



## **CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS NO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CACHAÇA E ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO MOSTO.**

*César Augusto Caramori Bisinotto<sup>1</sup>, José Waldir de Sousa Filho<sup>2</sup>*  
*<sup>1, 2</sup> Universidade de Uberaba (UNIUBE)*

*cesar\_bisinotto@outlook.com, josewaldir.engenharia@gmail.com*

### **Resumo**

A produção da cachaça no Brasil é uma importante fonte de renda para várias famílias, sua produção envolve várias etapas desde o campo até a destilaria, porém vários fatores devem ser observados para que o rendimento seja o máximo possível. O preparo do fermento é uma etapa fundamental, pois o tipo de levedura gerada influencia diretamente no rendimento do etanol no processo fermentativo. Outro fator que deve ser observado é a assepsia correta de todo o processo, evitando deste modo a proliferação de bactérias que irão competir com as leveduras no processo fermentativo, sendo deste modo outro agravante na produção, além de causar interferências no produto final desejado. Para verificar o nível de contaminação bacteriana e o tipo de levedura do processo foi realizado plaqueamento do mosto. Para a contagem de colônias de bactérias foi utilizada placa *Petrifilm* e para a contagem de colônias de levedura placa de *Petri*, a morfologia foi detectada através do uso da alça de platina. O plaqueamento demonstrou que o nível de infecção das dornas se apresenta estável, sendo necessário apenas manter acompanhamento e as leveduras presentes no processo apresentaram morfologia lisa, característica desejável no processo de produção de etanol. Logo através destes resultados pode-se evidenciar que as leveduras do processo apresentam boas características para a produção do etanol e que a contaminação das dornas se mantém em um nível estável.

**Palavras-chave:** Cachaça artesanal. Fermentação. Etanol.

### **1 Introdução**

A agroindústria de produção de etanol e aguardente representa uma importante parcela geradora de renda no país apresentando uma grande importância no aspecto econômico e social, sendo o Brasil pioneiro na produção de etanol como combustível alternativo a gasolina e o maior produtor de cachaça do mundo. (NOBRE, 2005).

Como o processo de produção ocorre por via fermentativa, é de suma importância o conhecimento do processo e dos microrganismos que o realizam. A fermentação etanólica ocorre por meio das leveduras, sendo o gênero *Saccharomyces* da linhagem *Saccharomyces cerevisiae* o que melhor se adaptou a produção do etanol em condições industriais. (STECHELBERG, 2001).

Em processos artesanais como o da produção de cachaça utiliza-se o fermento caipira, preparado a partir das leveduras que naturalmente acompanham o mosto. Elas são oriundas da lavoura de cana, do ar e dos equipamentos do processo, normalmente são denominadas leveduras selvagens e tem pequena tolerância ao álcool.

A infecção bacteriana no processo fermentativo pode causar vários danos ao processo como consumo de açúcar, formação de goma, floculação do fermento, inibição e queda da viabilidade das leveduras devido às toxinas e ácidos orgânicos excretados no meio, causando queda no rendimento da produtividade da fermentação. (SILVA, 2010).

Por meio deste trabalho visa-se demonstrar a importância do controle bacteriano nas

## 9º ENTEC – Encontro de Tecnologia: 23 a 28 de novembro de 2015

dornas e o tipo de levedura utilizada no processo.

Dessa forma este trabalho tem por objetivo caracterizar a levedura presente no processo e o índice de contaminação bacteriana nas dornas de fermentação.

### 2 Materiais e Métodos

As amostras do mosto fermentado foram coletadas em duas dornas de fermentação em um vidro de penicilina esterilizado e lacrado. O recipiente de coleta foi lavado com água e sabão e desinfetado com álcool etílico. Após seco realizou-se o ambiente no coletor e retirou-se a amostra que foi lacrada no vidro. As amostras depois de lacradas foram mantidas resfriadas e enviadas ao laboratório de análise.

O plaqueamento do mosto seguiu a metodologia aplicada segundo Fermentec (2014). Para o plaqueamento de bactérias a amostra foi colocada sob o meio de cultura, sendo realizado em placa *Petrifilm* onde pegou-se uma alíquota de 1 mL da amostra e realizou-se a diluição da mesma. Da última diluição uma amostra de 1 mL foi colocada na placa *Petrifilm* levando-a a uma estufa TECNAL BOD TE 390 a 35°C por 48 horas, após esse período contou-se as colônias formadas.

O plaqueamento de leveduras utilizou placa de *Petri*, utilizando neste caso o meio WL preparado segundo o rótulo do mesmo, ele foi colocado em autoclave durante 30 minutos a 120° C e colocado na placa de *Petri* para esfriar e endurecer.

A amostra foi colocada sobre o meio.

Pegou-se uma alíquota de 1 mL da amostra coletada e realizou as diluições necessárias, da última diluição uma amostra de 0,004 mL foi colocada sobre a placa de *Petri*, sendo necessário espalhar a amostra com uma lâmina esterilizada com álcool 70% e fogo de bico de Bunsen. Após colocou-se a placa em estufa TECNAL BOD TE 390 a 35° C por 48 horas e contou-se as colônias formadas. Com o auxílio de uma alça de platina contou-se as colônias lisas, rugosas e rígidas.

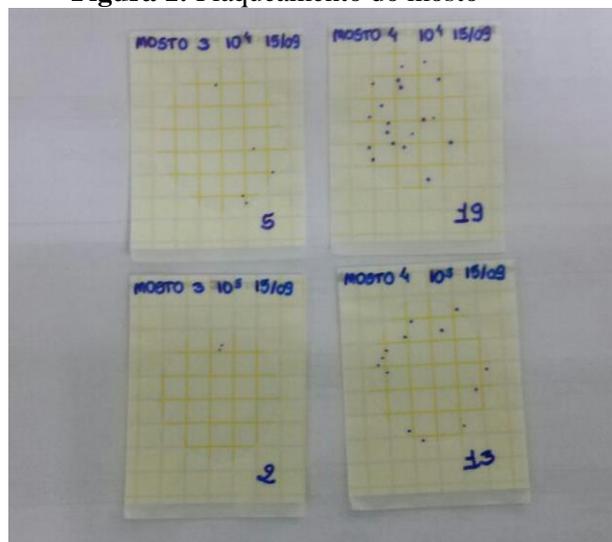
### 3 Resultados

A quantidade de bactérias foi avaliada através de plaqueamento em placas *Petrifilm* Figura 1, sendo realizadas duas diluições: 10<sup>4</sup> e 10<sup>5</sup>, os resultados encontrados podem ser avaliados na Tabela 1.

**Tabela 1** – Análise microbiológica do mosto  
**ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DO MOSTO**  
 (UFC/mL)

	MOSTO 3	MOSTO 4
Diluição 10 <sup>4</sup>	5	19
Diluição 10 <sup>5</sup>	2	13

**Figura 1:** Plaqueamento do mosto



O plaqueamento de leveduras Figura 2 apresentou um fator interessante no processo de produção de etanol. A linhagem utilizada no processo de fermentação é obtida a partir do próprio caldo da cana, fubá de milho e caldo de laranja ou limão denominado de fermento caipira. A análise feita nas colônias formadas indicou no mosto3 e no mosto 4 uma proporção maior de leveduras lisas não havendo formação de leveduras rugosas.

## 9º ENTEC – Encontro de Tecnologia: 23 a 28 de novembro de 2015

**Figura 2:** Plaqueamento das leveduras



### 4 Discussão

Em relação ao mosto fermentado foram analisados a quantidade de formação de colônias de bactérias e leveduras. Foram escolhidas duas dornas de fermentação para se realizar o estudo, os valores obtidos são de grande importância para o empreendimento uma vez que ao se elevar o nível de infecção das dornas há uma perda na produção de etanol, pois as bactérias consomem os açúcares que são a fonte de geração de etanol pelas leveduras. Os níveis de contaminação também podem influenciar na qualidade do produto final.

Não foi encontrado uma legislação que indique o grau de contaminação de mostos relacionado a UFC/mL (Unidades formadoras de colônias), porém em seu trabalho Alcarde et al., 2003 fala que nas usinas o nível de contaminação aceitável é de  $10^5$  UFC/mL, não sendo viável fazer tratamentos para reduzir este nível.

O nível de infecção nas dornas pode ser um fator determinante no resultado do pH do etanol gerado. Segundo Nobre (2010) o consumo de sacarose resultando em ácido acético ou láctico é um dos principais prejuízos causados pela contaminação bacteriana.

Segundo Oliva Neto e Yokoya (1994) o aumento da contaminação de  $1,2 \times 10^9$  Unidades formadoras de colônia (UFC)/mL para  $2,3 \times 10^9$  reduziu o teor alcoólico no vinho de 92% para 49% e elevou a acidez de 3,4 g/L para 6,2 g/L.

Através dos resultados obtidos pode-se notar que o índice de contaminação encontra-se em uma faixa estável, estando o mosto 4

com maior índice de contaminação bacteriana. Com esses resultados pondera-se que é necessário haver um melhor monitoramento no mosto, evitando assim o aumento do índice bacteriano e consequentemente uma menor perda de produtos finais e uma melhor qualidade.

Sobre o estudo da característica morfológica das colônias de leveduras obteve-se resultados de grande interesse uma vez que o tipo encontrado no processo propicia melhores rendimentos de etanol.

Segundo Basso; Amorim; Oliveira (1996) a formação de leveduras rugosas leva a um baixo potencial fermentativo, Ceccato-Antonini; Parazzi (1996) verificaram que uma proporção 1:1 de leveduras rugosas e não rugosas levaram a uma queda de rendimento de 10% no processo fermentativo e 18% na produção de álcool em uma destilaria em Jaú.

Trabalho realizado durante 3 safras seguidas sobre leveduras isoladas de 46 destilarias mostrou que 57% das colônias apresentavam bordas lisas e 43% bordas rugosas, sendo que todas as leveduras apresentando borda rugosa mostraram problemas na fermentação como espuma em excesso, floculação e sobra de açúcar no vinho (FERMENTEC, 2005).

### 5 Conclusão

Os níveis de infecção nas dornas se encontram estáveis, sendo necessário manter este controle, pois o aumento da infecção também pode gerar perdas na produção de cachaça e etanol e afetar o pH final do etanol. As leveduras presentes nas dornas apresentaram aspecto liso, o que indica uma espécie com melhores características para a produção do etanol.

### Referências

ALCARDE, A. R.; WALDER, J. M. M.; HORII, J. Fermentation of irradiated sugarcane must. *Scientia agrícola*, v. 60, n.4, p. 677-681, 2003.

## 9º ENTEC – Encontro de Tecnologia: 23 a 28 de novembro de 2015

BASSO, L. C; AMORIM, H. V;

OLIVEIRA, A. J. Leveduras selecionadas: permanência no processo industrial monitorada pela técnica de cariotipagem.

**Relatório Anual de Pesquisas em Fermentação Alcoólica**, Piracicaba, n.16, p. 1-51, 1996.

CECCATO-ANTONINI, S.R.; PARAZZI, C. Isolamento de levedura selvagem floculante e efeitos da contaminação em processo de fermentação etanólica contínua. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 6., Maceió, 1996. **Anais**. Maceió: STAB, 1996. p.23-29.

FERMENTEC NEWS. 02/2005. Disponível em: <<http://www.fermentec.com/br/news/Fermentec%20News%2002%20-%202005.pdf>>. Acesso em: 12 Nov. 2014.

NOBRE, Thais de Paula. **Viabilidade celular de saccharomyces cerevisiae cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica**. 2005. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

OLIVA-NETO, P; YOKOYA, F. Effects of nutritional factors on growth of lactobacillus fermentum mixed with Saccharomyces cerevisiae in alcoholic fermentation. **Revista de microbiologia**, V.28, P. 25-31, 1997.

STECKELBERG, Cláudia. **Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas**. 2001. 215 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Departamento de Desenvolvimento em Processos Biotecnológicos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

SILVA, Greice Kelly Cardoso da. **Avaliação da ação de diferentes antibióticos sobre o crescimento de microrganismos contaminantes do processo fermentativo para a obtenção do etanol**. 2010. 50 f. Monografia (Graduação) - Curso de Tecnologia em Biocombustíveis, Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, Araçatuba, 2010.