

UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

GEFERSON CRISTIANO GALDINO DE LIMA

**INFLUÊNCIA DA CONTAMINAÇÃO PELAS
BACTERIAS LÁTICAS NA FERMENTAÇÃO
ETANÓLICA**

BAURU
2011

GEFERSON CRISTIANO GALDINO DE LIMA

**INFLUÊNCIA DA CONTAMINAÇÃO PELAS
BACTERIAS LÁTICAS NA FERMENTAÇÃO
ETANÓLICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Exatas e Sociais Aplicadas, como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Bacharel em Química, sob a orientação da Prof^a Dra. Ana Paula Cerino Coutinho.

BAURU
2011

L7326i Lima, Geferson Cristiano Galdino de

Influência da contaminação pelas bactérias lácticas na fermentação etanólica / Geferson Cristiano Galdino de Lima, Henrique Viana Amorim, Sandra Regina Ceccato Antonini -- 2011.
41f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Cerino Coutinho

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) – Universidade Sagrado Coração – Bauru – SP.

1. Fermentação alcoólica. 2. Contaminação bacteriana. 3. Etanol. I. Amorim, Henrique Viana. II. Antonini, Sandra

GEFERSON CRISTIANO GALDINO DE LIMA

**INFLUÊNCIA DA CONTAMINAÇÃO PELAS BACTERIAS LÁTICAS NA
FERMENTAÇÃO ETANÓLICA**

Trabalho de conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências exatas e Sociais Aplicadas como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Química, sob a orientação da Prof. Dra. Ana Paula Cerino Coutinho.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dra. Ana Paula Cerino Coutinho
Universidade Sagrado Coração

Prof. Ms. Carlos Henrique Conte
Universidade Sagrado Coração

Prof. Dr. Raúl Andres Martinez Uribe
Universidade Sagrado Coração

Bauru, 5 de dezembro de 2011

Dedico esse trabalho especialmente aos meus pais e a todos que me incentivaram para que esse dia chegasse

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe Aparecida que sempre me incentivou nos estudos e que nunca permitiu que eu desisti-se de meus objetivos e ao meu pai que sempre me deu muita perseverança e paciência.

Agradeço a minha orientadora Ana Paula por todos os conhecimentos adquiridos.

Agradeço a todos meus amigos da faculdade e do ônibus que me apoiaram direta e indiretamente durante todo o curso.

“[DEUS] enxugará dos seus olhos toda lágrima, e não haverá mais pranto, nem clamor, nem dor. As coisas anteriores já passaram.”- Revelação (Apocalipse) 21:4.

RESUMO

O presente trabalho teve o objetivo de analisar os efeitos da contaminação pelas bactérias lácticas na fermentação alcoólica. Os mico-organismos contaminantes vem do campo, estão nos colmos da cana, e abrangem desde o corte até a etapa da moagem e fermentação. As bactérias presentes na fermentação alcoólica são do gênero *Lactobacillus e Bacillus* e causam a queda na viabilidade das células das leveduras e diminuem a produção de álcool. As bactérias lácticas transformam o açúcar em ácido láctico e conseqüentemente provocam grandes quedas no rendimento da fermentação. Desde a década de 70, o Brasil vem aprimorando mecanismos de processo para aumentar a produtividade das usinas, combatendo os contaminantes e adequando as condições para uma fermentação saudável. Hoje se sabe que as bactérias estão entrando no processo via matéria-prima, tempo de queima em relação à moagem e falta de assepsia nas demais etapas do processo.

Palavras-chave: Fermentação Alcoólica. Contaminação Bacteriana. Etanol.

ABSTRACT

This work had the object of analyzing the effects of bacterial contamination in alcoholic fermentation. The micro-organisms contaminants come from the field are on stalks of sugar cane, and range from the slicing up the step of milling and fermentation. The bacteria present in alcoholic fermentation are of the genus *Lactobacillus* and *Bacillus* and cause the fall on the viability of cells of yeast and decrease the production of alcohol. Láticas bacteria transform the sugar into lactic acid and therefore cause large declines in yield of fermentation. Since the Decade of 70, the Brazil comes honing process mechanisms to increase the productivity of plants, combating contaminants and adapting the conditions for a healthy fermentation. Today is known that the bacteria are entering the process via raw burning time in relation to grinding and lack of asepsis in further process stages.

Keywords: Alcoholic Fermentation. Bacterial Contamination. Ethanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema representativo da fermentação etanólica conduzida pelo sistema de decantação.....	18
Figura 2- Esquema representativo do processo de fermentação etanólica melle-boinot.....	20
Figura 3- Esquema do processo de fermentação etanólica com quatro reatores em série e com reciclo de células.....	21
Figura 4- Esquema resumido da glicólise.....	22
Figura 5- Destino do Piruvato na Fermentação.....	22
Figura 6- Esquema de uma célula de Levedura.....	26
Figura 7- Leveduras e lactobacilos dispersos (a) e floculados (b) em fermentação etanólica.....	29
Figura 8- Molécula de ácido láctico.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição média do caldo de cana-de-açúcar.....	14
Tabela 2- Tempo de queima x corte.....	16
Tabela 3- Concentração de nutrientes minerais no mosto para se obter uma fermentação alcoólica adequada.....	25
Tabela 4- Quantidade de Ácido Lático em caldo de cana colhida, com diferentes períodos entre a queima, corte e o processamento.....	31
Tabela 5- Parâmetros de vinhos obtidos de fermentação de mosto de melaço por leveduras com bactérias lácticas, corrido em batelada por 9h, a 32°C sob agitação.....	32
Tabela 6- Tabela que apresenta os resultados das concentrações de ácido lático, bem como as condições da fermentação e quantidade de bastonetes por mL.....	33

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2.	MATÉRIAS-PRIMAS PARA PRODUÇÃO DE ETANOL	13
2.1	COMPOSIÇÕES DA CANA-DE-AÇÚCAR.....	13
2.2	QUALIDADE DA CANA-DE-AÇÚCAR NA PRODUÇÃO DE ETANOL.....	14
3	PROCESSOS FERMENTATIVOS	16
3.1	TIPOS DE PROCESSOS	17
3.1.2	Processos Descontínuos Sem Reciclo de Células	17
3.1.3	Processos Descontínuos com Sistemas de Cortes.....	17
3.1.4	Processos de Decantação	18
3.1.5	Processo Descontínuo Alimentado ou Melle-Boinot.....	18
3.1.6	Processo Contínuo.....	20
4	BIOQUÍMICA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	21
4.1.	FATORES QUE AFETAM A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	23
4.1.1	Temperatura	23
4.1.2	pH.....	24
4.1.3	Oxigênio	24
4.1.4	Nutrientes	25
4.1.5	Contaminação Microbiológica	25
5	MICRO-ORGANISMOS DO PROCESSO	26
5.1	LEVEDURAS	26
5.2	MICRO-ORGANISMOS CONTAMINANTES	27
5.2.1	Leveduras Selvagens	27
5.2.2	Bactérias	28
5.2.3	Bactérias Lácticas	28
6	ÁCIDO LÁTICO	30
6.1	QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO LÁTICO	32
7	CONCLUSÃO	34
	REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

Desde o início dos anos 70 com o desenvolvimento do Programa Nacional do Alcool, já havia a necessidade de estudar maneiras para ampliar e melhorar as condições no processo de produção do etanol no Brasil devido ao aumento do consumo desse combustível. Com o avanço tecnológico em pesquisas de melhoramento genético das variedades de cana-de-açúcar, automação no setor industrial, houve uma grande expansão no comércio interno e externo.

De acordo com Mutton (2008), quanto melhor e mais adequada forem as condições de cultivo, melhor poderá ser a qualidade da matéria-prima, com maior acúmulo de açúcar e conseqüentemente a rentabilidade nos produtos finais da indústria sucroalcooleira.

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo e seu potencial de produção pode crescer ainda mais. O é um combustível renovável e considerado um bicombustível obtido através de processo limpo; devido a estas características o etanol vem a ser uma boa alternativa para diminuir a emissão de gás estufa, a exemplo do CO₂. Embora o Brasil tenha domínio sobre as técnicas de produção do etanol, existem grandes dificuldades ainda por enfrentar para aumentar o rendimento em relação tonelada de cana processada e litros de álcool produzido, uma grande vilã desse processo é a contaminação das fermentações por bactérias e leveduras.

A contaminação das fermentações pode ocorrer devido à qualidade e ao tratamento da matéria-prima, ao tempo de queima e ao período de tempo em que a cana foi cortada e processada. Estes fatores são considerados os maiores causadores da contaminação na fermentação, visto que existem micro-organismos no solo e na matéria-prima a ser processada. (MUTTON, 2008).

Os micro-organismos contaminantes se proliferaram rapidamente após a extração do caldo. Os níveis de contaminação podem ser controlados se alguns critérios forem adotados, são eles: assepsia nas moendas, nas tubulações e nos trocadores de calor; limpeza das dornas de fermentação e emprego do H₂SO₄, para regular o pH, auxiliando na eliminação de bactérias que acompanham as leveduras. (CECCATO-ANTONINI, 2010).

Segundo Ceccato- Antonini (2010), quanto mais próximo da neutralidade estiver o pH, mais as bactérias sobrevivem. Mas o uso rotineiro de H₂SO₄ apresenta a desvantagens de diminuir a viabilidade celular.

Segundo Amorim (1996), os níveis de contaminação podem ser facilmente detectados e um dos parâmetros a ser analisado é o nível de formação de ácido láctico. Este ácido orgânico

produzido pelas bactérias contaminantes atua como inibidor da fermentação diminuindo o rendimento do processo.

Este trabalho teve o objetivo de avaliar os efeitos que o ácido láctico produzido por bactérias causam na viabilidade celular e no rendimento da fermentação alcoólica.

2. MATÉRIA-PRIMA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL

A matéria-prima usada para a produção de etanol via fermentativa é de origem agrícola (recursos renováveis), dependentes da fotossíntese. Nem todas as culturas, porém, são economicamente viáveis. (SANTOS; BORÉM; CALDAS, 2010).

Segundo os mesmos autores para ser considerada matéria-prima para a produção de etanol, a mesma deve conter glicose, frutose, sacarose, amido ou celulose.

“No Brasil, as matérias-primas utilizadas para a indústria de etanol são a cana-de-açúcar e o melaço, que é subproduto da fabricação de açúcar.” (SANTOS; BORÉM; CALDAS, 2010, p. 409).

Segundo Mutton (2008), a cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) apresenta potencial favorável para o acúmulo de açúcares, especialmente na forma de sacarose.

A sacarose é uma matéria-prima indiretamente fermentescível, ou seja, contém na sua composição dissacarídeos que fermentam após uma hidrólise, à qual se dá o nome de inversão, e que se realiza naturalmente por ação da invertase. A levedura produtora de etanol contém invertase, que realiza a hidrólise da sacarose, transformando-a em uma mistura de glicose e frutose. Também existem as matérias-primas açucaradas fermentescíveis, que são aquelas que contém em sua composição monossacarídeos que não precisam de nenhuma transformação para ser absorvidas e transformadas em etanol pelo micro-organismo. Nesse grupo se enquadra a glicose ($C_6 H_{12} O_6$) e a frutose ($C_6 H_{12} O_6$). (SANTOS; BORÉM; CALDAS, 2010).

2.1 COMPOSIÇÕES DA CANA DE AÇÚCAR

Segundo Santos, Borém e Caldas (2010), a composição da cana-de-açúcar depende da variedade, estágio de maturação, condições climáticas, adubação. A cana-de-açúcar contém 75% de água, 25% de matéria orgânica e 0,5% de material mineral, como mostra a tabela 1.

Tabela 1 - Composição média do caldo de cana-de-açúcar.

Componente	Valor Percentual
Brix	19,5
Água	81
Sacarose	16
Glicose	0,3
Frutose	0,1
Açúcares Totais	18
Subst. reduct. Infermente.	0,02
Matéria nitrogenada	0,03
Acidez Sulfúrica	0,5
pH	5,5
Cinzas	0,4
P ₂ O ₅	0,02
K ₂ O	0,15
CaO	0,02
MgO	0,02
SiO ₂	0,02
Vitaminas	Variável

Fonte: Araújo (1982)

De acordo com a Tabela 1, é possível conhecer alguns valores importantes da composição do caldo da cana. O caldo contém em maior quantidade a água, cerca de 81%, os sólidos solúveis (°Brix) está em torno de 19,5% e a sacarose representa 16%, sendo que este é o açúcar mais importante da cana, também são encontrados pequenas frações de glicose e frutose. O caldo ainda contém pequenas porções de açúcares fermentescíveis, matérias nitrogenadas, minerais e vitaminas.

2.2 QUALIDADE DA CANA-DE-AÇÚCAR NA PRODUÇÃO DO ETANOL

A qualidade da cana-de-açúcar é avaliada pela sua composição, que depende de fatores genéticos, ambientais, tratos culturais, estado de maturação, sistema adotado na colheita e tempo de queima pós corte. Em uma agroindústria de cana-de-açúcar, a qualidade da matéria-prima, sem dúvida, é o mais importante fator de rentabilidade, cana de boa qualidade resulta em um tempo de processamento mais curto, com maior rendimento e qualidade dos produtos. (ALBUQUERQUE, 2010).

As condições genéticas, ou seja, a escolha da variedade da cana a ser plantada, exige por parte da agroindústria um bom planejamento, observando o tipo e fertilidade do solo.

Dessa maneira deve-se também observar algumas particularidades das variedades como, a produção de biomoléculas, polifenóis, amido, fibra, P_2O_5 , polissacarídeos, e quando se observa o processamento industrial estas características podem promover alterações significativas, comprometendo a eficiência dos processos e por fim a lucratividade (MUTTON, 2008).

Segundo Stupielo (2006), os tratos culturais são de suma importância na agroindústria, pois, as impurezas vegetais afetam diretamente o processamento, através da perda de capacidade da fábrica de 3 a 15%, e perda na extração de 1 a 4%; além da incorporação de componentes indesejáveis, como, polissacarídeos, amido e ácido aconítico.

De acordo com Albuquerque (2010), o ácido aconítico afeta as reações de clarificação do caldo, competindo com o ácido fosfórico, formando sais com o cálcio adicionado, o aconitato de cálcio. Então é necessário aumentar o consumo de leite de cal para atingir o pH desejado, elevando o custo do processo.

Outro fator importante na qualidade da matéria-prima é o estágio de maturação, que significa a redução do crescimento vegetativo e acúmulo de sacarose nos colmos, ou seja, mais sacarose e menos açúcares redutores. O IM (índice de maturação) é o principal determinante na definição do corte de cana. Esta indicação é feita por meio da relação do °Brix do topo e do °Brix da base do colmo, resultando no chamado índice de maturação, como mostra a equação 1. (SANTOS, CALDAS E BORÉM, 2010).

$$IM = \frac{\text{Brix do topo do colmo}}{\text{Brix da base do colmo}} \times 100 \quad (1)$$

A determinação da porcentagem de sólidos solúveis é feita por refratometria, por três motivos: possibilidade de determinar o °Brix na cana ainda plantada, pelo fato do °Brix indicar a porcentagem de sólidos solúveis no caldo e por analisar o topo e a base do colmo possibilitando conhecer o grau de maturação, onde o percentual ideal para se cortar a cana é quando o °Brix do topo se assemelhar com °Brix da base. (SANTOS; BORÉM; CALDAS, 2010).

Segundo Mutton (2008), a fase em que a matéria-prima é mais suscetível à deterioração é sem dúvida o tempo decorrido entre o corte e a moagem da cana, uma vez que a deterioração da cana inicia-se no momento da queima/corte.

De acordo com Amorim (2011), o tempo de queima ideal é o menor possível, cerca de 30 horas, espaços maiores comprometem o rendimento industrial, e causam um impacto muito significativo no rendimento global da indústria, como mostra a tabela 2.

Tabela. 2 - Tempo de Queima x Corte

Safra	Para cada 10 horas de tempo de queima o rendimento industrial abaixou	Médias clientes (horas)
1999/00	1,30%	46,16
1998/99	1,75%	56,45
1997/99	-	64,1
1996/97	0,96%	63,6

Fonte: Amorim (2011).

De acordo com a Tabela 2, é possível verificar que quanto maior é o tempo de queima, maior será a queda no rendimento industrial. Nas safras de 1999/2000, os clientes atingiram cerca de 46,16 horas de tempo de queima, acarretando perdas de 1,30% no rendimento. Já nas safras de 1998/99, em média os clientes atingiram tempos de queima de 56,45 horas obtendo queda no rendimento de 1,75%, e em safras anteriores no período de 1996 a 1999, atingiram valores de tempo de queima parecidos e também mostraram perdas em torno de 0,96 %.

3 PROCESSOS FERMENTATIVOS

A fermentação alcoólica é um fenômeno por meio do qual os açúcares são transformados em álcool e gás carbônico, principalmente por ação das leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. A fermentação dos mostos (caldo de cana ou melaço) realiza-se em três fases distintas: pré-fermentação ou preliminar, fermentação principal e pós-fermentação ou complementar. (AMORIM, 2005).

A pré-fermentação inicia-se quando o fermento (leveduras) é adicionado ao mosto devidamente preparado, e caracteriza-se pela ativa multiplicação das células e elevação lenta e gradual da temperatura do meio. Após cinco ou seis horas, com pouca espuma, inicia-se a fermentação principal, com um rápido aumento na temperatura, queda da densidade do mosto

devido ao desaparecimento dos açúcares e da formação equivalente de álcool. A acidez se eleva e essa fase termina quando as espumas desaparecem durando de nove a dez horas. A pós-fermentação é caracterizada pela diminuição lenta e gradual da temperatura do mosto, diminuição do desprendimento de gás carbônico, e não há mais formação de espumas, essa fase pode durar de seis a oito horas. O mosto totalmente fermentado recebe o nome de vinho, lembrando que quanto menos tempo de fermentação menor é o desenvolvimento da infecção no fermento. (CECCATO-ANTONINI, 2010).

3.1 TIPOS DE PROCESSO

Os tipos de processo na condução da fermentação alcoólica dependem do tipo de tecnologia existente na agroindústria, mas no Brasil predomina o processo descontínuo alimentado com reciclo total do agente da fermentação, o qual permite maior produtividade em relação ao processo descontínuo (batelada simples), (AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS, 2010).

Segundo Antonini (2010) os problemas causados nos processos de batelada simples e alimentados são decorrentes da contaminação, mas podem ser mais facilmente contornados, do que em processos contínuos.

3.1.2 Processo descontínuo sem reciclo de célula

No processo descontínuo, batelada, sem reciclo de célula cada dorna recebe um inóculo recentemente preparado, puro e ativo. Após o término da fermentação o meio fermentado é enviado para a separação, o fermentador é lavado e assim recebe um novo inóculo cerca de 20 a 25% do volume útil da dorna. Esse processo é conhecido também como, “cultura pura,” oferece boas condições de trabalho e como a fermentação de cada dorna é independente das demais, tem menor risco de contaminação. Mas este processo possui a desvantagem de consumir grandes quantidades de inóculo e atingir baixo rendimento econômico (SANTOS;BORÉM; CALDAS, 2010).

3.1.3 Processo descontínuo com sistema de cortes

De acordo com Santos, Borém e Caldas (2010), o processo descontínuo com sistema de corte é conduzido da seguinte forma: a dorna 1 recebe o inóculo e quando a concentração do

meio em fermentação atingir cerca de 50% da concentração do mosto de alimentação, metade do volume da dorna é transferido para a dorna 2, e assim se diz que houve um corte. Na dorna 1 depois de completada a fermentação, o meio é enviado para a destilação, na dorna 2 adota-se o mesmo processo da dorna 1, sofre o corte para a dorna 3 e o processo se repete, mas com os sucessivos cortes são computadas perdas significativas no rendimento fermentativo. Esse procedimento ocorre no início da safra com intuito de multiplicar o fermento.

3.1.4 Processo de decantação

Processo no qual consiste em deixar terminar a etapa de fermentação de quatro a seis horas, e em seguida deixar o material em repouso, e logo após retirar a parte superior da dorna que geralmente é cerca de 80% do volume, sendo o restante tratado com ácido sulfúrico e reutilizado como inóculo para um novo processo, como mostra a Figura 1. Como este procedimento é menos rentável ele é empregado apenas em micro destilarias e alambiques, devido ao alto custo das separadoras centrifugas contínuas, só viáveis em usinas de grande porte, além de apresentar acentuada perda de fermento no vinho e outro fato é o baixo teor de álcool no vinho fazendo assim aumentar o volume de vinhaça por litro de álcool. (SANTOS; BORÉM; CALDAS, 2010).

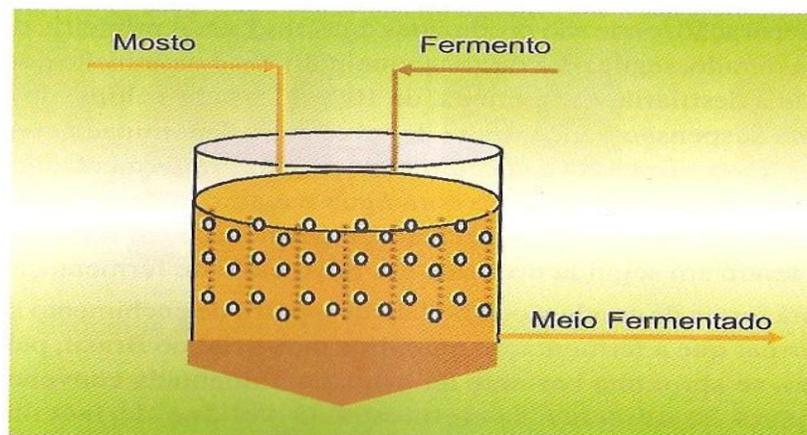


Figura 1 - Esquema representativo da fermentação etanólica conduzida pelo sistema de decantação.

Fonte: SANTOS, BORÉM, CALDAS, (2010, p.419).

3.1.5 Processo descontínuo alimentado ou Melle-boinot

O processo descontínuo alimentado consiste em adicionar um ou mais nutrientes ao fermentador durante o cultivo e os produtos permanecem até o final da fermentação. A vazão de alimentação pode ser constante ou variar com o tempo.

Segundo Dorta et al. (2006), as usinas no Brasil seguem o modelo sugerido por Melle-Boinot, onde o vinho é centrifugado, e em seguida recebe tratamento com ácido sulfúrico até pH 2,5 por 3 a 4 horas para a descontaminação do vinho, e conseqüentemente afastar a floculação causada por bactérias *L. fermentum*.

Gallo e Canhos (1991) observaram redução significativa de até 44,3% da população contaminante em função do tempo do tratamento ácido.

Esse processo consiste em transferir todo vinho da dorna para um tanque pulmão que por sua vez alimenta as separadoras centrifugas, onde separa o vinho em 02 frações, um denominado vinho de levedurado, ou seja, vinho sem levedura, este é bombeado para a dorna volante uma espécie de tanque pulmão que guarda o vinho para em seguida ser destilado. A fração concentrada de leveduras denominada creme ou leite de leveduras volta para o processo e sofre o tratamento com ácido sulfúrico e água para diluição em agitação contínua, como mostra a Figura 2. (SANTOS; BORÉM; CALDAS, 2010).

No Brasil cerca de 70% do álcool é produzido por fermentação descontínua com reciclo de célula, pois apresentam menores perdas de fermento, menor tempo de fermentação, consome menos nutrientes, produz menor volume de vinhaça, e conseqüentemente obtêm-se vinhos com maior porcentagem de álcool. Entretanto, tem-se a necessidade de ter fermentadores muito grandes, ocorrendo variações do meio fermentativo; apresentam altos custos na manutenção e instalação de centrifugas contínua. (SANTOS; BORÉM; CALDAS, ANO).

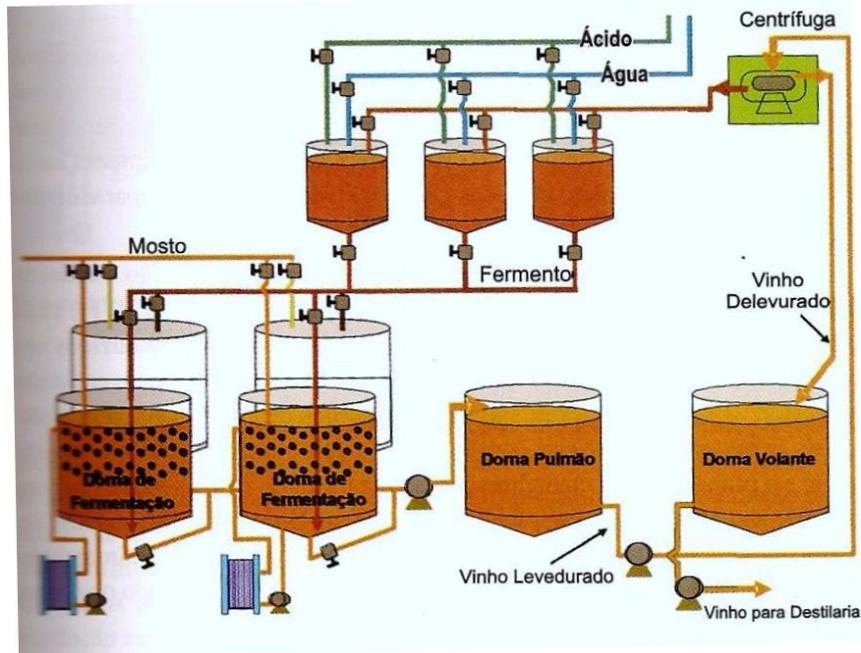


Figura 2: Esquema representativo do processo de fermentação etanólica Melle- Boinot.
 Fonte: SANTOS, BORÉM, CALDAS (2010, p.421)

3.1.6 Processos contínuos

Os processos contínuos são relativamente recentes, embora seu uso em escala industrial começa por meados de 1940, o seu uso tomou proporções após incentivo a produção de etanol no Brasil decorrente da crise econômica, devido ao alto preço do petróleo na década de 1970. A fermentação contínua é relativamente simples, alimentando uma dorna com fluxo contínuo com uma determinada concentração e retirando dela de forma contínua o vinho encaminhado a destilação, como mostra a Figura 3. (LIMA et al., 2001).

A fermentação contínua apresenta como vantagens, maior produtividade em etanol, menor área para a mesma produção, maior facilidade de automação, maior uniformidade operacional, menor gasto com mão-de-obra, melhores condições para as leveduras. E dentre as desvantagens, dificuldade de manter a uniformidade das operações unitárias do processo fermentativo em função das variações de vazão e concentração do ART (açúcar redutor total) do mosto, principalmente se a destilaria for anexa a fábrica de açúcar e houver dificuldades na assepsia das dornas. (SANTOS, BORÉM, CALDAS, 2010).

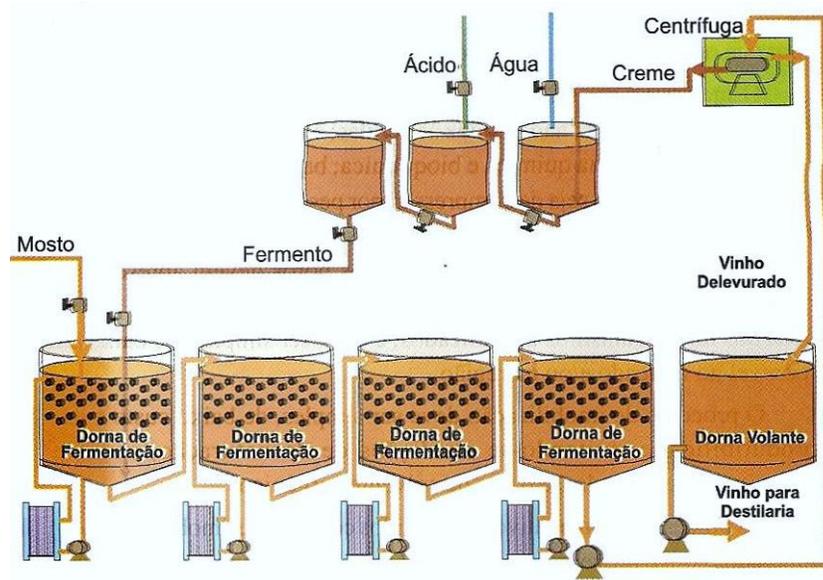


Figura 3: Esquema do processo de fermentação etanólica com quatro reatores em série e com reciclo de células.

Fonte: SANTOS, BORÉM, CALDAS, 2010, p.423.

4. BIOQUÍMICA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

A fermentação alcoólica é um processo que envolve ações de micro-organismos como as leveduras, principalmente as do gênero *Saccharomyces*, com objetivo de transformar açúcares em álcool e gás carbônico. Como é um processo biológico, a energia fornecida pelas reações de oxidação são parcialmente utilizadas como fonte de energia para o desenvolvimento dos micro-organismos e a outra parcela utilizada na produção de etanol e gás carbônico. (LIMA; MARCONDES, 2002).

Fermentação é o termo geral que denota a degradação anaeróbia da glicose, ou outros carboidratos, em vários produtos (característicos para os diferentes organismos) para obter energia na forma de ATP, como mostra a Figura 4. A quebra da glicose em duas moléculas de piruvato é, provavelmente, o mais antigo mecanismo biológico para obtenção de energia a partir de moléculas orgânicas combustíveis.

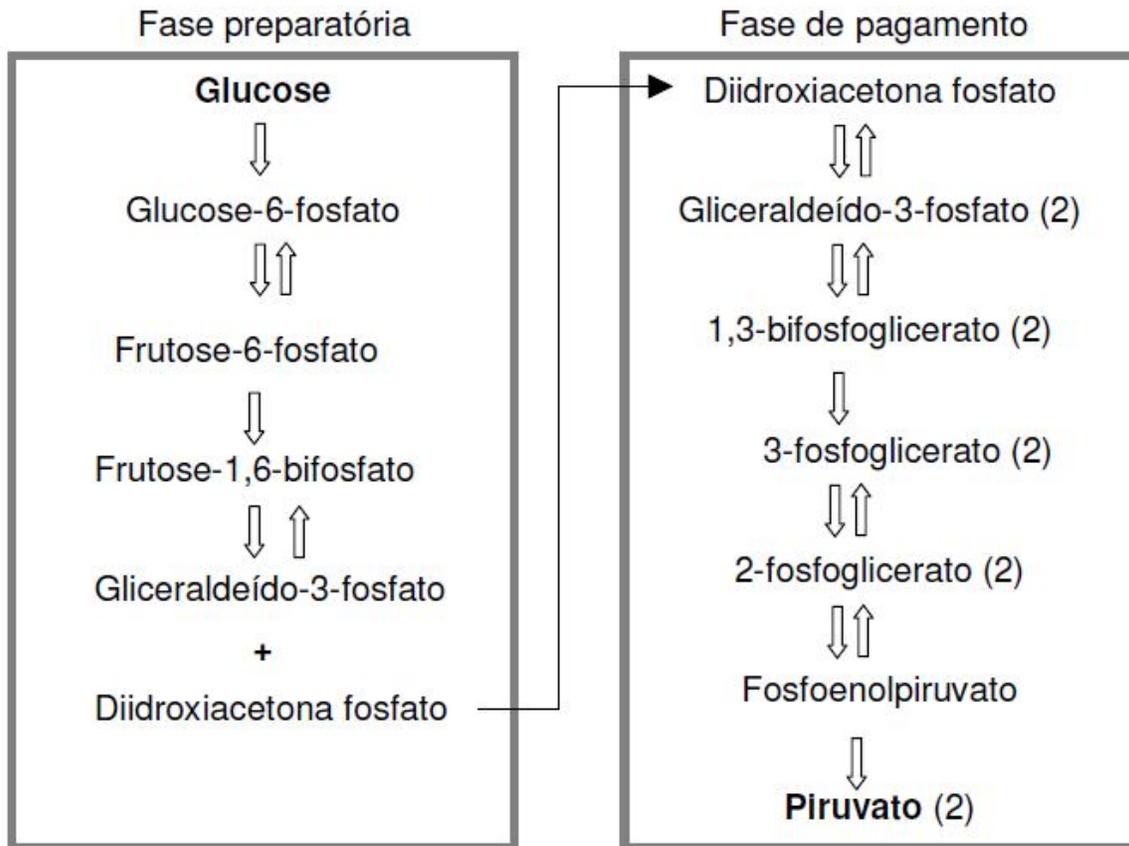


Figura 4. Esquema resumido da glicólise
 Fonte: Ventura, 2007, p. 05.

No caso da levedura, o destino do piruvato produzido na glicólise é ser convertido em etanol e CO_2 em um processo de dois passos. Na primeira reação, o piruvato sofre a descarboxilação em uma reação reversível catalisada pela enzima piruvato descarboxilase. Na segunda reação, através da ação da enzima álcool desidrogenase, o acetaldeído é reduzido a etanol, na presença do NADH, como mostra a Figura 5. (LEHNINGER et al., 2000).

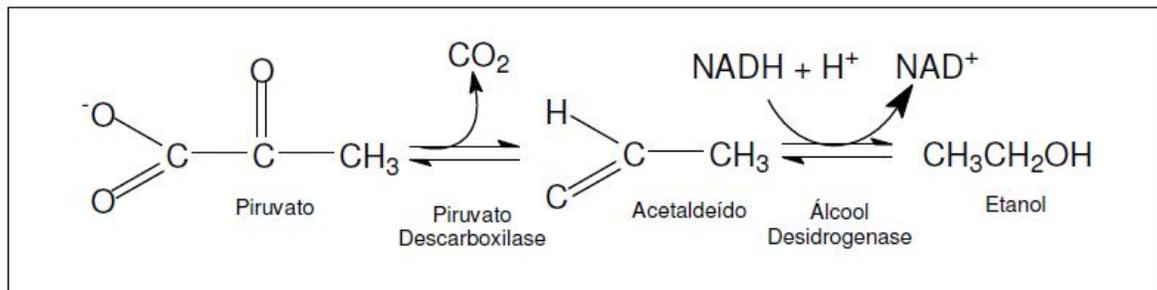


Figura 5 . Destino do piruvato na fermentação alcoólica da levedura.
 Fonte: Ventura, 2007, p. 06.

A fermentação ocorrerá no interior da célula, mais propriamente no citoplasma.

A levedura é um micro-organismo anaeróbio facultativo, ou seja, metaboliza açúcar tanto na presença quanto na ausência de oxigênio. Na presença de oxigênio uma parte do açúcar é transformado em água e dióxido de carbono, enquanto que na ausência de oxigênio é transformada em álcool e CO₂. Como nas biorreações são necessárias bastante energia, os ATPs produzidos na glicólise são utilizados na biossíntese das leveduras. Há uma forte ligação entre crescimento das leveduras e produção de álcool, por isso é importante ressaltar que as leveduras tem que ser encherados como subproduto, permitindo o consumo contínuo dos ATPs, para que não haja acúmulo de energia no interior da célula, o que é indesejado no processo, pois esse acúmulo inibe, a enzima fosfofrutoquinase responsável pelo equilíbrio regular da glicose.(BAI, ANDERSON; MOO-YOUG, 2008).

Segundo Lima, Basso e Amorim (2001), objetivo final da levedura, é metabolizar o açúcar anaerobicamente, gerar ATP em forma de energia (adenosina trifosfato) utilizada nas reações fisiológicas das leveduras e liberar etanol e CO₂.

4.1 FATORES QUE AFETAM A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Vários fatores podem ser prejudiciais para a fermentação alcoólica, e dentre eles estão a temperatura, o pH e principalmente os micro-organismos contaminantes. (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

4.1.1 Temperatura

A temperatura é um dos mais importantes fatores, conforme a temperatura sobe acima dos 35°C, ocorre a proliferação de bactérias contaminantes e conseqüentemente diminui a viabilidade celular das leveduras.(SILVA FILHO et al., 2005).

Segundo Pacheco (2010), a temperatura ideal ainda é um aspecto bem divergente entre os pesquisadores. A faixa de temperatura ideal situa-se entre 25-36°C, o aumento leva ao surgimento da contaminação bacteriana.(MENEZES, 1980).

A temperatura é o fator mais grave, acima de 35°C afeta diretamente o desempenho das leveduras, elevando os níveis de contaminação. Quando testados na prática para cada grau centígrado acima de 34°C, o rendimento da fermentação cai 0,5%. Pode se chegar aos 35°C,

desde que a contaminação seja controlada, estando na faixa de 5.10^6 a 1.10^7 bactérias/mL, assim nessa temperatura a levedura multiplica menos e aumenta o rendimento.(AMORIM, 2005).

4.1.2 pH

Segundo Antonini (2010), o pH na fermentação tem um papel importante principalmente quanto à atividade ótimas das leveduras que ocorre em meio ácido com pH entre 4,5-5,0; pois as bactérias se desenvolvem em pH próximo da neutralidade entre 6,5 e 7,5.

Nas usinas realiza-se um tratamento ácido no fermento. Neste processo, o pH do meio é diminuído com a adição de ácido sulfúrico a valores entre 2,5-2,8 por 2 a 3 horas. Esse tipo de processo provoca a latência das bactérias lácticas, reduz parte dos contaminantes, promove a limpeza química da superfície celular das leveduras melhorando assim a absorção dos nutrientes pelas leveduras e ajuda a manter mais baixo o pH da fermentação diminuindo a contaminação bacteriana.(ASSOCIAÇÃO DOS PROFISSIONAIS DA QUÍMICA NO ESTADO DE ALAGOAS, [198-?]).

4.1.3 Oxigênio

Certos micro-organismos necessitam de oxigênio para o sua sobrevivencia, esses são os aeróbicos, outros não toleram a presença de oxigênio, esses os anaeróbicos e ainda existem aqueles que podem sobreviver tanto na presença quanto na ausencia de oxigênio, os chamados facultativos (BORZANI et al., 2001).

Segundo LIMA (1986), as leveduras *saccharomyces cerevisiae* se comportam facultativamente em presença de O_2 , podendo seguir rotas metabólicas tanto na presença, quanto na ausencia de O_2 . Em situações em que há grandes quantidades de O_2 a fermentação alcoólica é inibida devido ao “Efeito Pasteur”, efeito intimamente associado ao estado fisiológico da células, principalmente nas leveduras que não estão em fase de crescimento, mas sim na fase estacionária, fase em que o consumo de glicose diminui. Por outro lado em células em fase exponencial, ou seja em fase de crescimento não houve diferença significativa na velocidade de consumo da glicose entre uma célula aeróbica e outra anaeróbica (STECKELBERG, 2001).

Ainda que pareça contraditório, é notório que a total falta de O_2 na fermentação não é benéfica ao processo etenólico, pois em níveis mais altos de rendimento alcoólico com menor

formação de glicerol, puderam ser obtidos em culturas com certa quantidade de oxigênio disponível (SOUZA, 2009).

4.1.4 Nutrientes

Segundo Lima et al. (2001), as leveduras necessitam de nutrientes, como o carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, fósforo, potássio, enxofre, magnésio, ferro, zinco e outros, além de co-fatores como as vitaminas essenciais para o seu crescimento, como mostra a Tabela 3.

Tabela3 - Concentração de nutrientes minerais no mosto para se obter uma fermentação alcoólica adequada.

Nutrição Mineral	Concentração em mg/L	Nutriente Mineral	Concentração em mg/L
NH ⁴⁺	40-5900	Co ⁺⁺	3,5
P	62-560	Zn ⁺⁺	0,5-10
K ⁺	700-800	Cu ⁺⁺	7
Ca ⁺⁺	120	Mn ⁺⁺	10- 80
Mg ⁺⁺	70-200	Fe ⁺⁺	0,2
SO ₄ ⁺	7-280		
Na ⁺	200		

Fonte: (LIMA et al., 2001).

4.1.5 Contaminação microbiológica

De acordo com Mutton (2008), a contaminação ocorre nas maiorias das unidades produtoras de álcool do Brasil, em decorrência do desenvolvimento de outros micro-organismos, como bactérias e leveduras selvagens, que podem estar presentes na matéria-prima.

Segundo Antonini (1998), a contaminação microbiológica pode significar a diferença entre ganhar ou perder em produtividade e podem ser traduzidas em milhões de litros de álcool.

Por isso o controle das bactérias são de suma importância para diminuição das perdas, fazendo com que o consumo de produtos antimicrobianos também diminuam, reduzindo os gastos para industria.(ALCOOLBRÁS, 2010).

Conforme Moreno (2005), as maiores perdas no setor alcooleiro são aquelas que não se medem, as classificadas como indeterminadas.

5. MICRO-ORGANISMOS DO PROCESSO

5.1 LEVEDURAS

Segundo Lima, Basso e Amorim (2001), as leveduras são os micro-organismos mais importantes na obtenção de álcool via fermentativa; entretanto, existem também as bactérias do gênero *Zymomonas mobilis*.

As leveduras são micro-organismos cujo crescimento é na forma unicelular como mostra figura 6.

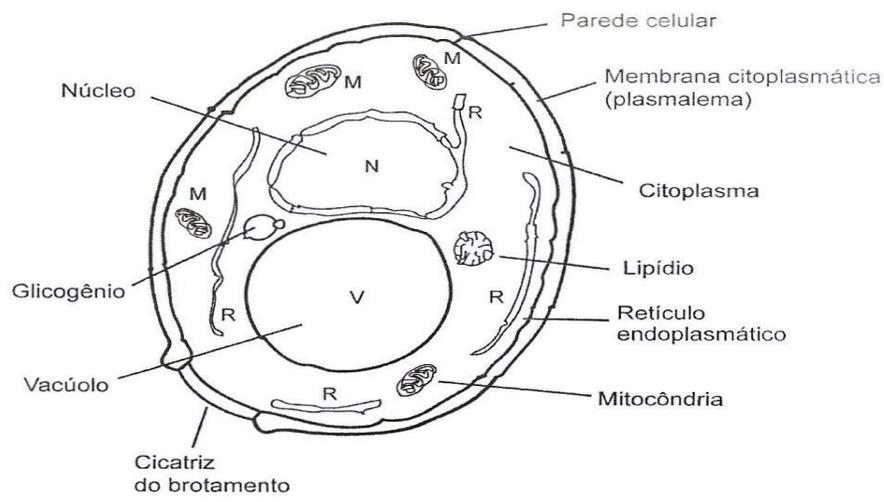


Figura 6: Esquema de uma célula de levedura
Fonte: ANTONINI, 2010, p. 34

A reprodução é assexuada, por brotamento multilateral e polar ou por fissão, e sexuada, por meio de ascósporos. Outra característica desse micro-organismo é a composição da parede celular, que consiste basicamente de polissacarídeos da glicose, manose ou N-acetilglicosamina. Ao contrário das plantas, a parede celular das leveduras não contém celulose, os fungos também não armazenam amido, e sim glicogênio, semelhante aos animais. O processo mais comum de crescimento das leveduras é a gemulação ou brotamento. Quando por brotamento uma célula de levedura pode gerar mais de 24 células filhas. Outra maneira de reprodução é sexuada, que só ocorre em situações onde há falta de nutrientes. De modo geral, as células variam no que diz respeito às suas dimensões, partindo de 1 a 5 μm de largura a 5 a 30 μm de comprimento, em geral são maiores do que as bactérias, mas as menores leveduras não são tão grandes como as maiores bactérias (CECCATO-ANTONINI, 2010).

5.2 MICRORGANISMOS CONTAMINANTES

5.2.1 Leveduras selvagens

As leveduras selvagens ou invasoras, tem sido alvo de grandes problemas para indústrias de álcool, elas demonstram ser altamente competitivas e predominam a fermentação. Para muitas usinas o problema tem sido descoberto a partir de dados de laboratório como queda do rendimento fermentativo, queda na eficiência industrial, maior tempo de fermentação e maior formação de espumas devido ao aumento da viscosidade (CECCATO-ANTONINI, 2010).

Segundo Castro, 1995; Cabrini e Gallo,1999, tem sido isoladas frequentemente as levedura do gênero *Candida* dos processos fermentativos, mas é a levedura *Dekkera* ou *Bretanomyces* que tem causado maiores problemas nas fermentações.

No nordeste brasileiro foi identificada e caracterizada por meio de métodos moleculares, a principal levedura contaminante presentes nas plantas utilizadas na produção de álcool, a *Dekkera bruxellensis*, responsável pela diminuição na produção de etanol. (SOUZA-LIBERAL, 2007).

Portanto essa redução na produção álcool acontece porque as células dessas leveduras se reproduzem na fermentação, substituindo as células da *Saccharomyces Cerevisiae*, tornando o processo de fermentação mais lento. Ora fora somente esses os prejuízos, mas não para por ai, com a fermentação prejudicada todo sistema é afetado, desde a moagem até o campo, carregamento, todos tem de ser reduzidos causando um prejuízo ainda maior para as indústrias (AGROSOFT BRASIL, 2010).

Ensaio realizados com a levedura *Dekkera bruxellensis* em fermentações puras e mista com *Saccharomyces Cerevisiae*, mostraram que a levedura contaminante consegue crescer no meio independente da quantidade de inóculo, causando a diminuição da viabilidade celular da *Saccharomyces Cerevisiae*, redução na produção de etanol, provavelmente pela produção de ácido acético proveniente do açúcar redutor presente na fermentação. Dependendo do grau de contaminação decorrente dessa levedura, a perda estimada pode atingir valores entre 6 a 15 milhões de litros de álcool na safra (MENECHIN, 2007).

Segundo Muttom (2008), os micro-organismos contaminantes vem do campo, estão nos colmos da cana, e abrangem desde o corte até a etapa da moagem. Estes contaminantes tem o

poder de degradar a sacarose causando perdas diretas, pelo fato de produzirem ácidos orgânicos e polissacarídeos como subprodutos diminuindo o rendimento da fabricação (STUPIELLO 1981).

Entre os contaminantes mais comuns nos processos fermentativos, estão as bactérias, com predominância das gram-positivas dos gêneros *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Leuconostoc* (CECCATO-ANTONINI, 1998).

5.2.2 Bactérias

Segundo Neto e Shinya (1991) as contaminações por bactérias é frequente em fermentações, as bactérias que são detectadas são do gênero *Lactobacillus e Bacillus*, causando a queda na viabilidade das células das leveduras e diminuindo a produção de álcool.

As bactérias tem facilidade para se desenvolver em fermentações que apresentam dificuldades de assepsia, tanto da cana, quanto das etapas seguintes do processo, ela também é incentivada simplesmente pelas condições de operação das unidades, quando o tratamento térmico é ineficiente e quando há presença de pontos mortos no processo, contaminação nos trocadores de calor, contaminação nas tubulações, qualidade da água utilizada na diluição do fermento e limpezas das dornas. As bactérias são capazes de dobrar sua população em apenas 28 minutos, então os prejuízos podem ser assustadores e, além de diminuir a produção de álcool ainda exige das usinas a aplicação de antibióticos (ALCOOLBRÁS, 2010).

Segundo Antonini (1998), o uso contínuo de antibióticos é prejudicial aos processos de fermentação, pois, pode levar ao desenvolvimento de linhagens resistentes, as quais se tornam menos sensíveis a sua aplicação.

Segundo Garcia (1999), às vezes a contaminação é tão alta que a perda do fermento é inevitável sendo necessário reiniciar todo o processo.

5.2.3. Bactérias lácticas

De acordo com Buchanan et al. (1974); Hofverdhal e Hagerdal (2000), as bactérias lácticas podem ter formato de cocos ou bacilos, são gram positivas, não esporulantes, fermentadoras de carboidratos, produtoras de ácidos e anaeróbias.

Segundo Holt et al (1994), o gênero *Lactobacillus* compreende células na forma de bastonetes medindo 0,5–1,2 x 1,0–10µm, geralmente longos. A temperatura ótima de crescimento está entre 30 – 40°C.

As bactérias produtoras de ácido lático encontrada na produção de álcool são as mais nocivas, devido a sua habilidade de sobreviver em temperatura ótima entre 30 e 40°C e pH ótimo de 5,5 – 6,0. Nestas condições, as bactérias lácticas se reproduzem bem mais rápido que as leveduras (NARENDRANATH, 2003).

Apesar das bactérias lácticas serem exigentes nutricionalmente, o caldo em processo parece conter quantidades adequadas de aminoácidos, vitaminas e minerais para seu crescimento, e causam significantes perdas de sacarose por inversão durante o curto período antes da etapa de clarificação. Muitas espécies excretam gomas extracelulares, as quais ajudam a proteger as células dos efeitos letais do calor e dos agentes químicos (TILBURY, 1975).

Cherubin (2003) afirma que as bactérias lácticas podem ser encontradas na cana de açúcar, no início do processo e nos mostos, chegando até as dornas de fermentação.

Em condições de processo alcoólico as bactérias lácticas se desenvolvem bem rápido, pois toleram altas temperaturas, pH baixos e altos teores de álcool. Na ausência de oxigênio, ou seja, em anaerobiose metabolizam a glicose em ácido lático para obter energia e assim reduzem o volume de álcool produzido na fermentação. (NARENDRANATH et al., 1997).

Segundo Alcarde e Yokoya (2003), as bactérias lácticas também causam o indesejado fenômeno da floculação das leveduras na fermentação, induzida por *L. plantarum*, *L. fructivorans*, *L. fructuosus* e *L. buchneri*. Esse fenômeno ocorre por interação entre componentes protéicos da parede celular dessas bactérias, potencializado pela presença de íons cálcio no meio, como mostra a Figura 7.

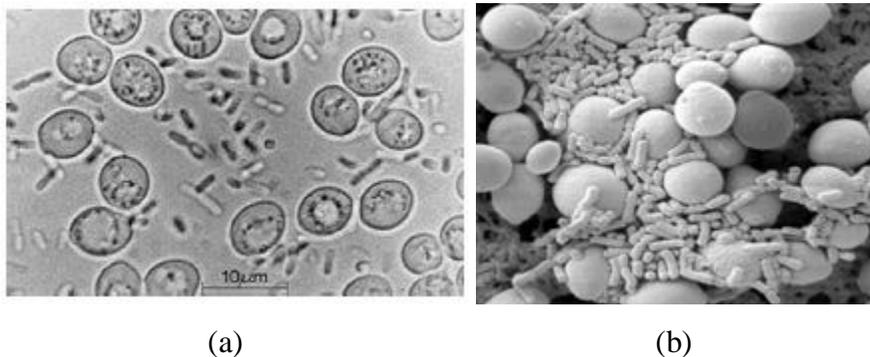


Figura 7. Leveduras e lactobacilos dispersos (a) e floculados (b) em fermentação etanólica.

Fonte: Russell, 2003; Godoy, 2002.

6 ÁCIDO LÁTICO

Segundo Zhuou et al., (2003), o ácido lático é um ácido orgânico, formado por um carbono-β assimétrico e possui dois enantiômeros: um L(+), um L(-), como mostra a figura 6 e um D L racêmico, obtido através de síntese química.

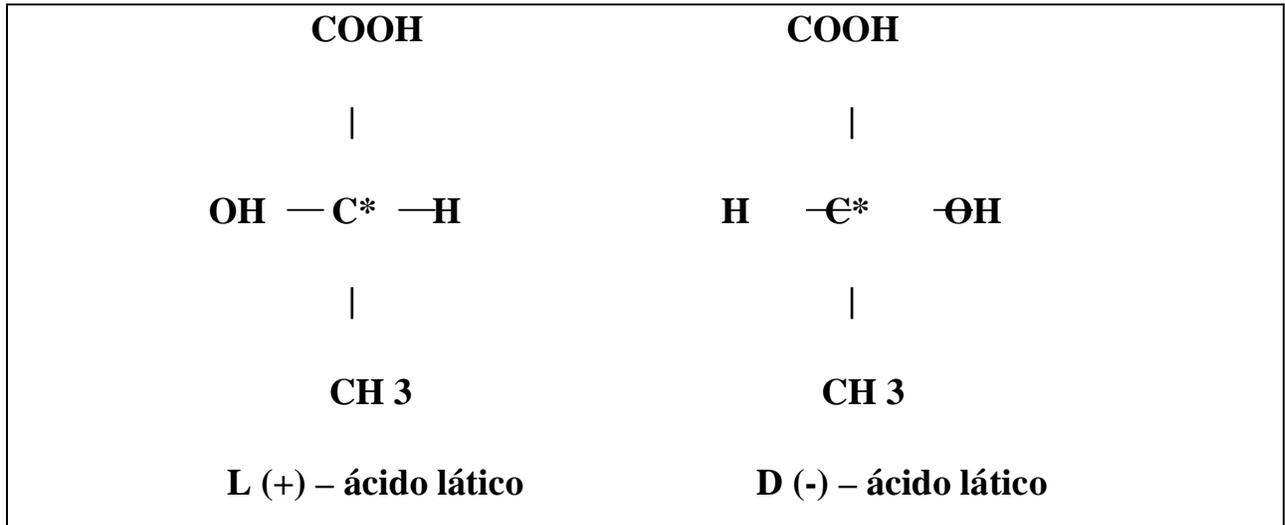


Figura 8- Molécula de ácido lático

Fonte: WINDHOLZ, et al., 1976

O ácido lático dextrorotatório L (+), é encontrado no sangue e nos músculos de homens e animais, é conhecido quimicamente como 2-hidroxipropiônico, fórmula molecular $C_3H_6O_3$, massa molar 98,08 e ponto de fusão $53^\circ C$, pK a $25^\circ C$ igual a 3,79, e podem formar sais com diversos metais. O D(-) ácido lático é conhecido como (R) -2-hidroxipropiônico, tem a mesma massa molar do L(+), mesma fórmula molecular, mesmo ponto de fusão, porém com pK igual a 3,83, diferentemente do L(+). É obtido através da conversão do DL ácido lático na fermentação da glicose, via bactérias do gênero *Lactobacillus Leichmannii*. O DL ácido lático é encontrado no leite azedo devido a fermentação de bactérias lácticas, em melaços, maçãs e outras frutas, suco de tomate, cerveja vinhos e outros (WINDHOLZ, et al., 1976).

De acordo com Macmaster; Ravno (1977) em pesquisas realizadas em diversas usinas, foi constatado que o ácido lático não estava presente na cana colhida fresca, mas sim na cana com um certo tempo depois de colhida, resultado da fermentação bacteriana na presença de sacarose durante esse período de espera como mostra a tabela 4.

Tabela 4. Quantidade de Ácido Lático em caldo de cana colhida, com diferentes períodos entre a queima, corte e o processamento.

Amostra	Espera (h)	Brix (%)	Ácido Lático (mg/L)	Ácido Lático (mg/Kg de SD)
A1	15	20,6	10	48,5
A2	22	19,4	40	206,2
B1	36	18,5	22	118,9
B2	48	21,8	24	110,1
C1	38	15,9	112	704,4
C2	60	17,3	184	1063,6
D1	80	18,2	234	1285,7
D2	86	16,4	297	1810,1

SD: Sólidos soluveis

Fonte: Ventura, 2007, p.56.

O ácido lático dentre os metabólicos microbianos da fermentação alcoólica é o maior componente, ele afeta o crescimento das leveduras e diminui a produção de álcool. (ESSIAN-NGANG et al., 1989).

Segundo Alves (1994), a produção de ácido lático segue a mesma tendência da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica, e que o ácido lático constitui um parametro preciso para detectar a extensão da contaminação.

Amorim et al. (1996), afirma que a contaminação por ácido lático é proporcional ao número de bactérias na fermentação alcoólica. Como consequência da produção do ácido lático as células das leveduras são inibidas e seu crescimento prejudicados, pois o ácido lático exerce um efeito tóxico sobre as células. Com o pH baixo o ácido lático não dissociado difunde através da membrana plasmática, e já no citoplasma devido ao pH intracelular ele se dissocia e no bombeamento dos prótons para fora da célula gera um consumo de ATP (DORTA et.,2000; NARENDRANATH, et al., 1997; VENTURA, 2007).

Segundo Ventura (2007), as perdas no processo de produção de etanol devido ao ácido lático produzido pelas bactérias, em fermentações onde o teor de ácido lático superou 774 mg.L^{-1} , observou-se a redução do teor de álcool, redução no crescimento das leveduras e mostrou aumento da floculação, como mostra a tabela 5.

Tabela 5. Parâmetros de vinhos obtidos de fermentação de mosto de melação por leveduras com bactérias lácticas, ocorrido em batelada por 9h, a 32°C sob agitação.

Fermentações	U.F. C (x 10 ⁶ mL ⁻¹)	Ácido láctico produzido (mg/L ⁻¹)	Teor alcoólico (%)	Leveduras (10 ⁸ mL ⁻¹)	Viabilidade levedura (%)	Floculação Média (%)
01, 02,03	0,01	20,7	4,72	3,02	84,36	4
04, 05,06	12,8	1089	3,8	1,6	76,92	92
06, 08,09	5,4	774	4,25	1,86	78,54	74
10, 11,12	o, 40	369	4,38	2,14	79,23	44
13, 14,15	0,1	108	4,7	2,32	81,57	12
16	0,05	37,8	4,84	2,68	83,12	6

Fonte: VENTURA, 2007, p. 16

6.1 QUANTIFICAÇÕES DO ÁCIDO LÁTICO

Devido aos impactos causados pelo ácido láctico na fermentação alcoólica foi necessário medi-lo em diferentes etapas do processo, pois onde há a presença aumentada das bactérias, também há aumento de ácido láctico. (AMORIM, 1996).

Segundo Gomide (1979), nos cálculos de balanço de massa em estequiometria industrial pode ser usado para quantificar a massa de ácido láctico produzido na fermentação, como mostra a equação 2.

$$QAL = QV \times VV - (QM \times VM - QL \times VL) \quad (2)$$

Onde:

QV = Teor ácido láctico no vinho (mg/L)

VV = Volume de vinho fermentado (m³)

QM = Teor ácido láctico no mosto (mg/L)

VM = Volume de mosto (m³)

QL = Ácido láctico no levedo (mg/L)

VL = Volume de levedo inoculado no fermentador (pé-de-cuba) (m³)

De acordo com Ventura (2008), é importante saber interpretar os resultados obtidos pelas medições, assim como mostra a tabela 6.

Tabela 6. Tabela que apresenta os resultados das concentrações de ácido láctico, bem como as condições da fermentação e quantidade de bastonetes por mL.

Contagem microscópica (bast/mL)	Teor Ácido Lático mg/l	Condição da Fermentação
$< 5 \times 10^5$	< 300	Excelente
$5 \times 10^5 - 5 \times 10^6$	301-500	Bom
$6 \times 10^6 - 5 \times 10^7$	600-1200	Regular
$6 \times 10^7 - 9 \times 10^7$	1300-1900	Preocupante
$> 1 \times 10^8$	≥ 2000	Muito Ruim

Fonte: Ventura (2008), p. 69.

De acordo com a tabela, o teor de ácido láctico em fermentação é relativo a quantidade de bactérias e, cada resultado, serve como parâmetro para classificar as condições do processo fermentativo, podendo ir de excelente a muito ruim.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que a contaminação bacteriana é responsável direta pela redução na produção de etanol na fermentação etanólica e é evidenciada pelo desenvolvimento das bactérias lácticas.

A formação de ácido láctico através das bactérias pode ocorrer em diversos estágios do processo, podendo estar até mesmo presente na cana. A quantidade de ácido láctico na matéria-prima pode ser um indicador da qualidade microbiológica.

A maior formação de ácido láctico ocorre na fermentação etanólica, variando em número e espécie de bactérias contaminantes.

Para minimizar ou reduzir a contaminação por bactérias lácticas deve-se ter um controle microbiológico eficiente nas diferentes etapas do processo produtivo; além de controlar a qualidade da matéria-prima. Também é importante que todos que estão envolvidos na cadeia produtiva do etanol se conscientizem de que as maiores perdas estão no que olhos não podem ver, através de micro-organismos tão pequenos e capazes de destruir a fermentação em um curto espaço de tempo.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS. **Worshop produção de etanol**.2006.Disponível em< http://www.apta.sp.gov.br/cana/anexos/termo_referencia_etanol.pdf> Acesso em: 15 out. 2011.

AGROFT BRASIL. **Descoberto agente de contaminação industrial nas destilarias de cana-de-açúcar**. Agrosoft Brasil, 26 ago. 2008. Disponível em: < [www. agrosoft .org.br/agropag/102125.htm](http://www.agrosoft.org.br/agropag/102125.htm)>. Acesso em: 26 out. 2011.

ALBUQUERQUE, M. F. **Processo de Fabricação de Açúcar**. 2 ed. Recife: UFPE, 2010.

ALCARDE, V. E.; YOKOYA, F. **Efeito da população de bactérias na floculação de leveduras isoladas de processos industriais de fermentação alcoólica**. STAB – Açúcar, álcool e subprodutos, Piracicaba, v. 21, n. 4, p. 40-42, 2003.

ALVES, D. M. G. **Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos, bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica**. 1994. 251 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.

AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; ALVES, M. D. G. **Processos de produção de álcool – controle e monitoramento**. Piracicaba: FERMENTEC/ ESALQ/USP, 1996.

AMORIM, H. V. **Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia**. Piracicaba: Fermentec, 2005. 448p.

AMORIM, H. V. **Qualidade da cana e o impacto no pagamento da cana e na indústria**. Controle e monitoramento. Piracicaba: Fermentec, 2011.

ASSOCIAÇÃO DOS PROFISSIONAIS DA QUÍMICA NO ESTADO DE ALAGOAS. **Manual de operação das destilarias de álcool etílico**. Alagoas, [198-?].

BAI, F, W.; ANDERSON, W, A.; MOO-YOUNG, M. **Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstock**. *Biotechnology Advances*, Oxford, Inglaterra, v. 26, n. 1, p.89-105, 2007.

BORZANI, W. et al. **Biotecnologia Industrial: fundamentos**. São Paulo, SP, Editora Edgard Blucher, 2001. v.1

BUCHANAN, R.E.; et al. **Bergey's Manual of Determinative bacteriology**. 8 ed. Baltimore: The Willians & Wilkins Company, 1974.

CABRINI, K, T.; GALLO, C. R. **Identificação de leveduras contaminantes no processo de fermentação alcoólica na Usina Santa Elisa**. STAB, Piracicaba, v.17, n 4, p. 48-50, 1999.

CASTRO, M. M. S. **Leveduras contaminantes do processo de fermentação alcoólica: diversidade toxiconômica e metabólica**. 1995. 124p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

CECCATO-ANTONINI, S.R. **Monitoramento microbiológico em destilarias: uma necessidade**. STAB, Piracicaba, v. 16, n. 5, p. 18-19, 1998.

CECCATO- ANTONINI. S. R. **Microbiologia da fermentação alcoólica: a importância do monitoramento microbiológico em destilarias**. São Carlo: EdUFSCar, 2010. 105 p.

CHERUBIM, R, A, **Efeitos da viabilidade da Levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 2003.124f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

DORTA, C.; OLIVA-NETO, P.; DE ABREU-NETO, M. S.; NICOLAU-JUNIOR, N.; NAGASHIMA, A. I. **Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 e M26)**. World Journal of Microbiology & Biotechnology, Oxford, EUA, v. 22, p. 177-182, 2006.

ESSIA-NGANG, J. J. E.; LETOURNEAU, F.; VILLA, P. **Alcoholic fermentation of beet molasses: effects of lactic acid on yeast fermentation parameters**. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, v. 31, n. 2, p. 125-128, 1989.

GALLO, C. R.; CANHOS, V. P. **Efeito do tratamento ácido do fermento sobre a microbiota bacteriana contaminante da fermentação alcoólica**. STAB – Açúcar, álcool e subprodutos, Piracicaba, v. 9, n.6.,1991a.

GARCIA, C.E. **Efeito do nível de contaminação de bactérias isoladas de processo industrial de fermentação alcoólica, na floculação de levedura.** 1989. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1989.

GODOY, A. Contaminação bacteriana: efeitos na fermentação. In: **Encontros Fermentec-Reunião Anual**, 23. Piracicaba: Fermentec, 2002. 90 slides em MS Power Point.

GOMIDE, R. **Estequiometria industrial.** 2. ed. São Paulo: Ed. do autor, 1979.

HOFVENDAHL, K.; HÄGERDAL-HAHN, B. **Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources.** Enzyme and Microbial Technology, v. 26, p. 87-107, 2000.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, J. T.; STALEY, J. T. WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology.** 9 th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica.** 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2000.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W **Biotechnologia Industrial.**São Paulo: editora Edgard Blucher, 2001.

LIMA, L, R.; MARCONDES, A, A. **Álcool Carburante: Uma Estratégia Brasileira.** Curitiba: Editora UFPR, 248p. , 2002.

LIMA, U. de A., AQUARONE, E., BORZANI, W. **Tecnologia das Fermentações,** São Paulo, SP, Editora Edgard Blucher, 1986. v.1.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. **Produção de etanol.** In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDL, W. **Biotechnologia industrial.** São Paulo: Edgar Blücher, 2001. v. 3, cap. 1, p. 1-43.

MCMMASTER, L.; RAVNÖ, A. B. **The occurrence of lactic acid and associated microorganisms in cane sugar processing.** In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 1977, São Paulo. **Anais...** São Paulo: INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS -ISSCT, 1977. p. 2679-2693.

MENEZHIN, S. P. et al. **Avaliação do Emprego de Dióxido de Cloro como Antibacteriano na Fermentação Alcoólica.** In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 16, 2007. Curitiba. **Anais...**, Curitiba: [s.n], 2007. 7p.

MORENO, A. **Principais perdas são as que não se medem.** Jornal Cana, Ribeirão Preto, p. 48-49, mar. 2005.

MUTTON. M. J. R. workshop sobre produção de etanol: **Qualidade da Matéria-prima.** 30/05/2008. VIII Seminário sobre Inovações Tecnológicas STAB – Ribeirão Preto – SP. CD Room.

NARENDRANATH, N. V.; HYNES, S. H.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. **Effects of Lactobacilli on Yeast-Catalyzed Ethanol Fermentations.** Applied and Environmental Microbiology, Saskatoon, n.11, p.4158–4163, nov.1997.v.63.

NARENDRANATH, N. V. **Bacterial contamination and control in ethanol Production.** In: JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. (Ed.). **The alcohol textbook.** 4th ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2003. Chapter 20, p. 287-298.

Thaís Yumi Shinya, Pedro de Oliva Neto - **Susceptibilidade do Lactobacillus fermentum ao agente microbiano 3, 4,4' triclorocarbanilida.** Campus de Assis – Faculdade de Ciências e Letras de Assis – Ciências Biológicas. 1991. Disponível em: <http://prope.unesp.br/xxi_cic/27_37007593801.pdf>. Acesso em 10 out. 2011.

PACHECO, T, F, **Fermentação alcoólica com levedura de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente.** 2010. 107f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)- Universidade Federal de Uberlândia. Disponível em: <http://www.btd.ufu.br/de_arquivos12TDE-2010-04-12T170946Z-1890PublicoThalita.pdf>. Acesso em 25 set. 2011.

RUSSEL, I. Understanding yeast Fundamentals. In: JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. (Ed.). **The alcohol textbook.** 4 th ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2003. chapter 9. P. 85-119.

SANTOS, F.et al. **Cana-de-açúcar:** bioenergia, açúcar e álcool- tecnologias e perspectivas.Viçosa, MG, 2010.

SOUZA, C. S. **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *S. cerevisiae***. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação Interinidades em Biotecnologia (USP), Instituto Butantan (IPT), São Paulo, SP, Brasil, 2009.

SOUZA- FILHO, E. et al.; **yeast population dynamics of industrial fuel- ethanol fermentation process** assessed by PCR- fingerprinting, p. 13-23, 2005.

SOUZA-LIBERAL, A. T. **Identificação molecular da levedura *Dekkera bruxellensis* como principal contaminante do processo de fermentação alcoólica industrial**. 2007. 70 p. Dissertação (Mestrado em Genética)- Centro de Ciências Biológicas, Universidade federal de Pernambuco, Recife, 2007.

STECKELBERG, C. **Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas**. 2001. 202 f. Tese (Doutorado em Desenvolvimento\ de Processos Biotecnológicos)-Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas), Campinas, 2001.

STUPIELLO, J. P.; HORII, J. **Condução da fermentação alcoólica**. Saccharum STAB, n. 17, p. 43-46, 1981. v. 4.

STUPIELLO, J. P. Curso de Qualidade da Matéria-prima. 2006 CD-Room.

TILBURY, R. H. **Occurrence and effects of lactic acid bacteria in the sugar industry**. In: CARR, J. G.; CUTTING, C. V.; WHITING, G. C. Lactic acid bacteria in Beverages and Food. London: Academic Press, 1975. p.177-191.

VENTURA, R.; ANGELIS, D. F. Importância do Monitoramento e Controle da Formação de Ácido Láctico na Produção de Etanol. In: Sinaferm/XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2007. Curitiba. Anais..., digital, 12p. Disponível em: < http://www.athena.biblioteca.unesp.br/exlibris/bd/brc/33004137041P2/2007/ventura_r_me_rcla.pdf > Acesso em 12 out.2011.

ZHOU, S.; CAUSEY, T. B.; HASONA, A.; SHANMUGAM, K. T.; INGRAM, L. O. Production of optically pure D-lactic acid in mineral salts medium by metabolically engineered *Escherichia coli* W3110. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 69, n. 1, p. 399-407, 2003.