

Avaliação de antibióticos sintéticos e à base de lúpulo em dornas de fermentação industrial

Evaluation of synthetic antibiotics and hop extract in industrial fermentation reactors

Davi Gorla Montiel^{1,2}, Carlos Eduardo Crestani^{1*}

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo,
Campus Matão - Matão – SP

²Solenis Especialidades Químicas Ltda, Araraquara – SP

*cecrestani@ifsp.edu.br

Submetido em 17/04/2020; Versão revisada em 25/05/2020; Aceito em 08/06/2020

Resumo

O setor sucroenergético possui elevada preocupação com o controle da contaminação na fermentação alcoólica. A presença de bactérias pode causar prejuízos como desvio de açúcar fermentescível, queda da viabilidade das leveduras, floculação em excesso e conseqüentemente diminuição da produção de etanol. Este trabalho visou indicar o melhor antibiótico para o processo industrial de produção de etanol. Para isso antibióticos sintéticos foram submetidos ao teste de sensibilidade a antimicrobianos e o melhor antibiótico sintético foi testado no processo industrial juntamente com o extrato de lúpulo. A oxitetraciclina obteve o melhor resultado antimicrobiano e este princípio ativo, juntamente com o extrato de lúpulo se mostraram adequados para redução populacional bacteriana e redução da produção de ácido láctico na fermentação industrial. O presente trabalho apresentou um caminho para o rastreamento dos contaminantes e seus subprodutos na fermentação e propõe um tratamento que se mostrou adequado ao processo industrial.

Palavras-chave: Antibióticos; Ácido Láctico; Fermentação.

Abstract

The sugar-energy sector has been concerned with controlling contamination in alcoholic fermentation. In this sense, the presence of bacteria may cause losses to fermentation processes due to deviation of fermentable sugar, reduction of yeasts viability and excessive flocculation; which in turn drop ethanol production. Therefore, this work aimed to investigate the best antibiotic in industrial process of ethanol production. For this, several synthetic antibiotics were subjected to antimicrobial sensitivity test and one of them was selected to industrial scale performance test together with a hop extract. Oxytetracycline obtained the higher antimicrobial activity. Industry tests showed that oxytetracycline and hop extract are both suitable for reducing bacterial population and decreasing production of lactic acid, thus improving the yield in ethanol production. Therefore, this study presents a solution for monitoring contaminants and their by-products in fermentation and suggests a treatment that was appropriate for increase the ethanol production.

Keywords: Antibiotics; Lactic acid; Fermentation.

INTRODUÇÃO

A produção de etanol no Brasil é realizada majoritariamente por via fermentativa, na qual as leveduras, em geral a *Sacharomyces cerevisiae*, convertem o açúcar em etanol além de outros subprodutos. Eventualmente, podem existir bactérias nas dornas, estas consomem a glicose e frutose para produção de ácidos orgânicos, que são considerados substâncias indesejáveis para o processo fermentativo. O principal deles é o ácido láctico, o qual compromete a viabilidade das células de levedura, que não toleram sua presença, além de prejudicar o rendimento fermentativo (CUNHA et al., 2019). Segundo pesquisa de população microbiológica desenvolvida por Gallo (1989), para dornas de fermentação há uma predominância de 98,52% de bactérias do grupo Gram + sendo na sua maioria do gênero *Lactobacillus* (59,75%) e *Bacillus* (26,58%), que podem vir juntamente com a cana colhida no campo. Pode haver, portanto, a competição de microrganismos do processo (leveduras e bactérias contaminantes) pelo substrato a ser fermentado (glicose e frutose).

Segundo Tortora, Funke e Case (2012) durante o processo da glicólise, que está presente em todas as células vivas, a glicose é oxidada em duas moléculas de ácido pirúvico, gerando energia que é utilizada para formar duas moléculas de ATP. Nas leveduras as duas moléculas de ácido pirúvico são convertidas em duas moléculas de etanol, porém, caso haja contaminação por bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bacillus*, essas utilizarão as duas moléculas de NADH produzidas durante a glicólise para oxidar o ácido pirúvico, convertendo-o em duas moléculas de ácido láctico (Figura 1).

Dois gêneros comuns de bactérias do ácido láctico são os *Streptococcus* e os *Lactobacillus*. Como esses microrganismos só produzem ácido láctico, eles são denominados homoláticos ou homofermentativos. Os organismos que produzem ácido láctico junto com outros ácidos ou álcoois são classificados como heteroláticos ou heterofermentativos (TORTORA,

FUNKE e CASE, 2012). A presença desse subproduto é indesejável, não somente por ser produzido à custa desse açúcar que deveria ser convertido em etanol, mas afeta o rendimento fermentativo e compromete a viabilidade das células. A quantificação desse ácido é uma medida que está diretamente correlacionada com a população bacteriana ativa no processo (COSTA, 2006)

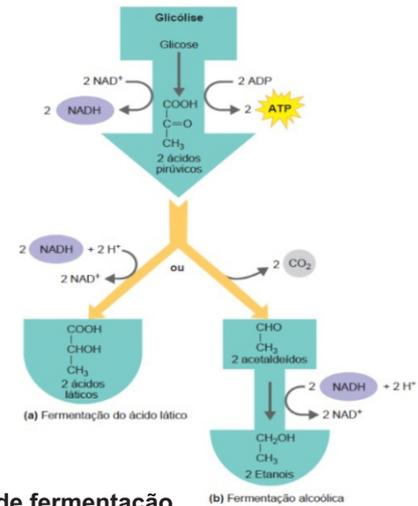


Figura 1 - Tipos de fermentação (TORTORA, FUNKE e CASE, 2012, p. 136)

Após a implementação do PROÁLCOOL, na década de 1970 e mais recentemente com a produção em larga escala dos veículos *flex fuel* e a busca por fontes renováveis de combustível, houve maior atenção das indústrias para a questão do controle de contaminantes da fermentação etanólica e consequentemente o seu rendimento fermentativo. Dentro do setor sucroenergético, o conhecimento de métodos de avaliação de contaminantes ainda é muito restrito à microscopia óptica que, no entanto, não se mostra eficaz, devido as bactérias contadas muitas vezes serem confundidas com partículas encontradas no próprio caldo. Já a contagem de células de leveduras mortas e vivas se mostra um importante instrumento aplicável para conhecer o brotamento e viabilidade celular das leveduras encontrada na fermentação (ROSALES, 1989). Estudos de novas tecnologias aplicados à indústria são escassos na literatura e o aumento de escala ainda é um desafio (CHAYNE et al., 2006).

Kelsall e Lyons (2003b) *apud* VENTURA, 2007 relacionaram a população de bactérias

contaminantes com perdas de rendimento da fermentação alcoólica (Tabela 1).

Tabela 1 - Relação estimada entre número de bactérias na fermentação etanólica e respectivas perdas equivalentes em etanol.

Bactérias viáveis (UFC/mL)	Perda de álcool (% v/v) ¹	Perda equivalente de álcool ² (litros)
10 ⁵	0,1 – 0,2	303.000
10 ⁶	0,2 – 0,4	848.000
10 ⁷	0,6 – 1,0	2.120.000
10 ⁸	0,9 – 1,2	2.544.000
10 ⁹	1,0 – 1,5	3.180.000

¹ Depende da linhagem da bactéria láctica.

² Perda máxima calculada com base em uma produção de 151.000 m³/ano.

As perdas de etanol estão diretamente ligadas a diversos fatores como consumo de açúcar pelos contaminantes, excesso de ácidos, liberação de substâncias tóxicas para levedura, consumo do álcool produzido, perdas do fermento nas centrífugas, floculação do fermento e emprego de biocidas no controle das infecções, podendo o rendimento fermentativo cair até 60% se houver produção de ácidos em concentração de 5 a 6 gramas de acidez por litro de vinho bruto, como é chamada cotidianamente a mistura mosto + fermento após a fermentação nas indústrias sucroenergéticas (AMORIM, BASSO E ALVES, 1996).

O método geralmente adotado pelas indústrias para o controle bacteriano no processo fermentativo é o tratamento com antibióticos sintéticos e orgânicos, sendo o primeiro o mais convencional e empregado no setor (CRUZ, 2019). A oxitetraciclina, por exemplo, atua em bactérias Gram-negativas e positivas, pois é um antibiótico de amplo espectro. Seu mecanismo de ação é no ribossomo, inibindo a síntese proteica e posterior inibição na replicação das bactérias penetrando através da membrana celular bacteriana. Já os antibióticos orgânicos são utilizados em indústrias que secam leveduras e as vendem como matéria prima para fábricas de rações animais e consumo humano por conter ácidos orgânicos em sua composição. Nestes casos, são utilizadas substâncias naturais extraídas de plantas como o lúpulo (flor), que se degradam por completo no processo, evitando

resíduos no produto final (levedura seca) (SILVA, 2010 *apud* PRADO, 2014).

Neste contexto, o presente trabalho objetivou comparar a eficiência dos antibióticos convencionais em relação aos antimicrobianos à base de lúpulo, em escala laboratorial utilizando o teste de sensibilidade seguindo metodologia Fermentec, e em escala industrial utilizando a metodologia de quantificação da taxa de ácido láctico produzida nas dornas e redução populacional bacteriana no vinho levedurado como critério comparativo de efetividade, visando indicar o melhor tratamento do controle da contaminação bacteriana na fermentação industrial.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no laboratório e no processo fermentativo de uma indústria sucroenergética do norte de Minas Gerais – MG.

Equipamentos e Reagentes

- Espectrofotômetro UV/Visível modelo DR5000 (Hach);
- Autoclave QIMIS 30 litros (Phoenix);
- Balança Analítica modelo AR2140 (Ohaus);
- Câmara de fluxo laminar PCR12 UV (Pachane);
- Estufa incubadora modelo TE -371 (BOD Tecnial);
- Agitador de Tubos (Ap.56);
- Petrifilm 3M;
- Contador de colônia CP600 Plus (Phoenix);
- Pipeta Automática 100 a 1000 µL
- Balão volumétrico 100 mL calibrado;
- Cubeta 10 mm;
- Solução estoque de actidiona;
- Mosto de alimentação;
- Vinho bruto (levedurado);
- Antimicrobianos sintéticos e a base de lúpulo;
- Papaína;
- Vidraria usual de laboratório;
- Analisador de L(+) lactato modelo Accutrend Plus Lactato (Roche - AG Alemanha) portátil e respectivos reagentes e acessórios.

- Microscópio Óptico Nikon Eclipse E200 POL
- Reagentes e corantes para contagem de células de leveduras e bastonetes

Teste de sensibilidade a antimicrobianos por espectrofotometria

Esta metodologia, desenvolvida pela empresa de consultoria Fermentec Ltda (FERMENTEC LTDA, 2006), tem como objetivo avaliar em laboratório, o efeito de antimicrobianos sobre bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. O teste consiste em avaliar a ação dos antimicrobianos, como antibióticos e outros compostos, através da leitura espectrofotométrica da densidade óptica (absorbância) de uma suspensão microbiana, incubada com ou sem o produto em teste. É uma metodologia que permite indicar o produto mais eficaz e/ou dosagem a ser empregada, dentro de um período relativamente curto (6 a 8 horas), o que torna a utilização dos antimicrobianos mais econômica e racional.

O preparo das soluções para o experimento foi realizado como descrito a seguir:

Meio de cultivo – mosto: Foi coletado o mosto na linha de alimentação das dornas com ART de 15,00 gramas de Açúcares Redutores Totais (ART) por 100 gramas de solução e 16,50°BRX e diluído com água destilada 2 vezes (106 mL de mosto/93,3 mL de água destilada) para 8,00 de ART e 9,00 de °BRX. Posteriormente, foram selecionados 6 tubos com tampa de rosca autoclavável e transferidos para cada um deles 15 mL da solução, esterilizado em autoclave por 15 minutos a 1 kgf/cm² de pressão a 121°C e armazenado em geladeira (Figura 2).



Figura 2 - Meio de cultivo esterilizado.

Solução estoque de actidiona: Foi pesado 0,1 g de actidiona, transferido para uma garrafa de diluição de leite, contendo 100 mL de água destilada esterilizada, homogeneizado até completa dissolução. A validade é de 30 dias, conservado sob refrigeração. A solução de actidiona tem por objetivo matar as células de levedura, mantendo apenas a cultura de bactérias.

Solução estoque de antimicrobianos: Foram utilizados em escala laboratorial cinco produtos comerciais de uso regular no mercado sucroenergético, de princípios ativos distintos, a saber: extrato de lúpulo; monensina líquida; oxitetraciclina; mix de penicilina + monensina e monensina pura 100% (Figura 3).



Figura 3 - Antimicrobianos de uso comercial: extrato de lúpulo (1); monensina líquida (2); oxitetraciclina (3); mix - penicilina + monensina (4) e monensina pura 100% (5).

Para realizar o preparo das soluções, foram pesados 0,1000g dos antimicrobianos líquidos e 0,0100 g dos antibióticos sólidos. Após pesagem, foram adicionadas 5 gotas de álcool etílico em cada uma das amostras para ativação das moléculas e melhor diluição dos produtos. Após a solubilização, o volume foi completado até 100 mL com água destilada esterilizada com o uso de um balão volumétrico calibrado, procedimento realizado para todas as amostras. A solução foi armazenada em geladeira durante 6 horas.

Preparo do inóculo: O inóculo foi preparado a partir de uma amostra de vinho bruto, homogeneizado e transferido 5,0 mL da amostra para um tubo de cultivo, adicionado papaína (5 mg) e homogeneizado em agitador de tubos. Aguardou-se 5 minutos para desflocular totalmente. Em seguida, foi transferido 1,0 mL da amostra de vinho bruto para tubo de ensaio

contendo 15 mL do meio de cultivo esterilizado (mosto), adicionado 0,15 mL da solução estoque de actidiona e incubado a 35°C por 12 horas.

Realização do teste: Após o tempo de incubação e preparo do inóculo, o teste foi realizado. Primeiramente, foi adicionada a papaína ao pré-inóculo e homogeneizado em agitador de tubos. Foi recomendado pelos fabricantes dos antibióticos a dosagem de 3 ppm para antibióticos em pó e de 30 ppm para antibióticos líquidos. Para os antibióticos em pó, as soluções estoque são preparadas com concentração de 100 ppm, já no caso dos antibióticos líquidos, as soluções estoque são preparadas com uma concentração de 1000 ppm. Portanto, em cada tubo de 15 mL do meio de cultivo devem ser adicionados 0,45 mL de solução estoque de antibiótico em pó para se obter a concentração de 3 ppm e 0,45 mL de solução estoque de antibiótico líquido para se obter 30 ppm.

Transferiu-se, então, com uma pipeta, 0,15 mL da solução estoque de actidiona para os 6 tubos contendo 15 mL do meio de cultivo (mosto) esterilizado. Foram transferidos com pipeta os volumes de antibiótico para cada tratamento e inoculado 0,15 mL do pré-inóculo já contendo papaína. Destaca-se a importância de inocular 2 tubos por vez e homogeneizar em agitador de tubos. Foi feita a leitura inicial da absorbância da amostra controle e dos tratamentos no aparelho de espectrofotômetro a 800 nm de comprimento de onda, logo após a homogeneização. Depois de realizada a leitura inicial, os tubos foram transferidos para estufa a 35°C e incubados por 6 horas. Após o tempo em estufa, foi realizada a leitura final da absorbância nos tubos testemunha e tratamento após agitação (Figura 4).

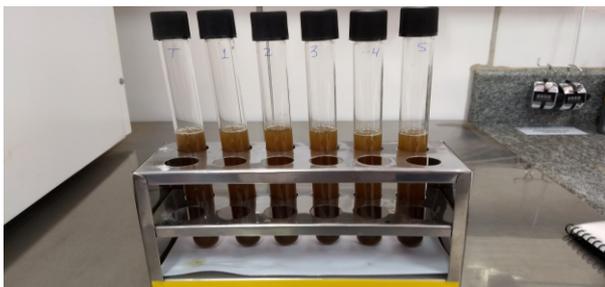


Figura 4 - Tubos testemunha e tratamentos com os respectivos antibióticos.

Após as leituras de absorbância os resultados são expressos pela diferença (ΔABS) entre a absorbância final (ABS_{final}) e a absorbância inicial ($ABS_{inicial}$). Assim tem-se, pela Equação 1:

$$(\Delta)ABS = (ABS_{final} - ABS_{inicial}) \times 100 \quad (1)$$

Quanto menor for a variação da absorbância, mais eficiente será o produto no controle da microbiota presente na amostra testada. Após calcular as variações de absorbância para todas as amostras os resultados são expressados em eficiência (%). Assim tem-se, segundo a Equação 2:

$$Eficiência = \frac{(\Delta ABS_{Testemunha} - \Delta ABS_{do\ produto}) \times 100}{\Delta ABS_{Testemunha}} \quad (2)$$

Experimentos no processo fermentativo industrial

O teste de performance de antibióticos sintéticos e a base de lúpulo em escala industrial foi realizado em uma fermentação batelada alimentada com tratamento do fermento em batelada. Os testes de performance dos antibióticos objetivaram comparar a eficiência do poder biocida de ambos produtos no controle de bactérias, queda de produção de ácido láctico e tempo de campanha após aplicação dos antimicrobianos, ou seja, por quantos dias os produtos mantiveram a infecção no processo fermentativo estável. O tratamento foi aplicado durante 1 ciclo fermentativo, o qual representa 5 pés-de-fermento ou uma rodada de aplicação para ambos produtos.

Com isso é possível avaliar comparativamente o poder biocida de dois antimicrobianos em escala industrial. Como parâmetros de desempenho, foram utilizados o melhor tempo de campanha, queda do teor de ácido láctico no vinho ao final da fermentação nas dornas tratadas e a contagem microscópica dos bastonetes do vinho antes e após a aplicação dos produtos em teste. Executou-se uma varredura em todas as dornas antes do tratamento com os antibióticos para servir de testemunha tanto para acidez láctica quanto para contagem microscópica

dos bastonetes.

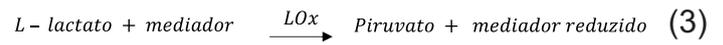
O processo fermentativo industrial estudado possui 3 cubas de tratamento de levedo de 300 m³ com um volume de trabalho de 125 m³, sendo o fermento tratado com água, ácido sulfúrico, antibióticos e dispersante para quebra da tensão superficial das bolhas geradas na fermentação. No total são 5 fermentadores de 700 m³ de capacidade e, nas condições em que o processo se encontrava, as dornas eram alimentadas com um volume de trabalho de 500 m³.

O primeiro teste foi realizado com o lúpulo, sendo calculada a dosagem de 10 ppm em relação ao volume de trabalho das dornas (500 m³), que representou 5 litros do antibiótico natural por pé de fermento, totalizando 25 litros do produto para o teste em 1 ciclo fermentativo. Antes e após a dosagem do bactericida foram quantificados os teores de ácido láctico e contagem bacteriana do vinho bruto das dornas.

Após 4 dias do tempo de campanha da dosagem do lúpulo e aumento da infecção do processo, foi aplicado o segundo teste com o princípio ativo Oxitetraciclina, sendo calculada a dosagem de 3 ppm sobre volume de trabalho das dornas (vinho bruto a ser fermentado), que representou 1,5 kg do produto por pé-de-fermento, totalizando 7,5 kg do produto para teste em 1 ciclo fermentativo. Antes e após a dosagem dos antibióticos foram quantificados os teores de ácido láctico e contagem bacteriana do vinho bruto das dornas

As leituras iniciais e finais das amostras foram feitas utilizando o lactímetro portátil da Roche, dotado de um fotômetro de reflexão e fitas reagentes descartáveis impregnadas com enzima imobilizada – Lactato oxidase. Para análise, a amostra é colocada sobre uma malha na superfície da fita que retém as células de levedura e a seguir permeia até uma camada de fibra de vidro contendo as enzimas imobilizadas e a zona de detecção. O lactato, em presença de um mediador é degradado a piruvato em 1 minuto através da enzima lactato oxidase, LOx,

conforme a Equação 3:



Após a leitura, os resultados são expressos em mmol/L nos quais são multiplicados por 90, o peso molecular do ácido láctico em mg/mmol, obtendo assim, resultados quantificados em mg/L de ácido láctico. Para melhor compreensão do nível de ácido láctico presente na fermentação alcoólica é realizada uma análise para quantificar o teor de ácido láctico que está sendo produzido durante o período de fermentação. Este método proporciona um monitoramento rápido e eficaz da atividade bacteriana, através de seu principal subproduto. Com esta ferramenta podem ser avaliadas as perdas no processo em diversos pontos e tomar medidas rápidas e eficientes. Para realização da análise é necessário um equipamento chamado lactímetro, uma micropipeta e fitas reagentes descartáveis impregnadas com enzima imobilizada lactato oxidase. Para uma fermentação saudável recomenda-se que a produção do isômero L do ácido láctico seja no máximo 1000 ppm, como pode ser observado na Tabela 2, com dados fornecido pela empresa Solenis (SOLENIS, 2017).

Tabela 2 - Parâmetros de ácido láctico na fermentação alcoólica

Contagem microscópica (bastonetes/mL)	Teor de ácido láctico mg/L	Condições da Fermentação
5×10^3 a 5×10^4	200 a 300	ótimo
5×10^5 a 5×10^6	301 a 500	Bom
6×10^6 a 5×10^7	501 a 1.300	Regular
6×10^7 a 9×10^7	1.301 a 1.900	Preocupante
$> 1 \times 10^8$	≥ 2.000	Ruim

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Teste de sensibilidade a antimicrobianos por espectrofotometria

Foi realizado o teste de sensibilidade para identificar qual o princípio ativo dos antibióticos é o mais adequado para o processo fermentativo da indústria. Após as leituras de absorbância, os valores de variação de absorbância e eficiência foram segundo as Equações 1 e 2. Quanto menor for a variação da absorbância, mais eficiente será

o produto, no controle da microbiota presente na amostra testada. A Tabela 3 apresenta os resultados de dosagens, absorvância inicial, absorvância final, cálculo da variação da absorvância e eficiência para melhor visualização e interpretação dos resultados obtidos de cada amostra para as seguintes condições experimentais:

Amostra: Antibióticos

Dosagem: 30 ppm para 1 e 2, 3 ppm para 3, 4 e 5

Período de incubação: 6 horas

Temperatura: 35,0°C +/- 0,5°C

Tabela 3 - Resultados leitura da densidade óptica.

Produto	Dosagem (ppm)	Absorvância Inicial	Absorvância Final	Δ Absorvância	Eficiência %
TESTEMUNHA	0	0,614	0,936	0,322	0
1	30	0,596	0,619	0,023	92,86
2	30	0,596	0,874	0,278	13,66
3	3	0,595	0,615	0,020	93,79
4	3	0,603	0,626	0,023	92,86
5	3	0,604	0,634	0,030	90,68

T – Testemunha; 1 – Extrato de Lúpulo; 2 – Monensina em emulsão; 3 – Oxitetraciclina; 4 – Monensina + Penicilina; 5 – Monensina 100%

Os resultados obtidos permitem classificar os antibióticos em ordem decrescente de eficiência, ou seja, melhor atividade antimicrobiana para os que se apresentaram com menor atividade: Oxitetraciclina, Extrato de lúpulo, Monensina sódica cristalina + penicilina, Monensina sódica cristalina e Monensina Sódica em emulsão.

O testemunho, em sua hora inicial teve uma leitura óptica de 0,614 de absorvâncias e 0,936 de absorvância em sua hora final, podendo, assim, ser demonstrado que nesta amostra havia uma grande quantidade de bactérias que cresceram dentro deste período.

O princípio ativo oxitetraciclina que representa a amostra 3, segundo Pelczar Jr., Chan e Krieg (1997), são bacteriostáticos, mas são considerados pelo fabricante como bactericida, como não contêm informações adicionais da composição do antibiótico, não se pode afirmar que sua função é bacteriostática, pois pode ser que tenham compostos que fazem que sua eficiência seja bactericida. Considerando este

padrão, o princípio ativo oxitetraciclina obteve maior eficiência (Gráfico 1) e menor variação da absorvância 0,023 ABS, devido ser um antimicrobiano de amplo espectro, conseguiu atuar em bactérias Gram-negativas e positivas, já os demais possuem maior poder de ação em bactérias Gram-positivas, de acordo com seus mecanismos de ação nas células procariotas.

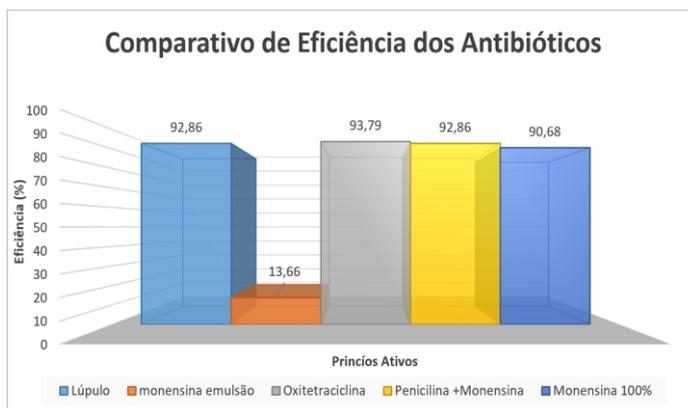


Gráfico 1 - Comparativo de eficiência dos antibióticos por espectrofotometria.

As amostras 1, 3, 4 e 5 obtiveram valores bem próximos em relação a variação da absorvância na leitura da densidade óptica por espectrofotometria, demonstrando assim que os demais princípios ativos testados possuem boa eficiência do controle bacteriano da fermentação em estudo, podendo também ser utilizados para estes fins de acordo com o custo-benefício de cada um para a indústria. A amostra 2 que possui a monensina sódica em emulsão como princípio ativo, foi a única que apresentou resultado não satisfatório para o processo fermentativo, não apresentando sensibilidade para a molécula em emulsão. Quanto maior o inóculo bacteriano na fermentação, menor é a sensibilidade das bactérias aos antimicrobianos. Após a realização do Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA) foram selecionados os antimicrobianos que apresentaram melhor desempenho para teste em planta, extrato de lúpulo e oxitetraciclina para via de efeito comparativo.

A realização do TSA, além de orientar a escolha da terapia antimicrobiana mais adequada, representa uma importante ferramenta no monitoramento

da evolução da resistência bacteriana e age também como um método auxiliar na implantação de medidas de controle que evitem a disseminação de bactérias multirresistentes. Esta escolha é feita, normalmente, com base nos melhores resultados obtidos pelo TSA, mas devem levar em consideração outros fatores como, por exemplo, o tipo de infecção presente na fermentação, o custo do tratamento e se as quantidades serão corretas para que o cronograma de tratamento seja efetivo. Ao analisar a ocorrência deste tipo de infecção, é conveniente observar e pesquisar o porquê da ocorrência no processo fermentativo. Algumas razões podem ser levadas em consideração, como o uso incorreto, as dosagens de um mesmo princípio ativo no decorrer da safra devido a má gestão do tratamento, facilitando, assim, com que as bactérias adquiram resistência, entre outras. Portanto, como melhoria para o processo industrial, sugere-se a inclusão do TSA na rotina diária do microbiologista, visto que, a realidade do cotidiano de uma indústria é variável e os resultados apresentados por este tipo de estudo possibilitam a indústria identificar problemas e tomar medidas rápidas e eficazes para o controle bacteriano e rendimento fermentativo.

Experimentos no processo fermentativo industrial

Segundo Lima et al., (2001), o ácido lático foi o primeiro ácido orgânico a ser fabricado industrialmente por fermentações, diversas pesquisas sobre suas propriedades estruturais (química e física) definiram suas aplicações. Ainda, segundo o mesmo autor, os agentes antimicrobianos atuam sobre os microrganismos de diferentes maneiras, provocando a morte ou simplesmente a inibição das células. As Tabelas 4 e 5 apresentam os resultados da quantificação do ácido lático nas dornas de fermentação industrial. Os valores apresentados são a média dos resultados obtidos, visto que todas as análises foram realizadas em triplicata.

Os resultados expressados nas Tabelas 4 e 5 demonstram o parâmetro de monitoramento do teor de ácido lático presente na fermentação, com base na

quantificação em ppm (ou mg/L). Pode-se afirmar que ambos produtos tiveram eficiência na redução da acidez lática. Após o tratamento com os produtos e acompanhamento em campo, nota-se que as condições em que fermentação se encontra podem ser classificadas em um nível de regular a preocupante, ante a classificação como ruim do processo original.

Tabela 4 - Quantificação de ácido lático em vinho de fermentação etanólica, antes e após ciclo de tratamento com antibiótico a base de lúpulo com 10 ppm.

Dornas	Testemunha		Tratamento		Redução teor ácido lático %
	Dosagem (mg/L)	Ácido lático (mg/L)	Dosagem (mg/L)	Ácido lático (mg/L)	
1	0	3.230	10	1.695	47,5
2	0	2.430	10	1.800	26,0
3	0	2.895	10	1.224	57,7
4	0	3.230	10	1.980	38,7
5	0	3.230	10	2.000	38,1
Média	0	3.003	10	1.740	42,0

Tabela 5 - Quantificação de ácido lático em vinho de fermentação etanólica, antes e após ciclo de tratamento com antibiótico a base de Oxitetraciclina com 3 ppm.

Dornas	Testemunha		Tratamento		Redução teor ácido lático %
	Dosagem (mg/L)	Ácido lático (mg/L)	Dosagem (mg/L)	Ácido lático (mg/L)	
1	0	2.430	3	1.800	35,0
2	0	2.700	3	2.053	31,5
3	0	3.240	3	2.400	35,0
4	0	2.520	3	1.800	40,0
5	0	3.230	3	2.000	61,5
Média	0	2.824	3	2.011	40,4

Tal resultado está diretamente correlacionado com a elevada taxa populacional bacteriana (cels/mL) presente e ativa no processo, floculação do fermento e que tem como consequência direta queda da produção de etanol. O Gráfico 2 apresenta um comparativo do teor de ácido lático antes e após a aplicação de um antimicrobiano a base de lúpulo. No Gráfico 3, a mesma comparação é feita para um antimicrobiano a base de oxitetraciclina.

Como as duas dornas analisadas são alimentadas pelo mesmo mosto, este ensaio desprezou a análise de ácido lático presente no mosto. Considerando-se que o ácido lático foi medido ao final da fermentação, não sendo subtraído o que foi introduzido no processo via mosto e levedo tratado, pode-se concluir que os produtos minimizaram

significativamente as perdas provocadas pelas bactérias contaminantes da fermentação. As condições do mosto de alimentação ao entrar nos reatores de fermentação apresentaram um grande foco de recontaminação das dornas.

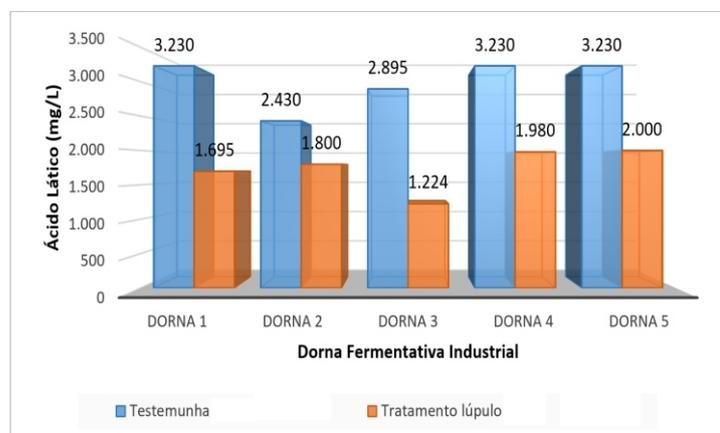


Gráfico 2 - Redução do teor de ácido láctico após aplicação de um antimicrobiano a base de lúpulo em fermentação etanólica.

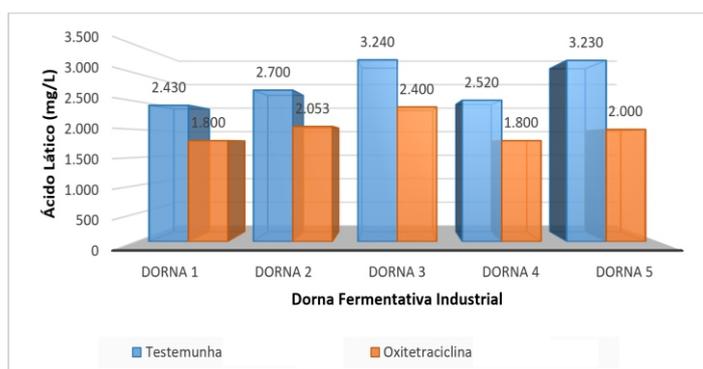


Gráfico 3 - Comparativo da redução do teor de ácido láctico após aplicação de um antimicrobiano a base de oxitetraciclina em fermentação etanólica

A quantificação do ácido láctico possibilita um importante parâmetro de monitoramento e diagnósticos rápidos da contaminação láctica no processo, facilitando tomada de medidas corretivas mais rápidas e eficazes de acordo com a realidade da indústria. A presença de ácido láctico no caldo durante a etapa de processamento pode indicar focos de contaminação em equipamentos e respectivas perdas de açúcar. A queda da produção de ácido láctico reflete em maior rendimento fermentativo, possibilitando a conversão de moléculas de sacarose em etanol, as

quais, antes, estavam sendo desviadas para produção deste composto orgânico que se mostra prejudicial para o processo.

Os ensaios de microscopia do vinho levedurado, antes e após o tempo de fermentação foram realizados com o auxílio do laboratório de microbiologia da indústria, o qual deu todo o suporte e realizou os comparativos para acompanhamento do resultado após a aplicação dos antibióticos. Foram utilizadas as mesmas amostras tanto para quantificação do ácido láctico quanto para contagem dos bastonetes. Os resultados de redução populacional bacteriana do tratamento com o lúpulo mostrou excelência, reduzindo aproximadamente 1 potência na contagem microscópica (Gráfico 4) dos bastonetes, os quais representam o índice de infecção na fermentação etanólica.

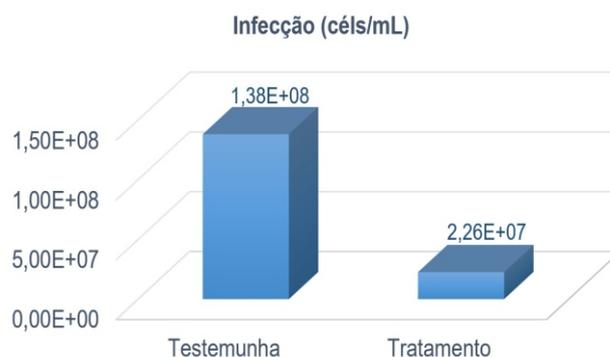


Gráfico 4 - Microscopia em vinho bruto antes e após tratamento com lúpulo em fermentação etanólica

De acordo com o Gráfico 4, o poder biocida dos alfa ácidos do lúpulo reduziram drasticamente a população de bactérias presentes no processo, trazendo benefícios em rendimento de etanol, aumento da viabilidade celular, ou seja, o fermento ficou mais "saudável", redução da floculação do vinho em 50% otimizando a centrifugação do fermento, além de reduzir em todo o ciclo fermentativo 42% do teor de ácido láctico produzido por fermentações secundárias que ocorrem ao longo da bioconversão da sacarose em etanol, alterando a classificação do processo industrial de ruim, inicialmente, para regular com o tratamento. O Gráfico 5 apresenta os resultados de

população bacteriana para o tratamento com oxitetraciclina:

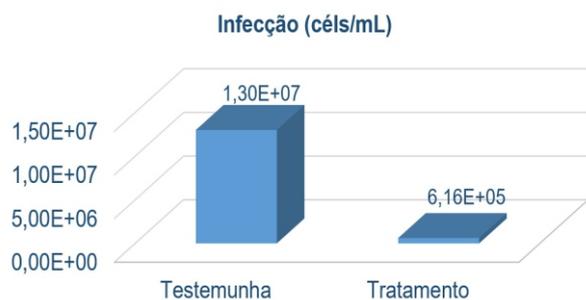


Gráfico 5 - Microscopia em vinho bruto antes e após tratamento com oxitetraciclina em fermentação etanólica

Os resultados de contagem de células apresentados mostram que a oxitetraciclina ocasionou uma alteração na classificação do processo industrial de preocupante, originalmente, para bom, após o tratamento. A taxa de redução populacional bacteriana expressadas nos Gráficos 4 e 5, aponta que o tratamento com antimicrobiano a base de oxitetraciclina obteve melhor resultado em comparação com o antimicrobiano a base de lúpulo, além de melhor tempo de campanha tendo apresentado 5 dias com a contaminação com a contagem abaixo de 10^6 células/mL. O emprego do antimicrobiano natural a base de lúpulo mostrou eficiência no controle de contaminantes da fermentação, inibindo a produção de ácido lático, principal subproduto das bactérias. Obteve-se uma viabilidade celular satisfatória com o uso do lúpulo, além de desflocular o fermento e não causar efeito bacteriostático por manter a fermentação no nível de contaminação estável no período avaliado. Vale ressaltar que o agente antimicrobiano a base de lúpulo foi dosado em dose de apenas 10 ppm do produto, fator que demonstrou economia na aplicação, sendo estipulado a quantidade mínima exigida pelo fabricante (10 ppm) em controprova do TSA que foi realizado com 30 ppm. Como conclusão geral, nota-se uma expressiva na qualidade do processo com apenas um estudo sobre o mesmo, mostrando ainda um campo para melhoria dos resultados.

Antibacterianos específicos são eficazes contra as bactérias lácticas, porém podem causar efeito

bacteriostático, ou seja, deixando de produzir ácido lático e apenas inibindo o crescimento bacteriano por um curto período de tempo, caso não seja aplicado em concentrações ideais referente ao processo, o produto pode não apresentar eficácia, devido não estar sendo dosado a quantidade ideal. A microscopia revela a redução populacional bacteriana após o tratamento com os antibióticos. Portanto, os resultados confirmaram que os antibióticos têm ação no controle da contaminação bacteriana garantindo maior rentabilidade na fermentação alcoólica.

CONCLUSÕES

Foram realizados Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA) em laboratório e posterior aplicação em escala industrial. Os melhores resultados foram obtidos com compostos do princípio oxitetraciclina, com eficiência de 93,89% no teste de sensibilidade, além da redução de 40% em média, da produção de ácido lático presente na fermentação. Por outro lado, o antibiótico a base de lúpulo resultou em taxas próximas de eficiência (92,86%), sendo os dois antibióticos escolhidos para serem testados em escala industrial. Este teste mostrou que ambos os antibióticos resultaram em melhorias no processo industrial tanto no que diz respeito às taxas de ácido lático nas dornas de fermentação, quanto à redução populacional bacteriana, mantida pelo período estudado de 5 dias, melhorando com um estudo apenas a classificação do processo de preocupante/ruim para bom/regular, havendo ainda um campo para melhorias no processo, mas mostrando o possível impacto que do estudo apresentado para processos industriais. O extrato de lúpulo é, portanto, um forte aliado ao controle bacteriano e inibição de BAL (Bactérias Ácido-Láticas) podendo ser utilizado em substituição à oxitetraciclina.

A análise das dornas de fermentação utilizadas para o estudo mostrou que, mesmo dornas que operavam normalmente antes de serem escolhidas

para realização dos experimentos, apresentavam altos teores de infecção e, com isso, espaço para melhoria do processo em termos de eficiência em conversão de açúcar em etanol. Portanto, a quantificação do ácido láctico pode ser adotada como método rápido e confiável no monitoramento da fermentação etanólica, bem como na avaliação dos tratamentos antibacterianos. Os resultados mostraram que o nível de contaminação bacteriana e a produção de ácido láctico são fatores diretamente ligados, e que interferem na queda do rendimento da fermentação.

Em processos industriais, quando a contaminação bacteriana está baixa (na faixa de 10^5 bastonetes/mL) a produção de ácido láctico também é baixa e desta forma não é economicamente viável utilizar antibiótico. A utilização do antibiótico só será viável quando o grau de contaminação bacteriana alcançar 10^7 bastonetes/mL, garantindo o retorno econômico às indústrias. O presente trabalho apresenta um caminho para o rastreamento dos contaminantes e seus subprodutos na fermentação etanólica e propõe um tratamento que se mostrou adequado e controlado da fermentação etanólica industrial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, H. V. De; BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G. **Processos de produção de álcool e monitoramento**. Piracicaba, Centro de Biotecnologia Agrícola, 103 p. 1996.
- CHAYNE, D. et al. Managing high density commercial scale fermentations. **J. Appl. Microbiol.**, v. 100, p. 689–698, 2006.
- COSTA, V. M. **Perfil de metabólitos excretados por Lactobacillus isolados de processo industriais de produção de etanol, com ênfase nos isômeros óticos D(-) e L(+) do ácido láctico**. Piracicaba, 2006. 64 p. Dissertação (Mestre em Ciências) – Ciências e Tecnologia de Alimentos, Piracicaba, 2006.
- CRUZ, M. L., 2019. **Avaliação de condições operacionais na fermentação alcoólica VHG empregando diferentes cepas de Saccharomyces cerevisiae**. Uberlândia, 2019. 119 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Uberlândia, 2019.
- CUNHA, L. R. R. et al. Monitoramento da viabilidade e contaminação bacteriana de um fermento de levedo industrial. **Braz. J. of Develop.**, Curitiba, v. 5, n. 12, p. 28582-28593, dec. 2019.
- FERMENTEC LTDA. **Controle Microbiológico Por Microscopia e Plaqueamento**. Apostila de Roteiro para treinamento de analistas de laboratório de usinas sucroalcooleiras, Piracicaba, 2006.
- GALLO, C.R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica**. 338 p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia de Alimentos/Unicamp), Campinas, 1989.
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**, v. 3. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda, 2001.
- PELCZAR Jr., M. J.; CHAN, E.C.S; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 576 p. v. 1, 1997.
- PRADO, J.L. **Uso de antibióticos convencionais e antibiobios a base de lúpulo no controle da infecção bacteriana em fermentação alcoólica**. 2014. 55 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.
- ROSALES, S. Y. R. **Contaminantes bacterianos da fermentação etanólica: Isolamento em meios diferenciais, identificação e avaliação de desinfetantes**. 1989. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1989.
- SOLENIS QUÍMICAS DO BRASIL - LTDA. **Determinação do nível de contaminação através do Accutrend Lactate da Roche**. [mensagem pessoal] Mensagem recebida por lcaparros@solenis.com em 30 de maio, 2017.
- TORTORA, G. R.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 967p. 2012.
- VENTURA, R. **Quantificação do ácido láctico na fermentação etanólica como parâmetro de monitoramento do processo**. 2007. 97 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.