

Microbiota Láctica no Processamento de Cachaça

Roberta Magalhães Dias Cardozo¹; José Francisco Pereira Martins¹; Adalcino França Jr.³.
DTA-UFRuralRJ¹; EAFSalinas-MG² roberta_cardozo@yahoo.com.br

Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos
Instituição Fomentadora: CNPq

Introdução

Apesar da importância econômica e de geração de empregos da aguardente de cana brasileira, ainda são escassos os estudos sobre sua qualidade. No entanto, as crescentes exigências do mercado, principalmente no que diz respeito à exportação, tem feito crescer a preocupação com a qualidade dessa bebida. É sabido que a higienização é um ponto crítico frequentemente negligenciado, ou tratado de forma inadequada, nas agroindústrias de destilados. É necessário, ainda, salientar ser escassa a informação acerca da microbiota bacteriana de importância no processamento. De outros destilados, como uísque e conhaque, sabe-se que a microbiota contaminante pode impactar positiva ou negativamente o "bouquet" da bebida (FUNEL, 1999; PRIEST, 2004; SIMPSON et alli, 2001; VAN BEEK e PRIEST, 2002). Isto sugere a possibilidade de bactérias contaminantes, e seus metabólitos, afetarem a qualidade da cachaça. A cachaça é obtida pela destilação do vinho de cana, produzida tanto em alambique como em colunas industriais. A escala de produção varia da artesanal, em pequenas propriedades rurais, a grandes indústrias. Produzida em pequena ou grande escala, a cachaça pode ter suas qualidades química e sensorial reduzidas, devido à presença de microrganismos contaminantes que se instalam ao longo do processo de produção. A contaminação bacteriana é um fator que deveria preocupar o produtor. Além de contribuir para a redução do rendimento alcoólico no processo fermentativo, as bactérias são responsáveis pela produção de substâncias como ácidos (acético, láctico e outros) que interferem no sabor e aroma da cachaça, além de contribuir para a síntese de compostos causadores da chamada "ressaca", compostos estes dificilmente eliminados durante o processo de destilação. É importante que as bactérias contaminantes sejam controladas não somente para garantir a conversão dos açúcares em álcool, mas, sobretudo, almejando uma bebida de qualidade (BREGAGNOLI, 2006). A presença de microrganismos no processamento de cana-de-açúcar ocorre desde a lavoura até o setor de fermentação. Tanto o caldo de cana quanto o mosto são ótimos substratos para o crescimento de microrganismos, inclusive bactérias, devido ao conteúdo em nutrientes orgânicos e inorgânicos, atividade de água e pH favoráveis, além das temperaturas normalmente praticadas nos processos industriais de fermentação (CHERUBIN, 2003). Os maiores prejuízos causados pela contaminação bacteriana, são a degradação da sacarose e o acúmulo de ácidos láctico e acético, que ocasiona perda de açúcar fermentescível e intoxicação das leveduras. Uma alta contaminação inicial amplia o risco de inibição da levedura pelo crescimento bacteriano, reduzindo a produção de álcool, e consequente perda na eficiência da destilaria. O estímulo ao desenvolvimento de bactérias, como *Lactobacillus*, se deve a metabólitos das leveduras, tais como adenina, guanina, ácido aspártico, niacina, triptofano, glicina, alanina e lisina. Esta liberação de componentes estimuladores do crescimento pode ser resultado, também, além da atividade metabólica, da autólise das células de leveduras, já que este desenvolvimento bacteriano é favorecido nos estágios finais do ciclo fermentativo (BREGAGNOLI, 2006). A acidez volátil elevada é geralmente atribuída a más condições higiênicas, que acarreta a contaminação por bactérias acéticas e lácticas. Tempo e condições de estocagem da cana, da colheita à moagem, são fatores importantes para esta acidez. Por isso a cana cortada deve ser mantida ao abrigo do sol, e moída no prazo de 12 horas (MAIA e CAMPELO, 2005). É possível reduzir as perdas de sacarose, resultantes do desenvolvimento de microrganismos contaminantes, em 17-35% somente com a aplicação de práticas adequadas de limpeza e uso correto de agentes antimicrobianos (CHERUBIN, 2003). Segundo este pesquisador, não há variedades de cana

que sejam específicas à produção de aguardente. As variedades de cana devem ser adaptadas às condições edafoclimáticas da região onde se encontra instalada a unidade industrial, com a finalidade de apresentar elevada produtividade de açúcar por área. É de se esperar, no entanto, que as condições de produção impactem a composição da cana e que isto se traduza em pressões seletivas no crescimento de contaminantes. Outro problema causado pela presença de bactérias contaminantes no processo de fermentação alcoólica é a floculação, que ocasiona redução na velocidade de fermentação, além de inconvenientes como redução na vazão de tubulações, aumento de fundo de dorna e dificuldades de operação das centrífugas devido à obstrução dos blocos (CHERUBIN, 2003). Ainda constata-se que, além da possível contaminação da matéria-prima proveniente do campo, as condições peculiares das etapas de processo de cada indústria selecionam determinadas espécies, ou linhagens de microorganismos que são favorecidos por tais condições e que não são problemas em outras destilarias. Na produção de etanol, microorganismos contaminantes podem sobreviver ao tratamento térmico do caldo, resultando na contaminação do mosto desde a saída do decantador, incluindo trocadores de calor, e chegando às dornas de fermentação, onde há um aumento expressivo da população bacteriana (CHERUBIN, 2003). Não foram encontradas na literatura, informações sobre o possível impacto, na qualidade da cachaça, dos metabólitos resultantes do crescimento de bactérias lácticas na fase fermentativa do processo. No entanto, informações do estudo de outros destilados, como uísque e conhaque, mostram a detecção da presença de bactérias lácticas e o efeito de vários dos metabólitos acumulados (FUNEL, 1999; PRIEST, 2004; SIMPSON et alli, 2001; VAN BEEK e PRIEST, 2002). Bactérias lácticas são microorganismos Gram +, fermentativos estritos, ou seja, não possuem aceptor exógeno de elétrons para o processo respiratório. A energia é obtida por processo fermentativo. Produzem lactato (homofermentativas) ou lactato + acetato + CO₂ (heterofermentativas) a partir do catabolismo da glicose; e, conseqüentemente, não exigem O₂ para crescimento. São, ainda, capazes de crescer em ampla faixa de pH (3,5 a 6,0). Em mosto de destilarias (uísque e conhaque) os microorganismos lácticos mais comumente encontrados tem sido *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. pentosus*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. ferintoshensis* e *Leuconostoc oenos* (FUNEL, 1999; PRIEST, 2004). Em bebidas fermentadas, bactérias lácticas podem apresentar um crescimento expressivo, que pode ter efeito positivo (como no caso da fermentação maloláctica em vinhos e na produção de componentes de aroma importantes no conhaque e no uísque) ou deteriorante. Bactérias lácticas estão presentes em grande número no malte fermentado para produção de uísque. Muitas podem sobreviver ao processamento térmico do malte, colonizando-o bem como as tubulações e equipamentos. Assim, tanto no caso do conhaque, como do uísque, é ideal presença controlada destas bactérias no estágio fermentativo. Na fermentação do malte, após 36h a levedura entra em curva decrescente de crescimento e a contaminação bacteriana floresce, crescendo às expensas do material de autólise da levedura (malto-oligosacarídeos e pentoses). Este crescimento durante o restante das 80h de processo, antes da destilação, é importante para a acumulação de compostos de aroma que irão conferir qualidades diferenciadas ao produto destilado (FUNEL, 1999; PRIEST, 2004; SIMPSON et alli, 2001; VAN BEEK e PRIEST, 2002).

Objetivo

O presente trabalho tem como objetivo determinar a ocorrência e crescimento de bactérias lácticas na fermentação do mosto de cana, quantificando e identificando a microbiota bacteriana contaminante, conhecimento este fundamental para assegurar a qualidade na produção da cachaça.

Materiais e Métodos

Os ensaios foram realizados no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Nestes ensaios utilizou-se amostras de caldo de cana coletadas no comércio local, transportadas e mantidas sob refrigeração. Os inóculos utilizados foram culturas de leveduras selvagens denominadas *Saccharomyces spp* EAF-1007 e *Saccharomyces spp* EAF-2097 recebidas da Escola Agrotécnica Federal de Salinas – MG, mantidas em laboratório da UFRuralRJ. As culturas foram reativadas, por repicagens

sucessivas em Agar Batata Dextrose, inclinado. A incubação foi a 30°C por 24h. Após reativação, as culturas foram mantidas sob refrigeração. Das culturas reativadas foram obtidas, por repicagem, as culturas de trabalho, para o preparo do pé de cuba. A cada ensaio foi feita nova reativação, sendo a cultura de trabalho anterior descartada. O caldo de cana teve o Brix ajustado para 14° e autoclavado. Após inoculação da levedura, o caldo foi incubado a 30°C/24 h. Este foi utilizado como pé-de-cuba (i). Outro lote do caldo de cana ajustado a 14° (ii) foi adicionado de 3% do pé-de-cuba (i) e incubado a 30°C/48 h. Em seqüência, foi feito plaqueamento em profundidade ("pour plate") em MRS-Agar + actidiona. O plaqueamento foi realizado no início da fermentação, e após 24h e 48h. Igual intervalo foi observado para a determinação potenciométrica do pH, e refratométrica de sólidos solúveis. Após estas etapas fez-se o isolamento e identificação da microbiota contaminante segundo HARRIGAN (1998).

Resultados e Discussão

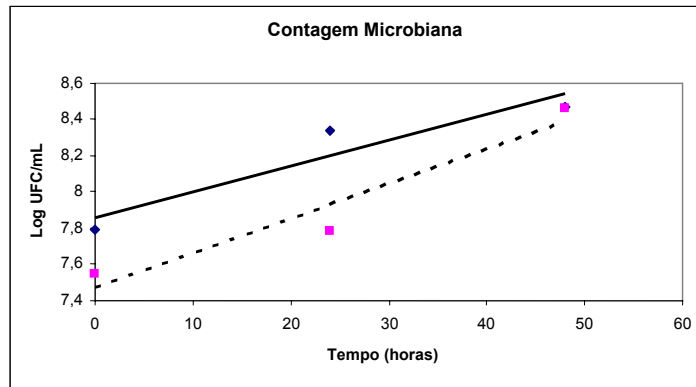
O resultado da análise microbiológica apresentada na Figura I confirma o crescimento microbiano abundante no agar MRS + actidiona, posterior identificação dos isolados, evidenciou presença de bactérias lácticas do gênero *Lactobacillus*, na fermentação do mosto do caldo de cana. Estes resultados são corroborados pelos resultados do acompanhamento do pH (Figura II), observando-se acidificação do meio como resultado do crescimento de bactérias acidogênicas. Isto também corrobora a hipótese inicial do projeto, que trata do crescimento de bactérias lácticas nesta etapa de fermentação. É válido lembrar que leveduras utilizadas neste processo não são acidificantes e, da fermentação etanólica é o produzido principalmente etanol e gás carbônico BREGAGNOLI (2006). Não há, portanto, correlação com acidificação do mosto. Na determinação dos sólidos solúveis (Figura III), onde quantifica-se o consumo dos carboidratos presentes no caldo de cana, observa-se que o crescimento bacteriano parece não afetar tanto o crescimento como a atividade da levedura.

Considerações Finais

Os resultados acima confirmam um grande crescimento de microbiota contaminante, *Lactobacillus* sp., durante a fermentação do caldo de cana com leveduras selecionadas. Aparentemente o crescimento bacteriano não afetou o crescimento e metabolismo da levedura. Outros testes serão realizados para avaliar as conseqüências para o teor alcoólico e a qualidade do produto final.

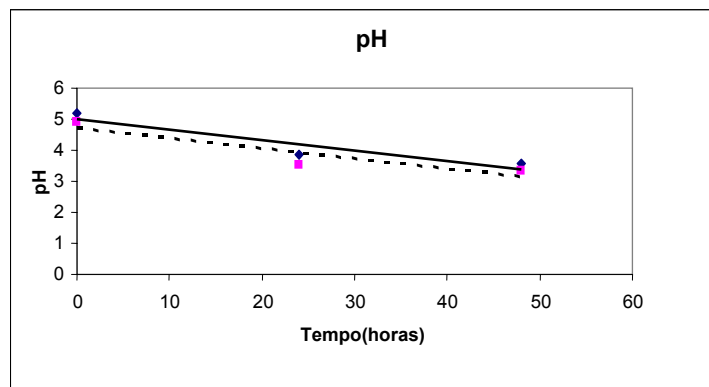
Referências

- BREGAGNOLI, F. C. R. Comportamento fisiológico de microrganismos submetidos a biocidas convencional e natural na produção de cachaça orgânica. 2006. 76P. Dissertação (Doutorado em Microbiologia, Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP.
- CHERUBIN, A. R. Efeitos da Viabilidade da Levedura e da Contaminação Bacteriana na Fermentação Alcoólica. 2003. 124p. Dissertação (Doutorado em Agronomia, Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Piracicaba, SP.
- FUNEL A. L. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76 (1-4): 317-331. 1999
- HARRIGAN, W.F., Laboratory Methods in Food Microbiology. 1998. *Academic Press, London*. 532p.
- MAIA, A. B. R.A. E CAMPELO, E. A. P. Tecnologia da Cachaça de Alambique. Sebrae-MG; Sindbebidas, 2005, 129p. Belo horizonte – MG.
- PRIEST, F., Lactic acid bacteria - The uninvited but generally welcome participants in malt whisky fermentation. *Microbiology Today* 31(2):16-18. 2004
- SIMPSON, K.L.; PETERSSON, B.; PRIEST, F.G., Characterization of lactobacilli from Scotch malt whisky distilleries and description of *Lactobacillus ferintoshensis* sp. nov., a new species isolated from malt whisky fermentations. *Microbiology* 147:1007-1016 . 2001.
- VAN BEEK, S.; PRIEST, F.G. Evolution of the lactic acid bacterial community during malt whisky fermentation: a polyphasic study. *Appl Environ. Microbiol.* 68:297-305. 2002.



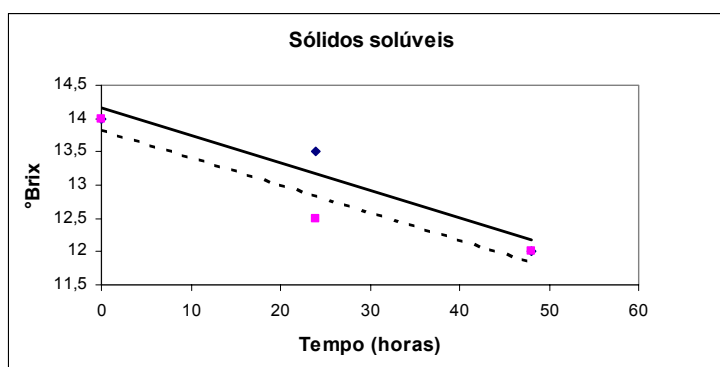
_____ Ensaio utilizando cultura de leveduras *Saccharomyces spp* EAF-1007
----- Ensaio utilizando cultura de leveduras *Saccharomyces spp* EAF-2097

FIGURA I – Contagem microbiana em diferentes tempos da fermentação do mosto de caldo de cana.



_____ Ensaio utilizando cultura de leveduras *Saccharomyces spp* EAF-1007
----- Ensaio utilizando cultura de leveduras *Saccharomyces spp* EAF-2097

FIGURA II – pH em diferentes tempos da fermentação do mosto de caldo de cana.



_____ Ensaio utilizando cultura axênica de *Saccharomyces spp* EAF-1007 (pé-de-cuba)
----- Crescimento de *Saccharomyces spp* EAF-1007 + microbiota contaminante (mosto)

FIGURA III – Teor de sólidos solúveis em diferentes tempos da fermentação do Mosto e Pé-de-Cuba do caldo de cana.