

# Avaliação do controle bacteriano na fermentação alcoólica com produtos naturais

FREITAS, Marcela Domingues  
ROMANO, Flavia Piacentini

## Resumo

O objetivo deste trabalho foi estudar produtos naturais de origem vegetais que possam diminuir a contaminação bacteriana na fermentação alcoólica por meio de produtos naturais de origem vegetal que possuam características bactericidas em outros fins. Os testes realizados na Fermentec Ltda, para detecção da eficiência dos produtos iniciou-se com o teste de sensibilidade, seguido com teste de antimicrobiano e posteriormente pelo ensaio de fermentação em escala laboratorial. Os produtos testados foram um a base de óleo de *Mentha piperita L.* e outro de extrato de *citrus*, tendo como referência o  $\beta$ -ácido, produto natural já consolidado no mercado, muito utilizado nas usinas e a testemunha. Os resultados mostraram que apenas o  $\beta$ -ácido foi eficiente na dosagem de 10 ppm, no controle das bactérias, onde obteve uma eficiência de 95% e 93% respectivamente para os meios PCA e MRSA e em todos os testes realizados inclusive no ensaio de fermentação em escala laboratorial, comprovando estudos anteriores realizados pela Fermentec Ltda. O extrato de *citrus*, não obteve nenhum efeito sob o controle bacteriano e o óleo de *Mentha* não apresentou resultados significativos, apresentando valores de 36% e 31% respectivamente para os meios PCA e MRSA sendo que o óleo de *Mentha* apresentou ainda queda significativa na viabilidade celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

**Palavra Chave:** fermentação alcoólica, contaminação, antibióticos, plantas naturais.

## Abstract

The aim of this work was to study natural products of vegetable able to decrease the bacterial contamination in alcoholic fermentation through bactericidal characteristics presents in these products. The tests performed at Fermentec Ltda, aiming to detect the products efficiency started with the sensitivity test followed by the antimicrobial activity test and subsequently by the fermentation test in laboratory scale. The tested products were mint oil (*Mentha piperita L.*) and another by citrus extract, besides the  $\beta$ -acid which was used as a reference, since it is a well-known natural product and is largely used in plants. The results showed that only the  $\beta$ -acid (10 ppm) was effective presenting 95% and 93% of efficiency, for the PCA and MRSA media, respectively, in all performed tests, confirming previous studies realized at Fermentec Ltda. The citrus extract didn't show any effect on controlling the bacterial growth and the mint oil didn't show significant results, with efficiency values of 36% and 31% for the PCA and MRSA media, respectively. Moreover, the mint oil caused a decrease on the cell viability of *Saccharomyces cerevisiae* yeast.

**Keywords:** alcoholic fermentation, contamination, antibiotics, natural products.

## Resumen

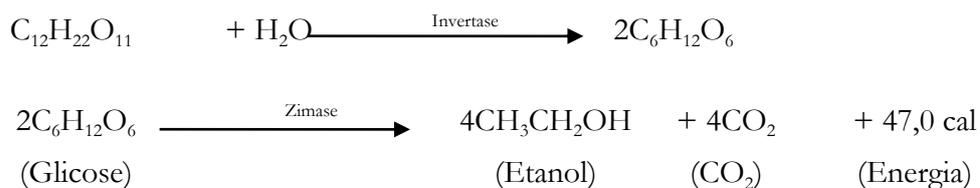
El objetivo del trabajo fue estudiar los productos naturales de origen vegetal que pueden reducir la contaminación bacteriana en la fermentación del alcohol por los productos naturales de plantas que tienen características antibacterianas en otros fines. Las pruebas realizadas en *Fermentec Ltda*, para la eficiencia en la detección de los productos empezó con prueba de sensibilidad, después pruebas antimicrobianas y más tarde pruebas de fermentación en escala laboratorial. Los productos evaluados fueron una base de aceite de *Mentha piperita L.* y otro de extracto de cítricos, con referencia al  $\beta$ -ácido, producto natural ya establecido en mercado, ampliamente utilizado en plantas de alcohol y testigo. Los resultados mostraron que sólo el  $\beta$ -ácido fue eficaz a una dosis de 10 ppm en el control de bacterias, que ha obtenido un promedio de la eficiencia del 95% y 93% respectivamente para el PCA y MRSA en todas las pruebas, incluyendo la prueba de fermentación en escala de laboratorio, lo que confirman los estudios hechos por *Fermentec Ltda*. El extracto de cítricos no se mostró con ningún efecto en el control de bacterias y el aceite de *Mentha* no mostró resultados significativos, con valores de 36% y 31%, respectivamente para el PCA y MRSA, todavía el aceite de *Mentha* aún disminución significativa en la viabilidad celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

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

## INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos principais produtores de etanol a partir de cana de açúcar. Segundo dados publicados pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2013) a previsão para a safra de 2013/14 é que o Brasil tenha um acréscimo de área de plantio equivalente a 314 mil hectares (3,7%) em relação à safra 2012/13, e deve chegar a 652,02 milhões de toneladas de cana moída, com um aumento de 10,7% sobre a safra 2012/13. Espera-se um aumento de 6,88% para o açúcar, enquanto que a produção total de etanol é estimado acréscimo de 14,94%, devendo elevar de 23,64 (safra 2012/13) para 27,17 bilhões de litros para 2013/14, sendo os produtos obtidos da cana de açúcar de suma importância nas exportações brasileiras, consequentemente, contribuindo com geração de emprego e renda.

Atualmente a fermentação alcoólica é a principal via adotada para obtenção de etanol, que através de microrganismos, usualmente as leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, convertem de maneira simplificada os açúcares presentes no substrato em etanol, gás carbônico (CO<sub>2</sub>) e energia, dentro de determinadas condições como pH, temperatura, concentração de açúcares, concentração de inóculo, viabilidade celular, teor de oxigênio entre outros (NAVES, 2010).



Nesta etapa podem ocorrer diversos problemas entre os principais merecem destaque a contaminação bacteriana, o que pode ocasionar perdas no processo, devido à diminuição dos açúcares fermentescíveis, floculação do fermento, queda da viabilidade, redução no rendimento e na produtividade industrial (ALCARDE, 2006).

Diversos autores como Cherubin (2003), Andrietta (2006), Bregagnoli (2006) e Freitas & Romano (2013), ressaltam em seus estudos a predominância de bactérias Gram-positivas no processo de fermentação alcoólica, com destaque para os gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus*.

Para conter a proliferação bacteriana e aumentar o rendimento fermentativo, além do tratamento do creme de levedura com ácido sulfúrico, recomenda-se a utilização de antibióticos, que são compostos orgânicos, naturais ou sintéticos, que causam a morte ou inibem microrganismos específicos presentes, apresentando seletividade (BREGAGNOLI, 2006).

Além de que, para indústrias produtoras de levedura seca, já em muitos países, por questões de saúde pública não é admissível usar leveduras para ração animal ou até mesmo alimentação humana que apresente resíduos de antibióticos, o que torna o uso de antibióticos naturais uma alternativa promissora, mais econômica e eficaz (TAUBE, 2009; FREITAS & ROMANO, 2012).

Por fim, este trabalho tem como objetivo testar produtos naturais de origem vegetal que apresentem características antibacterianas para controle da contaminação na produção de etanol.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Para todos os testes utilizou-se de um *mix* bacteriano formado pelas seguintes bactérias cedidas pela empresa *Fermentec Ltda* do seu banco de microrganismo: *Lactobacillus casei*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* e *Acetobacter pasteurianus*. Também foi cedido pela *Fermentec* a levedura PE-2 para o ensaio de fermentação em escala laboratorial.

Os produtos utilizados nesse teste foram dois produtos naturais de origem vegetal já existente no mercado de antibiótico para a fermentação alcoólica e outro produto natural de origem vegetal ainda não utilizado para esta finalidade, mas que segundo as literaturas possuem ação bacteriana.

Os produtos foram classificados da seguinte forma:

**Produto B:** Produto comercial derivado do  $\beta$ -ácido de lúpulos. Já utilizado para a produção de etanol bem como produtos avícolas. A dosagem indicada pelo fabricante é de 5 a 10 ppm, portanto nesse trabalho utilizou a dosagem maior (10 ppm).

**Produto C:** Derivado do extrato de cítrico, composto basicamente de rutina, naringina e terpenos, onde a finalidade é romper a parede celular das células bacterianas. Segundo o fabricante a dosagem ideal é de 5 ppm, sendo este o este valor adotado para este trabalho.

**Produtos M:** Óleo puro extraído da *Mentha piperita*, utilizado com finalidades terapêuticas, na dosagem de 100 ppm.

A metodologia utilizada para determinar o potencial antimicrobiano dos produtos naturais de origem vegetal, seguiu toda a metodologia *Fermentec*. Onde iniciou do teste mais rápido (de baixa complexibilidade), considerado preliminar, até o teste mais complexo e mais próximo da realidade, simulando o que ocorre nas usinas produtoras de álcool.

O teste inicial, denominado teste de sensibilidade, consistiu na adição de um *mix* bacteriano em dois meios sintéticos distintos, meio GLT e meio *Leuconostoc*.

<b>Leuconostoc – Mayeux&amp;Colmer, 1961</b>		<b>GLT</b>	
Extrato de Levedura	20g	Extrato de Levedura	2,5g
Proteose – Peptona n <sup>a</sup> 3	5g	Triptona	5g
Dextrose	10g	D-Glicose	1g
Fosfato Monobásico de Potássio (KH <sup>2</sup> PO <sup>4</sup> )	2g		
Água destilada	1000mL	Água destilada	1000mL

Logo após a introdução do *mix* bacteriano nos meios adicionou-se os produtos naturais de origem vegetal na dosagem citada anteriormente, e na sequência realizou-se uma leitura no

espectrofotômetro com o comprimento de onda de 520nm. Após esse procedimento, incubou os tubos em uma BOD a 35°C durante seis horas, para então realizar a última leitura de absorbância no espectrofotômetro, com as mesmas condições do anterior.

Após o teste com os meios sintéticos, as mesmas bactérias e produtos naturais de origem vegetal foram adicionados no mosto misto, para a realização do teste de antimicrobiano. Os resultados foram obtidos através de diluições em série e microplaqueamentos das amostras, sendo uma inicial, ou seja, logo após o preparo do inóculo mais a adição dos produtos a serem testados, e microplaqueando as mesmas amostras após a incubação de nove horas na BOD a 35°C.

Na sequência realizou-se um ensaio de fermentação em escala laboratorial, para que pudesse testar os diversos parâmetros que ocorrem também nas usinas, como o teor alcoólico, o índice de contaminação, a viabilidade celular das leveduras, a velocidade fermentativa, a concentração de ácido láctico, de glicose, frutose e sacarose.

O ensaio de fermentação em escala laboratorial foi realizado em cinco ciclos com reciclo de células de levedura, em uma temperatura controlada de 33°C, com o pé de cuba de 10%, e com teor alcoólico do mosto misto, que foi alimentado em quatro vezes a cada hora e meia. No primeiro ciclo de fermentação alcoólica em escala laboratorial, foi adicionado  $1 \times 10^7$  bastonetes/ml, levando em consideração o volume final de cada amostra. A partir do segundo ciclo foi realizado o tratamento ácido, para que iniciasse o ensaio com o pH em torno de 2,2. Também a partir do segundo ciclo foram adicionados os produtos nas dosagens estipuladas, com exceção do quinto ciclo em que não foi necessária a adição do produto **B**, pois a contaminação bacteriana foi menor que  $1 \times 10^5$ , o que não é tão prejudicial à fermentação alcoólica.

Os resultados de contaminação bacteriana e viabilidade celular foram coletas antes da centrifugação no final de cada dia. Enquanto que as demais análises foram realizadas a partir do vinho da fermentação.

Para a determinação do teor alcoólico, utilizou-se de um microdestilador para destilar as amostras e assim obter a graduação alcoólica, fazendo uso de densímetro.

As análises de açúcar (sacarose, glicose e frutose) e a análise de ácido láctico foram realizadas em cromatógrafo. Todavia para a análise de ácido láctico utilizou-se cromatógrafo de íon com uma fase móvel de água desmineralizada com resistiva de 19  $\Omega$ M / cm em uma corrida com variação de eluente, enquanto que para as análises de açúcar, foi necessário cromatógrafo por troca aniônica com integração ao programa computacional Chromeleon version 6.60.

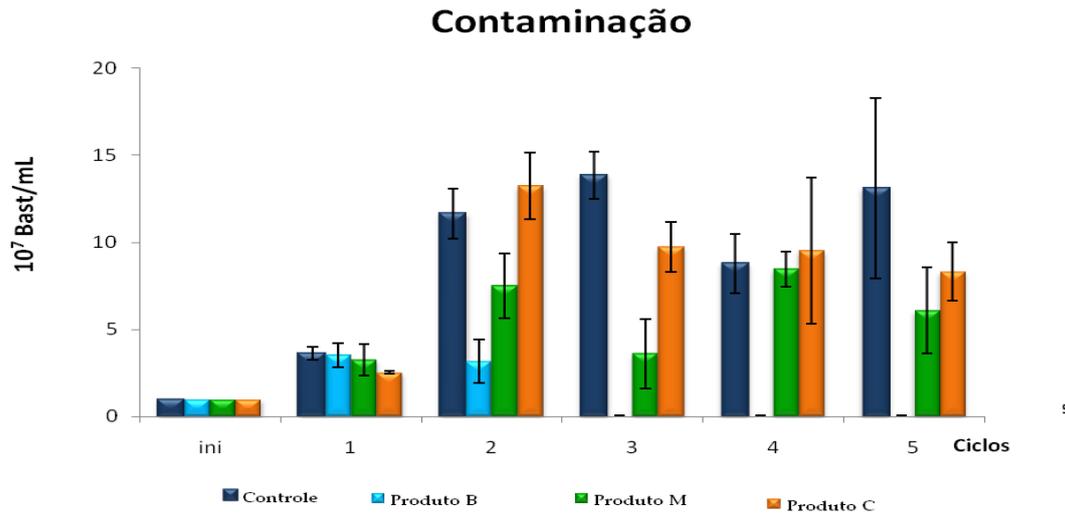
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste de sensibilidade houve diferenças entre os resultados obtidos entre os meios GLT e *Leuconostoc*, todavia, em ambos os meios, apenas o  $\beta$ -ácido apresentou uma eficácia estatisticamente considerável, o produto M e o produto C apresentaram uma leve queda no controle bacteriano que foi minimizada no decorrer das complexidades dos testes, pois, no teste de antimicrobiano, não houve diferença estatística entre o produto C e M a testemunha.

Quando se comparado à eficiência desses produtos no ensaio de fermentação em escala laboratorial o resultados obtidos torna-se mais reais, pois é possível determinar alguns parâmetros importantes encontrados nas usinas alcooleiras, como viabilidade celular da levedura,

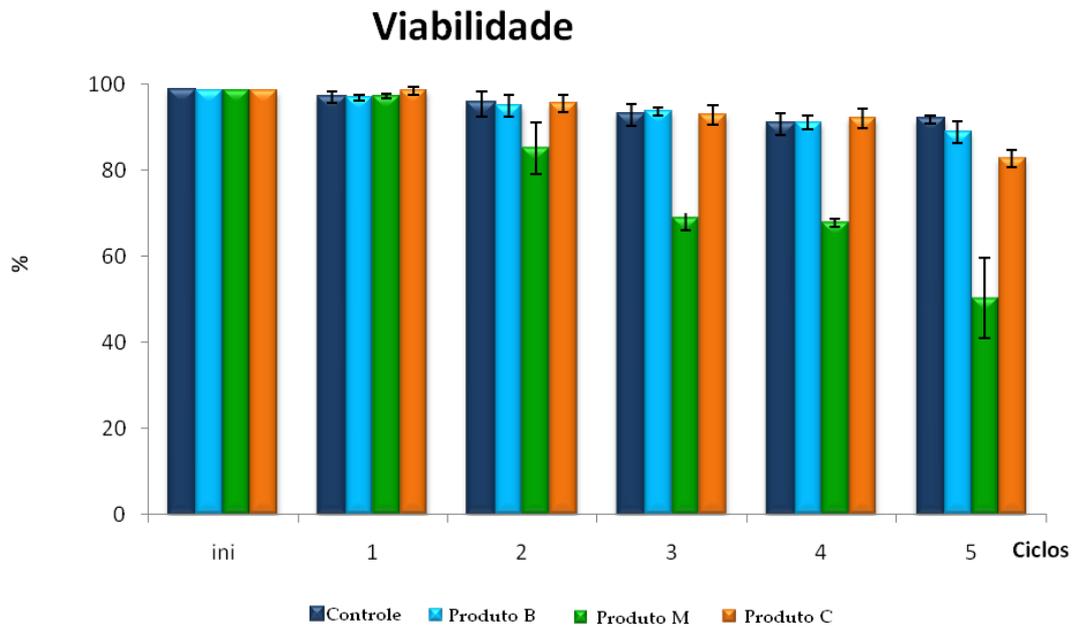
contaminação bacteriana e rendimento fermentativo, o que nessas condições apenas o produto B apresentou uma eficiência no controle das bactérias inoculadas.

Os resultados mostraram que o Produto B foi eficaz no controle bacteriano, inibindo-o em todos os ciclos da fermentação alcoólica em escala laboratorial, como mostra a figura 1. Enquanto que o Produto M apresentou uma leve queda da contaminação, quando comparado com o Controle, todavia, a diminuição da contaminação bacteriana foi menor ainda no Produto C.



**Figura 1:** Indicadores da contaminação alcoólica no decorrer dos cinco ciclos com os três produtos e com o controle.

Os produtos B e C não apresentaram quedas significativas no decorrer dos quatro ciclos. Apenas no quinto ciclo o Produto C apresentou uma pequena queda na viabilidade e o Produto B manteve-se constante, como mostra a figura 2.



**Figura 2:** Viabilidade celular das *Saccharomyces cerevisiae* no decorrer dos cinco ciclos com os três produtos e com o controle.

Contudo, o Produto M apresentou uma diminuição gradual da viabilidade celular das *Saccharomyces cerevisiae* no decorrer dos cinco ciclos, o que mostrou que esse produto, utilizado nessa dosagem, inibiu a viabilidade (figura 2), o que torna inviável a sua utilização no processo de fermentação, pois, com a viabilidade baixa, o teor de álcool diminui (figura 3), e consequentemente o rendimento fermentativo (figura 4) também cai, pois este é calculado a partir do CO<sub>2</sub> liberado pelas *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação alcoólica.

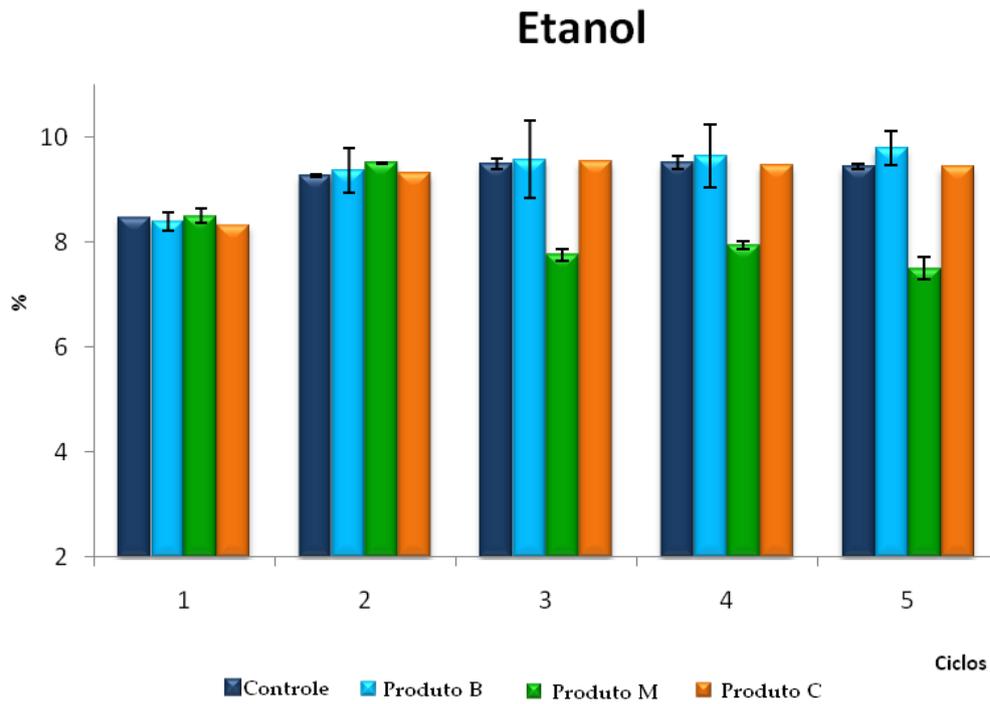


Figura 3: Etanol presente em cada ciclo com os três produtos e sem produto (controle).

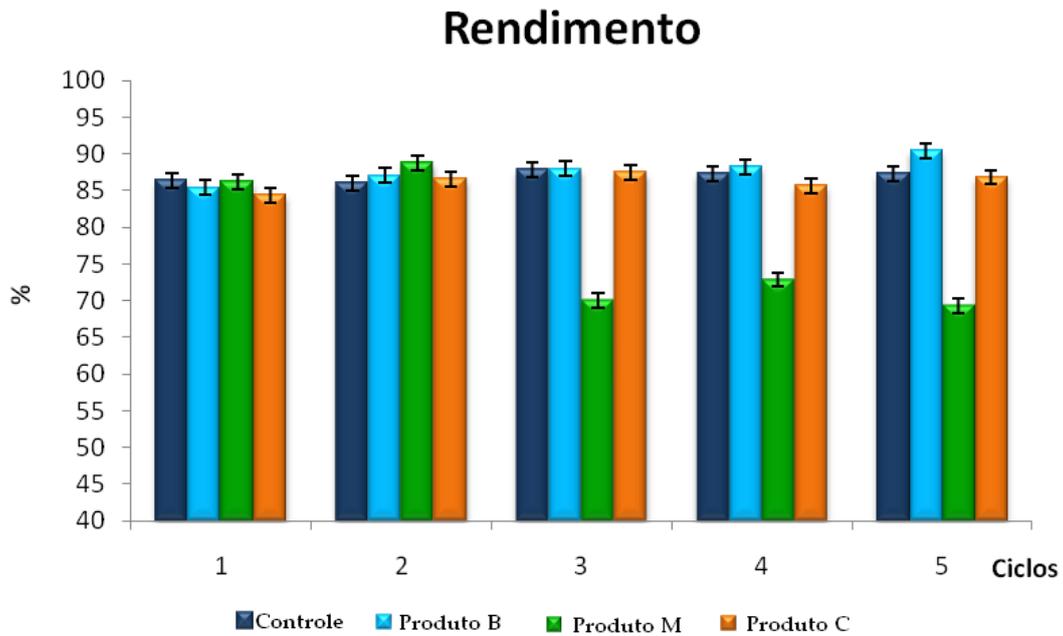


Figura 4: Rendimento fermentativo dos cinco ciclos com e sem produto (controle) detectado através da liberação de CO<sub>2</sub>.

## CONCLUSÃO

Portanto, pode-se concluir, que entre os produtos testados, o que apresentou eficácia durante o processo de fermentação alcoólica foi o Produto B, enquanto que o Produto C, não apresentou uma eficiência no controle bacteriano, quando utilizado sob essas condições e nessa dosagem, bem como o Produto M. Além desse apresentar uma característica fungicida, pois o Produto M apresentou uma queda na viabilidade celular das *Saccharomyces cerevisiae*, que são os agentes microbiológicos responsáveis pela fermentação alcoólica.

Todavia, o produto M, possui algumas características que ainda devem ser levedas em conta, porém é necessário que estudos futuros sejam realizados no intuito de diagnosticar as suas propriedades, possibilitando um maior conhecimento sobre tal e até mesmo podendo testá-lo novamente para este fim ou em outros casos.

## REFERÊNCIAS

- AMORIM, H. V.; OLIVEIRA A. J. *Infecção na fermentação: como evitá-la*. Açúcar e Álcool, v. 5, p. 12-18, 1982.
- AMORIM, H.V. *Controle microbiológico no processo de fermentação alcoólica*. Apostila Fermentec, p. 9-18. 2000.
- 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 “Julio 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, 13<sup>th</sup>, 1729-1734. 1968.
- FREITAS, Marcela. D., ROMANO, Flavia P. *Avaliação do controle bacteriano na fermentação alcoólica com antibióticos naturais*. Piracicaba, 2012, 70p. Trabalho de Conclusão de Curso (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.

**bioenergia em revista: diálogos, ano 4, n. 2, p. 109-119, jul./dez. 2014.**

FREITAS, Marcela Domingues; ROMANO, Flavia Piacentini

*Avaliação do controle bacteriano na fermentação alcoólica com produtos naturais*

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 Biosfera*, 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 “Julio de Mesquita Filho”.

SERRA, G. R. CEREDA, M. P., FERES, R. J. BERTOZO, M. T. VICENTE, A. T. Contaminação da fermentação alcoólica. Floculação do fermento. *Brasil Açucareiro*, v. 93, nº 6, p. 26-31. 1976.

TILBURY, R. H. *et 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. *Práticas de Microbiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

**bioenergia em revista: diálogos, ano 4, n. 2, p. 109-119, jul./dez. 2014.**

FREITAS, Marcela Domingues; ROMANO, Flavia Piacentini

*Avaliação do controle bacteriano na fermentação alcoólica com produtos naturais*

1 Marcela Domingues FREITAS é Engenheira Química no Grupo Exal. Possui também graduação em Tecnologia em Biocombustíveis pela FATEC Piracicaba (2012), com experiência em processos e projetos para Plantas Produtoras de Etanol. E-mail: mdfreitas9@gmail.com.

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.