,8X10 ⁸

Fonte: Dos próprios autores.

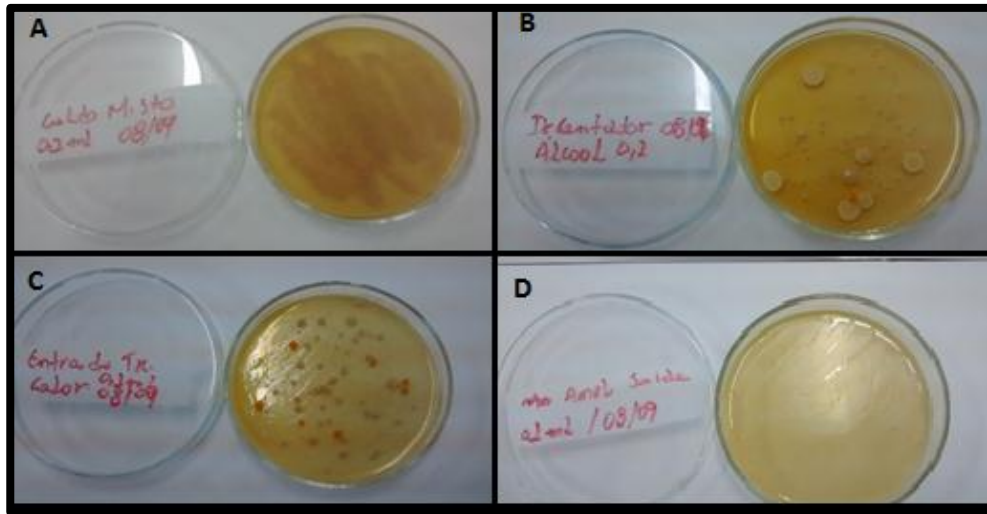
Pode-se observar que as quatro dornas apresentaram valores semelhantes. O pH ácido é devido à adição de ácido sulfúrico nas cubas para controlar a contaminação bacteriana. Esses valores estão dentro dos parâmetros adequados segundo normatizações de usinas sucroalcooleiras, pois a faixa de pH ótima para o processo deve ficar entre 4 e 5 (LIMA et al., 1986).

O pH ácido é importante para controlar o crescimento microbiano e, ao mesmo tempo, é ideal para o crescimento da levedura e para todo o processo fermentativo (SOUZA, 2009). Estudos mostram que pH na faixa de 7,0 provoca a diminuição do rendimento em álcool e aumento de ácido acético, prejudicando o processo (SOUZA, 2009). A contaminação observada (10^6), embora reduza a fermentação, ainda está dentro dos limites aceitáveis pelo setor sucroalcooleiro. Processos de fermentação em níveis ótimos apresentam contaminação bacteriana de 10^5 células/ml (ANDRIETTA et al., 2006). A contaminação por bactérias está sempre presente e, dependendo de sua intensidade, compromete o rendimento do processo fermentativo, devendo seus níveis serem controlados, mas dificilmente eliminados (LIMA et al., 1986).

A viabilidade, o brotamento e o número de células de leveduras por ml obtidos nas dornas também foram adequados para o processo, sendo a viabilidade próxima a 100%. A quantificação da viabilidade é um dado importante, pois se relaciona com o desempenho do processo fermentativo. O controle desse aspecto é essencial para a produção, uma vez que as condições ambientais das dornas nem sempre são adequadas (STECKELBERG, 2001).

A maior contaminação bacteriana foi encontrada na fase de entrada de caldo misto da moenda (10^7 UFC Unidades Formadoras de Colônias), diminuindo com a redução de pH e acréscimo antibiótico monensina a 18% (Figura 3).

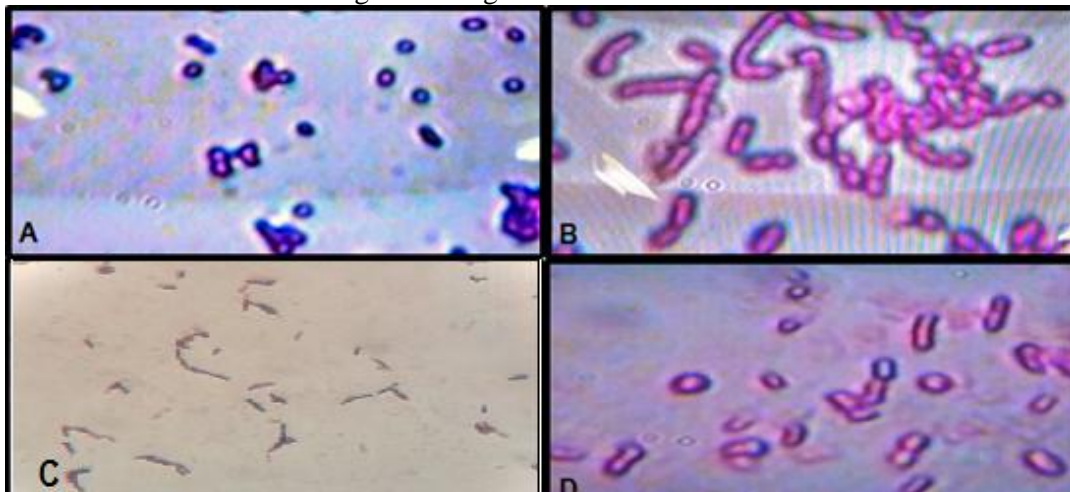
Figura 3- Colônias de bactérias contaminantes do processo fermentativo, obtidas por inoculação da amostra em meio BHI. A: Caldo misto. B: Decantador de álcool. C: Entrada trocador de calor. D: No anel de mosto



Fonte: Dos próprios autores.

Pela análise microscópica, detectaram-se cocos e bacilos Gram positivos dos gêneros *Leuconostoc* e *Lactobacillus*, respectivamente, descritos como principais contaminantes do processo, além de bacilos Gram negativos, provavelmente *Enterobacter* (Figura 4).

Figura 4 - Colônias de bactérias identificadas pela coloração de Gram. A: Cocos Gram-positivos do gênero *Leuconostoc*. B: Bacilos Gram-negativos do gênero *Enterobacter*. C: Bacilos Gram-positivos do gênero *Lactobacillus*. D: Bacilos Gram-negativos do gênero *Klebsiella*



Fonte: Dos próprios autores.

A alimentação da dorna é outro ponto de desenvolvimento microbiano. Nela as bactérias encontram as condições ideais para multiplicação: temperatura em torno de 33°C, glicose e frutose disponíveis. A partir desta fase, inicia-se a competição direta dos

microrganismos com as leveduras por esses monossacarídeos, sendo que os microrganismos irão digerir o substrato para a manutenção e proliferação da sua população. Já as leveduras irão produzir etanol ao utilizar o substrato.

Nas dornas, inicia-se o controle das bactérias afim de minimizar as perdas na produção de etanol. Em um processo de fermentação alcoólica, uma das principais perdas está relacionada à contaminação bacteriana, afetando diretamente a produção de álcool (PASCHOALINI; ALCARDE, 2009). Para isso, o mosto nas dornas é monitorado analiticamente em laboratório por metodologias que podem, com exatidão, apontar a quantidade de bastonetes em relação ao volume da dorna.

Toda a análise aqui realizada, mostrou a presença de bactérias contaminantes, principalmente, na fase da entrada do caldo misto, sendo que estas permanecem por grande parte do processo. No entanto, a adição do antibiótico e a acidificação do meio foram eficientes para controlar a contaminação, mantendo condições adequadas de rendimento.

4 CONCLUSÃO

Nas análises realizadas, foram detectados cocos e bacilos Gram-positivos dos gêneros *Leuconostoc* e *Lactobacillus* e bacilos Gram-negativos *Klebsiella* e *Enterobacter*.

Observou-se também que os níveis de contaminação nas dornas estavam controlados em torno de 10^6 UFC, dentro de um padrão admissível em fermentações alcoólicas.

O controle com ácido sulfúrico para manter o meio ácido e o uso do bactericida monensina continuamente mostraram-se eficientes para manter os níveis aceitáveis de contaminação, sem causar prejuízo à empresa.

ANALYSIS OF MICROBIAL CONTAMINATION IN THE PROCESSING AND FERMENTATION STAGES OF SUGAR CANE IN A SUCROALCOOLER

ABSTRACT

Brazil has about 400 sugarcane processing industries, and São Paulo state is responsible for about 60% of the national production. In ethanol production, the broth undergoes heat treatment and decantation, and then it's cooled and sent to the power vats, in which yeast is added. In this phase, contamination by bacteria that compete with the yeast by glucose and fructose can occur, and thus production can be reduced. The aim purpose of this study was to quantify the bacterial contamination in different processing stages in a sugarcane industry and identify which genders compete in the fermentation process. For this, samples were collected at different stages in order to analyze the pH, the viability and the microbial contamination. For the identification of bacterial contaminants, 0.2 ml samples were inoculated onto BHI agar culture medium ("Brain Heart Infusion Agar") incubated at 37°/24 hours and selection of

colonies for Gram staining. The pH ranged from 4.5 to 4.6, wherein acidification prevents contamination. The viability of the yeast showed values of 92.50% to 90.60% and is within the appropriate standards. Most bacterial contamination was found in the mixed broth inlet of the mill (107 UFC), decreasing with the pH reduction and increase of the antibiotic monensin at 18%. Based on the microscopic analysis, positive cocci of the *Leuconostoc* and *Lactobacillus* genders were detected, which are described as the main contaminants of the process, as well as the Gram-negative bacilli, probably *Klebsiella* and *Enterobacter*. The bacterial contamination competes with *Saccharomyces cerevisiae* for the substrate, causing losses in the yield and in the output of the industry.

Keywords: Sugarcane industry. Microbial contamination. Yeasts. Fermentation.

REFERÊNCIAS

ANDRIETTA, M. G. S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S. R. Bioetanol– Brasil30 anos na vanguarda. Multi-Ciência: **Revista interdisciplinar dos centros e núcleos da UNICAMP**, v. 7, p. 1-16, Out. 2006. Disponível em:

<http://www.multiciencia.unicamp.br/art02_7.htm> Acesso em: 14 jun. 2016.

AMORIM, H.V. **Fermentação alcoólica**: ciência etecnologia. Piracicaba: Fermentec, 2005.

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, p.33. Disponível em:

<<file:///C:/Users/mdlima/Downloads/rudimar.pdf>>. Acesso em: 24 maio 2016.

FREITAS, M. D.; ROMANO, F. P. **Avaliação do controle bacteriano na fermentação alcoólica com antibióticos naturais**. 2012. 70 f. TCC (Graduação) - Faculdade de Tecnologia de Piracicaba “FATEC”, Piracicaba, 2012. Disponível em:

<www.fatecpiracicaba.edu.br/revista/index.php/bioenergiaemrevista/article/.../pdf>. Acesso em: 24 maio 2016.

JOHNSON, A. P. et al. Resistanceto Vancomycinand Teicoplanin: na Emerging Clinical Problem.**Clinical Microbiology Reviews**, v.3, p.280 – 91, 1990. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC358160/pdf/cmr00048-0092.pdf>>. Acesso em: 24 ago. 2016.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Tecnologia das fermentações**. São Paulo: Edgard Blucher, 1986. V.1.

MC Desinfecção Industrial. Disponível em: <<http://www.mcdesinfeccaoindustrial.com.br>>. Acesso em: 10 out. 2016.

PASCHOALINI, G.; ALCARDE, V. Estudo do processo fermentativo de usinasucroalcooleira e proposta para sua otimização. **Revista de Ciência &Tecnologia**, v.16, n. 32, p. 59-68, 2009. Disponível em:

<<https://www.metodista.br/revistas/revistasunimep/index.php/cienciatecnologia/article/view/781/318>>. Acesso em: 5 fev. 2014.

SANTOS, B. M. **Identificação molecular de bactérias lácticas presentes no caldo de cana-de-açúcar**. 2012. 100 f. Dissertação de Mestrado (Ciências Biológicas - Genética) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife/ PE. 2012. Disponível em: <http://repositorio.ufpe.br/bitstream/handle/123456789/12260/Billy_Manoel_dos_Santos.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 24 maio 2016.

SOUZA, C. S. **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de S. cerevisiae**. 2009. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia (USP), Instituto Butantã (IPT), São Paulo, SP, Brasil, 2009. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/87/87131/tde-05082009-171501/publico/CrislaSerraSouza_Doutorado.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2016.

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. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000232430>>. Acesso em: 24 maio 2016.

SERRA, G.R.et al. Contaminação da fermentação alcoólica. Flocculação do fermento. **Brasil Açucareiro**, v. 93, n. 6, p. 26-31. 1976. Disponível em: <www.fatecpiracicaba.edu.br/revista/index.php/bioenergiaemrevista/article/.../pdf>. Acesso em: 24 maio 2016.

VERMELHO, A. B. et al. **Prática de microbiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2006.

VASCONCELOS, J. N. **Fermentação alcoólica contínua com levedura imobilizada em colmos de cana de açúcar**. 1998. 480 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.1998. Disponível em: <<http://livros01.livrosgratis.com.br/cp082406.pdf>> Acesso em: 24 maio 2016.

VIAN, C. E. D. F. **Expansão e diversificação do complexo agroindustrial sucroalcooleiro no Centro-Sul do Brasil-1980/96**. 1997. 237 f. Tese (Mestrado em Engenharia de Produção). Departamento de Engenharia de Produção (DEP), Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), São Carlos, 1997.

Recebido em 16 de novembro de 2016.

Aceito em 13 de fevereiro de 2017.