

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

ELTON ANTONIO VITORETTI

**DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO LÁTICO AO FINAL DO
PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ETANÓLICA E A
RELAÇÃO DESTES TEORES COM A QUANTIDADE
DE BACTÉRIAS E A VIABILIDADE CELULAR DE
LEVEDURAS**

BAURU
2012

ELTON ANTONIO VITORETTI

**DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO LÁTICO AO FINAL DO
PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ETANÓLICA E A
RELAÇÃO DESTES TEORES COM A QUANTIDADE DE
BACTÉRIAS E A VIABILIDADE CELULAR DE
LEVEDURAS**

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 Profa. Dra. Ana Paula Cerino Coutinho.

BAURU
2012

V845q	<p data-bbox="548 1318 808 1346">Vitoretto, Elton Antonio</p> <p data-bbox="548 1381 1279 1493">Determinação do ácido láctico ao final do processo de fermentação etanólica e a relação destes teores com a quantidade de bactérias e a viabilidade celular de leveduras / Elton AntonioVitoretto -- 2012.</p> <p data-bbox="581 1503 667 1530">37f. : il.</p> <p data-bbox="581 1566 1192 1619">Orientadora : Profa. Dra. Ana Paula Cerino Coutinho Coorientadora : Profa. Me. Miriam Roberta Henrique</p> <p data-bbox="548 1654 1279 1707">Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.</p> <p data-bbox="548 1743 1279 1829">1. Ácido láctico. 2. Fermentação. 3. Bactérias lácticas. 4. Levedura. 5. Viabilidade celular. I. Coutinho, Ana Paula Cerino. II. Henrique, Miriam Roberta. III. Título.</p>
-------	---

ELTON ANTONIO VITORETTI

**DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO LÁTICO AO FINAL DO PROCESSO DE
FERMENTAÇÃO ETANÓLICA E A RELAÇÃO DESTES TEORES COM A
QUANTIDADE DE BACTÉRIAS E VIABILIDADE CELULAR DE
LEVEDURAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências Exatas e Sociais Aplicadas da Universidade do Sagrado Coração como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Química sob orientação da Profa. Dra. Ana Paula Cerino Coutinho.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Ana Paula Cerino Coutinho
Universidade do Sagrado Coração

Prof. Me. Dorival Roberto Rodrigues
Universidade do Sagrado Coração

Profa. Me. Setsuko Sato
Universidade do Sagrado Coração

Bauru, 11 de dezembro de 2012.

Dedico este trabalho à minha mãe Vicentina, ao meu finado pai José Vitoretti, à minha esposa Amanda e especialmente ao meu filho Juninho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, em especial à minha mãe Vicentina e à minha esposa Amanda pelo incentivo e paciência.

Agradeço à minha orientadora, a Profa. Dra. Ana Paula Cerino Coutinho, a acolhida, orientação, atenção, apoio e amizade.

A Profa. Me. Miriam Roberta Henrique, minha co-orientadora pela amizade, pelo material bibliográfico, pelos conhecimentos transmitidos durante várias etapas do trabalho.

Ao professor Me. Dorival Roberto Rodrigues, pela dedicação e conhecimentos transmitidos no decorrer do curso.

Agradeço aos demais professores do curso de Química da Universidade Sagrado Coração os ensinamentos e experiências compartilhadas.

À bióloga Roberta Bronzato pela ajuda nas análises realizadas durante a elaboração do trabalho.

Aos meus colegas de trabalho da Usina São Manoel, agradeço a “força”, incentivo e companheirismo.

Agradeço à Usina São Manoel a bolsa de estudos oferecida.

Agradeço a todos os colegas de classe, especialmente ao Reyson e ao Jeisson a amizade e companheirismo nestes quatro anos de curso.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo quantificar o ácido L-lático presente no final do processo de fermentação da Usina São Manoel, e relacioná-lo com a quantidade de bactérias lácticas e viabilidade celular da levedura. O ácido lático, que é uma substância excretada por bactérias lácticas, representa perdas de rendimento e afeta o metabolismo da levedura. As análises para quantificar essa substância foram realizadas por meio de aparelho dotado de enzimas lactato oxidase imobilizadas, que são específicas para o isômero L(+) lactato. Os resultados foram relacionados com os valores obtidos das análises rotineiras de contagem de bactérias lácticas totais e viabilidade celular da levedura, que são realizadas por técnicas de coloração, onde as células viáveis não absorvem a cor dos pigmentos do reagente e as não viáveis absorvem a coloração. O teor de ácido lático quantificado no vinho de levedurado no final da fermentação variou entre 405 a 1422 mg/L, estabelecendo uma relação proporcional com o número de bactérias presente no vinho levedurado, que variou entre $3,30 \times 10^6$ a $2,51 \times 10^7$ UFC/mL. Já a viabilidade celular da levedura variou entre 86,5 a 96,3%, também podendo ser relacionada com o número de bactérias e quantidade de ácido lático, pois os dois são inibidores do metabolismo deste micro-organismo. A análise de quantificação de ácido lático pode ser considerada uma medida auxiliar no controle do processo fermentativo, pois não é a única medida realizada, pois também considera-se outros parâmetros no processo.

Palavras-chave: Ácidolático.Fermentação.Bactérias Láticas.
Levedura.ViabilidadeCelular.

ABSTRACT

This study aimed to quantify the L-lactate acid present at the end of the fermentation process Plant São Manoel, and relate it to the amount of lactic acid bacteria and yeast cell viability, because this substance is excreted by lactic acid bacteria losses income and affects the metabolism of the yeast. Analyses were conducted by means of apparatus provided with immobilized lactate oxidase enzymes, which are specific for the isomer L (+) lactate. The results were related to the values obtained for routine analysis of total count of lactic acid bacteria and the yeast cell viability, which are performed by staining techniques, where viable cells did not absorb the color the pigments of reagents and absorb non-viable staining. The content of lactic acid in wine levedurado measured at the end of the fermentation was between 405 to 1422 mg/L, establishing a relationship with the number of bacteria present in wine levedurado, which ranged from $3,30 \times 10^6$ to $2,51 \times 10^7$ CFU/mL. As for yeast cell viability ranged from 86,5 to 96,3% may also be related to the number of bacteria and amount of lactic acid because both are inhibitors of the metabolism of the micro-organism. The analysis and quantification process, is not the only, but with other parameters used in the process.

Key words: Lactic Acid. Fermentation.LacticBacteria.Yeast.CellViability.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Reações ocorridas na glicólise	12
Figura 2 – Fluxograma da fermentação descontínua e descontínua alimentada	14
Figura 3 – Fluxograma da fermentação contínua	15
Figura 4 – Célula de levedura com suas respectivas estruturas	17
Figura 5 – Célula de bactéria com suas respectivas estruturas	19
Figura 6 – Esquema das vias do metabolismo das bactérias homofermentativas e heterofermentativas	22
Figura 7 – Esquema simplificado da reação e aparelho Accutrend Lactate®.....	28
Figura 8 – Relação entre ácido láctico e bactérias lácticas quantificados no vinho após o término da fermentação alcoólica	30
Figura 9 – Relação entre ácido láctico e viabilidade celular da levedura quantificados no vinho após o término da fermentação etanólica	32

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1	FERMENTAÇÃO.....	11
2.1.1	Produção de etanol em escala industrial	13
2.2	LEVEDURA	16
2.2.1	Leveduras utilizadas na produção de etanol	18
2.3	BACTÉRIA	19
2.3.1	Bactéria láctica	20
2.4	ÁCIDO LÁTICO E SUA INTERFERÊNCIA NA FERMENTAÇÃO ETANÓLICA.....	22
2.5	CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO BACTERIANA NA FERMENTAÇÃO ETANÓLICA.....	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	26
3.2	AMOSTRA E PONTO DE COLETA	26
3.3	MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	27
3.3.1	Medidor de ácido láctico portátil Accutrend Lactate®	27
3.3.2	Microscópio	27
3.4	MÉTODOS	27
3.4.1	Contagem de bastonetes/mL em microscópio ótico	27
3.4.2	Determinação da viabilidade celular da levedura	27
3.4.3	Determinação do ácido láctico	28
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1	ÁCIDO LÁTICO E BACTÉRIAS LÁTICAS	29
4.2	ÁCIDO LÁTICO E VIABILIDADE CELULAR DA LEVEUDRA	31
5	CONCLUSÃO	33
	REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, um dos maiores desafios mundiais é a busca por biocombustíveis que venham a substituir o petróleo, uma fonte de combustível fóssil, não renovável, extremamente poluente e com preços elevados. A segurança energética e as mudanças climáticas requerem uma substituição em larga escala dos combustíveis derivados do petróleo. (CIBIM, 2008).

Os biocombustíveis como uma fonte de energia sustentável, irão diminuir o impacto do aumento do preço do petróleo, preocupações ambientais como poluição do ar e gases do efeito estufa, e proporcionará oportunidades para as comunidades rurais. (VENTURA, 2007).

Até a década de 70, o etanol no Brasil era somente um subproduto das indústrias canavieiras. Com a crise do petróleo em 1973 o preço do barril triplicou em apenas três meses, obrigando o mundo a buscar alternativas energéticas sustentáveis. Então, em 1975 o Brasil lança o Proálcool (Programa Nacional do Álcool), que estimulava os empresários do setor proporcionando-os empréstimos a juros baixos e um bom preço de venda do produto. O Proálcool, extinto na década de 90, foi um dos mais importantes projetos do planeta para a produção de biocombustíveis, principalmente de etanol e biodiesel.

Na produção do etanol a etapa mais importante é a fermentação do caldo de cana-de-açúcar e/ou melaço por leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. As leveduras realizam a fermentação do açúcar com o objetivo de conseguir energia química (ATP- adenosina trifosfato) necessária para o seu crescimento, manutenção e multiplicação, sendo o etanol um subproduto desse processo. Parte do açúcar consumido acaba sendo desviado para a produção de células, bem como para a formação dos produtos secundários da fermentação (glicerol, ácidos orgânicos, alcoóis superiores, etc. (AMORIM et al., 1999).

Na etapa da fermentação, além das leveduras, também são encontrados microrganismos que prejudicam o rendimento deste processo provocando a diminuição na produção do etanol, o aumento no consumo de diversos insumos, como anti-espumante e dispersante, além de causarem problemas operacionais e perdas (ART- açúcares redutores totais) na cadeia produtiva.

Para diminuir os problemas causados pelos micro-organismos contaminantes é necessário o monitoramento da fermentação por análises microbiológicas. Isto

permite detectar e controlar os problemas provocados pela ação de micro-organismos indesejáveis nas várias etapas da produção. (AMORIM et al., 1999).

Os micro-organismos contaminantes mais comuns na fermentação são as bactérias láticas. Este grupo utiliza os carboidratos presente no meio fermentativo para produzirem ácido láctico, que é a substância excretada em maior quantidade no seu metabolismo. As bactérias láticas podem entrar no processo de fermentação de várias maneiras, isto depende do padrão de controle de cada indústria. Como a limpeza e desinfecção das plantas de etanol combustível não são rigorosas, os contaminantes podem se desenvolver nos tanques, linhas de transferências e trocadores de calor. (REED; NAGODAWITHANA, 1991).

Segundo Irvine e Friloux (1965 apud CIBIM, 2008), o aumento da contaminação na fermentação pode ser agravado pela geada que prejudica a cana, e também por doenças e parasitas como as aberturas procadas pela *Diatraea saccharalis* (broca do colmo), que facilitam a entrada de bactérias, fungos e leveduras nos colmos da cana aumentando a sua deterioração. Em casca e em colmos de cana a predominância era de bactérias láticas, sendo que 80% eram do gênero *Leuconostoc*, 10% eram do gênero *Lactobacillus* e 10% eram de outros gêneros.

No monitoramento feito por Oliva-Neto (1990), em seu artigo, ao final de 18 ciclos de uma fermentação mista com *Sacharomyces cerevisiae* (fermento de panificação) e *Lactobacillus fermentum*, a levedura ficou seriamente comprometida e as bactérias tiveram um grande crescimento, havendo uma diminuição de até 46,7% (comparado ao teórico) no rendimento etanólico, e sua produtividade teve uma diminuição de até 53,5% em relação às médias dos ciclos iniciais.

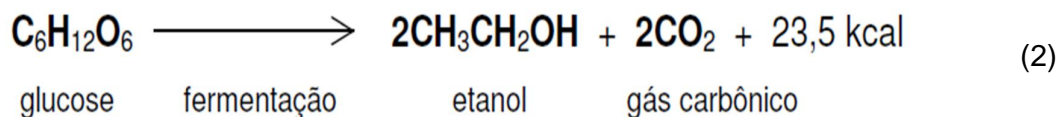
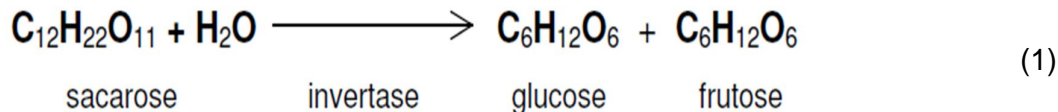
Em decorrência destas considerações, este trabalho tem o objetivo de determinar o ácido L-lático presente no final do processo de fermentação e relacioná-lo com a quantidade de bactérias láticas totais e a viabilidade celular da levedura.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FERMENTAÇÃO

A fermentação é um fenômeno bioquímico muito complexo e também um dos temas mais estudados da ciência. Civilizações antigas produziam bebidas que hoje sabemos que são resultantes de fermentação microbiana. (PELCZAR et al., 1996).

Essa constatação foi feita pela primeira vez por Antonie van Leewenhoek (1623-1723), ao observar amostras de cerveja em fermentação em seu microscópio rudimentar. Theodor Schwann demonstrou que as leveduras eram responsáveis pela fermentação, contrariando a teoria da decomposição química da matéria. Em 1815, Gay-Lussac propôs a estequiometria da reação da fermentação e, em 1863, Pasteur demonstrou a natureza anaeróbia da fermentação alcoólica. A partir de 1900, muitas pesquisas surgiram com o conhecimento das reações enzimáticas responsáveis pela transformação química de açúcares em etanol e gás carbônico no interior da levedura. (LIMA et al., 2001). Como mostram as reações (1) e (2).



O etanol pode ser produzido a partir de qualquer substrato que contenha quantidades suficientes de açúcares ou materiais que possam ser convertidos em açúcar, como amido ou celulose que, pela ação de enzimas apropriadas, podem ser convertidos a hexoses. (POWER, 2003).

Ventura (2007, p. 5) diz que,

Na fermentação a quebra da molécula de glicose em duas moléculas de piruvato é, provavelmente, o mais antigo mecanismo biológico para obtenção de energia a partir de moléculas orgânicas combustíveis, uma vez que os microorganismos viviam em uma atmosfera destituída de oxigênio. No curso da evolução, essa rota bioquímica foi conservada.

A figura 1 mostra a seqüência das reações de quebra da glicose em 2 moléculas de piruvato.

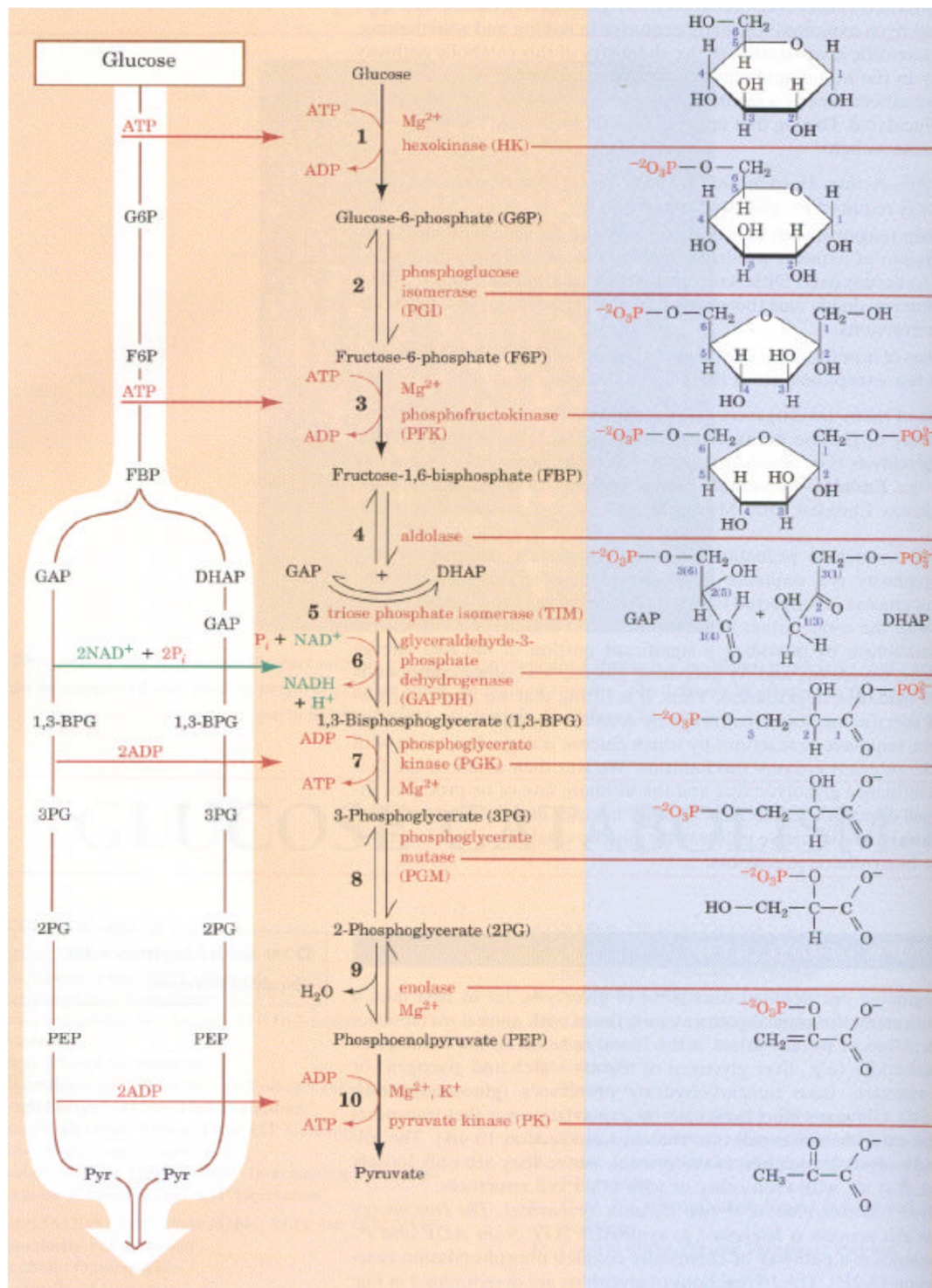
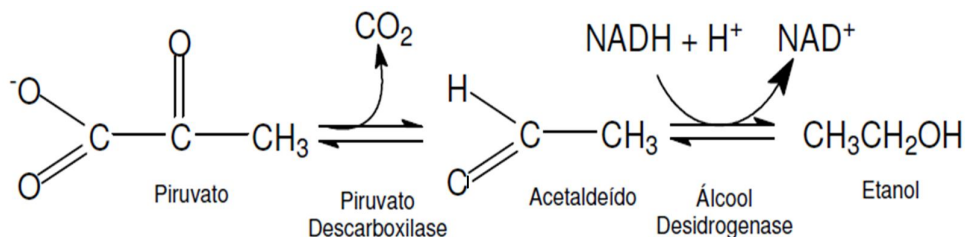


Figura 1 - Reações ocorridas na Glicólise.
Fonte: Pelczar (1997).

Na fermentação onde o micro-organismo utilizado é a levedura, o piruvato é convertido a etanol e CO_2 em duas etapas. Na primeira etapa o piruvato sofre uma descarboxilação catalisada pela enzima piruvato descarboxilase, na segunda etapa através da enzima álcool desidrogenase, o acetaldeído gerado é reduzido a etanol. Portanto, a levedura transforma glicose em etanol e CO_2 . (LEHNINGER et al., 2000), como mostra a reação abaixo.



2.1.1 Produção de etanol em escala industrial

A produção do etanol por via fermentativa é dividida em três fases: o preparo do substrato e do inóculo, a fermentação e a destilação.

O preparo do substrato é o tratamento da matéria-prima (mosto), da qual serão extraídos os açúcares fermentescíveis que resultarão no produto final, o etanol. O preparo do inóculo consiste em fornecer à levedura as condições ideais para que o processo fermentativo ocorra com uma boa eficiência, o microorganismo pode ser selecionado ou não.

A fermentação é comum a todos os substratos, portanto, após serem fermentados, são chamados de vinho levedurado, sendo uma mistura de substâncias líquidas, sólidas e gasosas de constituição variável. Na destilação do vinho, recupera-se o etanol dos demais componentes. (LIMA et al., 2001).

O processo de fermentação pode ser conduzido de três maneiras distintas, são elas: descontínuo, descontínuo alimentado e contínuo. Os dois tipos mais utilizados no Brasil são o descontínuo alimentado e o contínuo (DORTA, 2006). A similaridade entre os três processos é que todos podem ter o reciclo do micro-organismo.

De acordo com Ventura (2007), no processo descontínuo, também conhecido como batelada (Fig. 2), cada dorna (reator da fermentação) recebe o inóculo previamente tratado contendo uma suspensão de células ativas, e o mosto, formando uma mistura que permanece no fermentador até o final do processo. A separação da levedura do vinho pode ser feita por centrifugação ou decantação, podendo ser tratada para posteriormente voltar a ser utilizada em um novo ciclo fermentativo.

A condução do processo descontínuo alimentado ou batelada alimentada (Fig. 2) permite maior controle do efeito inibitório do açúcar durante a fase inicial da fermentação, em que a alimentação pode ser controlada, aumentando gradualmente durante um período de 4h, o que resulta maior eficiência na produção do etanol num mesmo intervalo de tempo quando comparado com o processo descontínuo (WINKLER, 1991 apud DORTA, 2006). O processo descontínuo alimentado apresenta vantagens quanto ao controle de bactérias contaminantes.

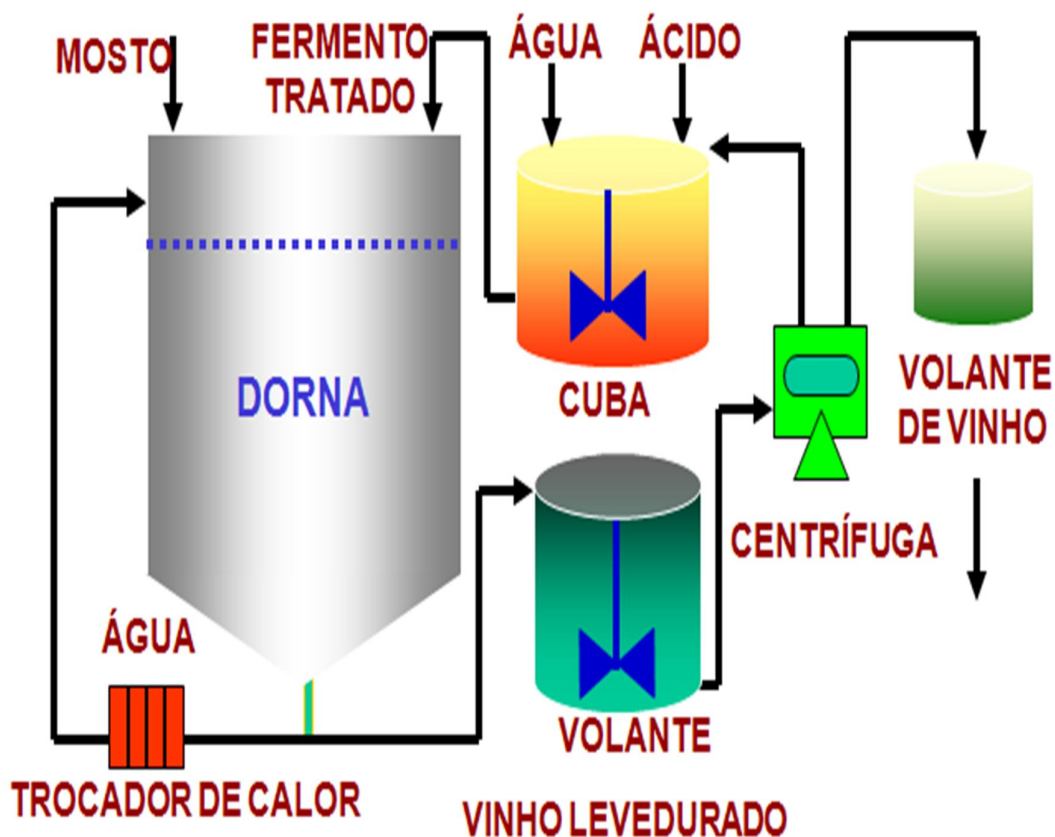


Figura 2 - Fluxograma da fermentação descontínua e descontínua alimentada.
Fonte: Elaborada pelo autor.

No processo contínuo (Fig. 3), o substrato e o inóculo são adicionados e retirados de forma contínua nas dornas de fermentação. É considerado um método mais vantajoso, pois inclui otimização das condições de processo conseguindo maior produtividade, maior capacidade volumétrica contínua, redução de custo em instalações e equipamentos (CYSEWSKI; WILKIE, 1978 apud DORTA, 2006). A maior desvantagem é a de que fermentações contínuas estão mais expostas a contaminações bacterianas, e exigem um profissional especializado.

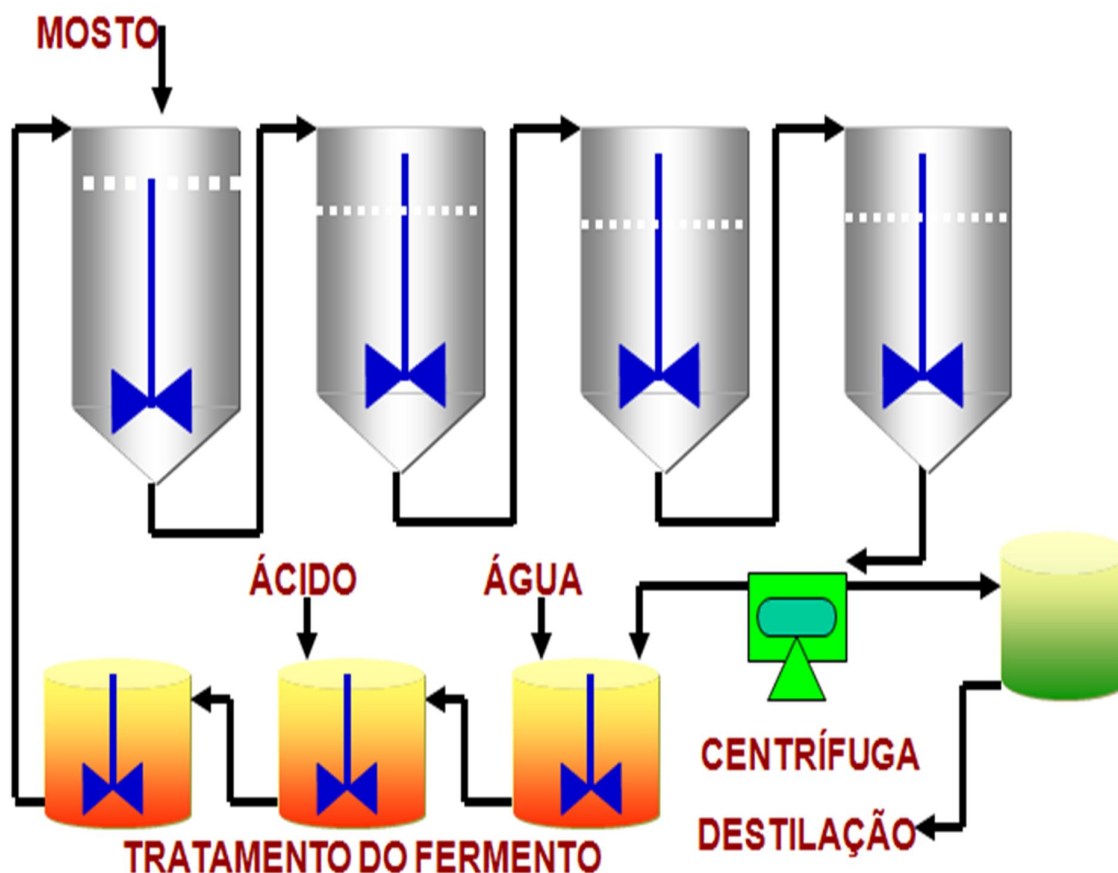


Figura 3 - Fluxograma da fermentação contínua.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Ventura (2007, p. 8) relata que,

Em microbiologia industrial, uma produção economicamente viável somente é possível se for realizada em grande escala. O etanol, por exemplo, é um composto comercializado em grandes quantidades e preços relativamente baixos; portanto o processo microbiano deve ser refinado e realizado com elevada eficiência.

Embora a obtenção de etanol por via fermentativa pareça um processo simples, são necessários alguns pré-requisitos essenciais. Talvez, o principal seja o uso de um micro-organismo com uma taxa de crescimento rápido, que mantenha uma uniformidade biológica durante o ciclo e que sintetize o produto de interesse com eficiência. (POWER, 2003).

A destilação é a recuperação do etanol contido no vinho produzido na fermentação em colunas de destilação por diferença de ponto de ebulição.

2.2 LEVEDURA

As leveduras, como os bolores e cogumelos, são fungos. Apresentam-se sob forma unicelular. A etimologia da palavra levedura tem origem no termo latino *levare* com o sentido de crescer ou fazer crescer, pois as primeiras leveduras descobertas estavam associadas a processos fermentativos, como o de pães, que provocam um aumento do volume da massa pela liberação de gás.

Os microorganismos fermentativos vêm sendo explorados pelo homem há milhares de anos, na produção de cerveja e do vinho e na fermentação do pão, embora, somente no século dezenove tenha sido reconhecida a natureza biológica dos agentes responsáveis por estes processos. (LEHNINGER et al., 2000).

A célula de levedura pode apresentar-se em formas globosas, esféricas, ovóides e alongadas, podendo ter sua morfologia alterada em função das condições em que são cultivadas. Não se deve levar em consideração somente a morfologia para se identificar uma espécie de levedura, pois uma mesma espécie pode apresentar mais de um tipo de morfologia. Quanto ao tamanho das células, podem variar de acordo com a idade e cultura, no caso das leveduras industriais podem variar de tamanho entre 1 a 5 μm de largura e 5 a 30 μm de comprimento. (PELCZAR et al., 1997).

A reprodução das leveduras pode ocorrer por reprodução vegetativa, que é a gemulação ou brotamento, onde aparece uma pequena saliência na parede celular vai aumentando gradualmente, tudo que tem na célula mãe também vai estar presente no broto.

Por reprodução sexuada, que é a formação de esporos sexuais através da associação de células diferenciadas por meiose ou mitose. As micro-estruturas que

compõem a célula são: parede celular, membrana citoplasmática, núcleo, um ou mais vacúolos e a mitocôndria. (PELCZAR et al., 1997), como mostra a figura 4.

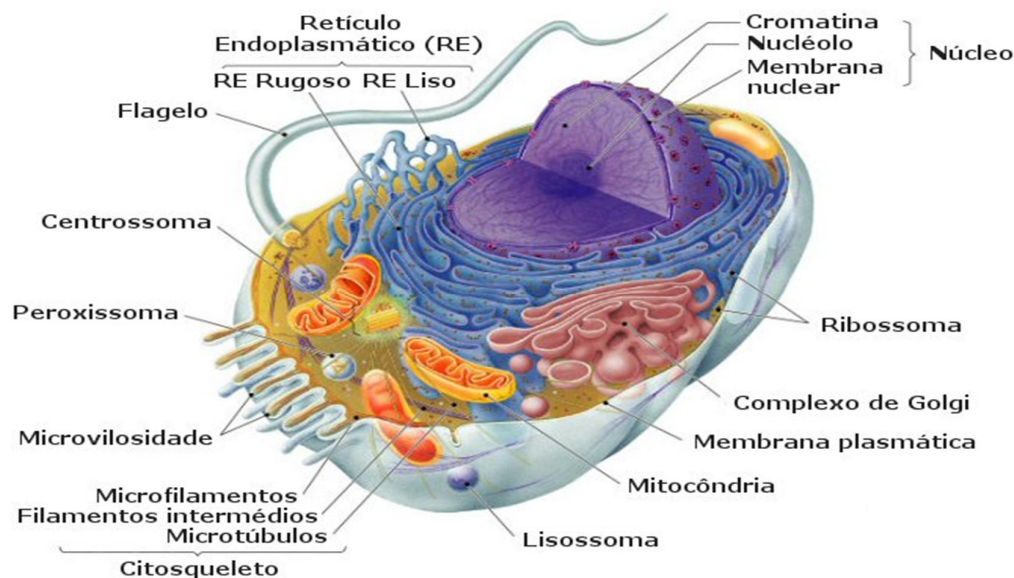


Figura 4 - Célula de levedura com suas respectivas estruturas.
Fonte: Pelczar (1997).

A levedura realiza a fermentação do açúcar com o objetivo de conseguir a energia química necessária para sua sobrevivência. O etanol é apenas um subproduto deste processo, assim, se o homem pretende beneficiar-se desta habilidade metabólica, ele precisa aprimorar seus conhecimentos em relação às melhores condições de condução do processo de fermentação para que as leveduras trabalhem a seu favor, convertendo com mais eficiência o açúcar em etanol. (AMORIM, 2005).

A utilização do açúcar pela célula de levedura pode ocorrer de duas formas distintas na respiração em que é degradado em presença de oxigênio (aerobiose) e na fermentação, processo em que não há presença de oxigênio (anaerobiose). O processo da respiração acontece na mitocôndria, onde o açúcar é transformado em apenas gás carbônico (CO_2) e água e cada molécula de glicose produzem 38 moléculas de ATP. Já a fermentação ocorre no citoplasma, onde o açúcar é convertido em gás carbônico e etanol como principais produtos e cada molécula de glicose produz apenas 2 de ATP. (AMORIM, 2005).

Quando as leveduras são cultivadas na presença de oxigênio, com baixa concentração de açúcar, o fluxo glicolítico é direcionado para o processo de respiração devido à alta atividade catalítica da enzima Piruvato Desidrogenase, de outra forma, em anaerobiose, com altas concentrações de açúcar, o fluxo é voltado para a fermentação sendo catalisada pela enzima Piruvato Descarboxilase. (BADOTTI, 2005 apud SALVATO, 2010).

2.2.1 Leveduras utilizadas na produção de etanol

O rendimento fermentativo de uma indústria depende muito do tipo de micro-organismo utilizado no processo. Para a produção de etanol, a levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae* é a mais adequada até o momento. Por se tratar de processos não estéreis, há necessidade de um micro-organismo resistente e capaz de suportar condições drásticas, bastante variáveis no decorrer do processo. (SALVATO, 2010).

É muito comum nas destilarias iniciar o processo fermentativo com uma determinada levedura, seja pelo costume de seu uso, como a *Saccharomyces cerevisiae*, pela facilidade de obtenção em grandes quantidades, pelo baixo custo como, por exemplo, leveduras de panificação, ou porque a mesma foi obtida por melhoramentos genéticos para melhor adaptação no processo industrial. (AMORIM et al., 1996).

No fim de safra é comum o isolamento dos micro-organismos do processo, e verificar que não é a mesma que foi introduzida no início da safra. Essas leveduras são chamadas de selvagens, nativas ou contaminantes, e habitam naturalmente a cana-de-açúcar, portanto, estão adaptadas ao substrato de alimentação das dornas, tem uma boa capacidade fermentativa e apresentam uma predominância sobre as outras espécies. Entre elas, também há leveduras nativas que, mesmo adaptadas ao substrato de alimentação, não conseguem sobreviver ao ambiente hostil das dornas. Estas são excluídas naturalmente do processo. (RODRIGUES; ANDRIETTA, 1995).

De acordo com Salvato (2010), com o aumento da produção mundial de etanol combustível, eleva-se também a busca por leveduras nativas com alto potencial fermentativo. A técnica utilizada para a identificação dessas leveduras é a cariotipagem, que identifica as linhagens pelo tamanho do DNA das cepas. Duas

das cepas mais utilizadas nas destilarias do estado de São Paulo foram selecionadas desta forma, sendo elas a PE-2 e a CAT-1, que apresentam alta produtividade, baixa produção de glicerol, pouca produção de espumas e não apresenta floculação. A cariotipagem fornece o gênero e a espécie da levedura, não o desempenho fermentativo; para isso existe o estudo bioquímico dos parâmetros fermentativos que permite a determinação de forma comparativa.

As cepas de levedura também podem ser modificadas geneticamente em laboratório buscando características desejáveis de acordo com o processo, e conseqüentemente tem-se um aumento da produtividade e diminuição de custos.

Segundo Salvato (2010, p. 35-36),

[...] é interessante desenvolver leveduras incapazes de hidrolisar a sacarose extracelularmente, mas que continuem fermentando este açúcar eficientemente. Assim poderia haver um aumento na produção de etanol já que seria diminuída a contaminação por outros micro-organismos que não possuem invertase e utilizam os monossacarídeos oriundos da hidrólise realizada pelas leveduras do processo.

2.3 BACTÉRIA

A bactéria é uma célula procariótica que pode se apresentar de três formas: elipsoidal ou esférica, bastonetes e espiralada ou helicoidal. As formas esféricas variam de tamanho e tem de 0,5 μm a 1,0 μm de diâmetro, já os bastonetes variam de 1,0 μm a 5,0 de comprimento e de 0,3 μm a 1,0 μm de largura. A célula bacteriana é composta por: membrana celular, citoplasma, material nuclear e flagelo em alguns tipos de bactérias. (PELCZAR et al., 1997). Como mostra a figura 5.

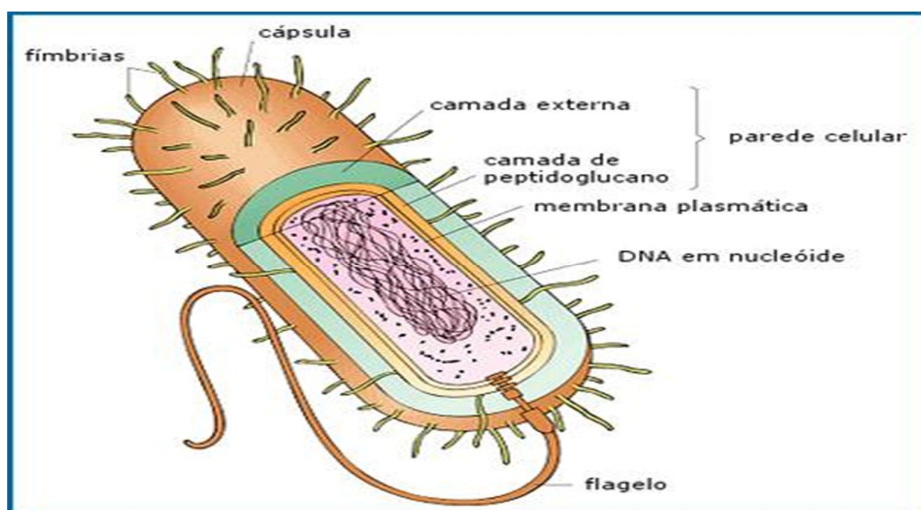


Figura 5 - Célula de bactéria com suas respectivas estruturas.
Fonte: jmlbiologia.zip.net.

O meio de reprodução bacteriana mais comum é a fissão binária. O processo se inicia com a replicação de DNA e o desenvolvimento de uma parede celular transversal, e, ao fim, a célula se divide em duas. O tempo de crescimento depende da espécie bacteriana e das condições do meio em que ela se encontra. As bactérias são capazes de crescer e se multiplicar utilizando diversos tipos de alimento e numa ampla faixa de condições físicas, mas cada espécie tem suas condições ideais de reprodução. (PELCZAR et al., 1997).

Existe também a reprodução por esporos, a bactéria mãe produz um esporo, que é formado no interior da célula e denominado endósporo. É uma célula bacteriana desidratada que pode ficar inativa durante muito tempo, quando esse esporo encontra o ambiente adequado, ele hidrata-se e transforma-se em uma bactéria ativa. Ele contém somente parte dos constituintes celulares e a sua forma e posição na célula é importante critério na classificação dos bacilos. (AMORIM et al., 1989).

No fim do século XX, analisando vinhos fermentados por leveduras, Pasteur notou que quando a bebida adquiria um gosto azedo e odor predominante de ácidos láctico e butírico, bactérias também estavam presentes no meio fermentativo. Assim, ele chegou à conclusão que o açúcar servia de alimento para os micro-organismos e cada substância formada era devida a um tipo de microorganismo específico. (KETCHUM, 1988).

Segundo Ventura (2007), a maior causa da diminuição do rendimento da produção de etanol durante a fermentação é devida à contaminação bacteriana. O açúcar consumido pelas bactérias é desviado da produção e é transformado em produtos indesejáveis, os quais são inibidores de crescimento e metabolismo da levedura.

2.3.1 Bactéria láctica

No início do século XX, estudos sobre as bactérias que causam a fermentação e coagulação do leite foram definidos como bactérias do ácido láctico (BAL). Esse conceito foi criado e existe até hoje, e é sinônimo de grande parte da família *Lactobacillaceae*. Estes grupos de bactérias são Gram-positivas, não esporulantes, fermentadoras de carboidratos, produtoras de ácido, ácido-tolerantes, não aeróbias, mas aerotolerantes. (YOKOYA et al., 1997).

As células (BAL) podem apresentar-se como bastonetes ou cocos, são exigentes quanto aos nutrientes do meio em que vivem e produzem ácido láctico como maior produto final do seu metabolismo. (ALVES, 1994).

De acordo com Lehninger et al. (2000), mesmo desprovidas de catalase, as bactérias lácticas conseguem crescer em condições aeróbicas. Mesmo incapazes de sintetizar ATP por meios respiratórios, as BAL não tem seu crescimento afetado pela presença ou ausência de ar. Elas podem ser divididas em subgrupos bioquímicos, de acordo com os produtos formados a partir da degradação de hexoses.

Segundo Narendranath (2003 apud VENTURA, 2007), a presença ou ausência da enzima aldolase é que determina a diferença entre os produtos formados na fermentação das bactérias lácticas homofermentativas e as heterofermentativas.

A bactéria láctica do gênero *Lactobacillus* pode ser classificada em três grupos distintos quanto à degradação de carboidratos; os três assemelham-se por degradarem apenas hexoses, e diferem pelo modo como o esqueleto carbônico de tais compostos é metabolizado.

No grupo formado pelas BAL homofermentativas, as hexoses são convertidas quase que exclusivamente em ácido láctico pela via Embden-Meyerhof (Fig. 8). Nesse grupo, 1 mol de hexose leva a formação de 2 mols de ácido láctico e 2 mols de ATP. (COSTA, 2006).

As BAL heterofermentativas obrigatórias, utilizam a via 6-fosfogluconato/fosfocetolase para a fermentação de hexoses (Fig. 8). Em anaerobiose, hexoses são convertidas em quantidades iguais de ácido láctico, etanol e/ou gás carbônico e ATP. Essas bactérias oxidam a glicose-6-fosfato transformando-a em gluconato-6-fosfato, o qual sofre descarboxilação (perda de uma molécula de gás carbônico), logo após, a ruptura da pentose resultante (xilulose-5-fosfato) em duas moléculas de três (gliceraldeído-3-fosfato) e dois (acetil-fosfato) átomos de carbono. O gliceraldeído-3-fosfato dá origem ao lactato enquanto que o acetil-fosfato pode seguir dois caminhos diferentes, formando etanol ou acetato. (COSTA, 2006).

Já no grupo das heterofermentativas facultativas, as hexoses são fermentadas de forma semelhante ao grupo homofermentativo, mas em condições de limitação de carboidratos, algumas espécies podem converter as hexoses em ácido láctico, ácido acético e/ou etanol (COSTA, 2006), como mostra a figura 6.

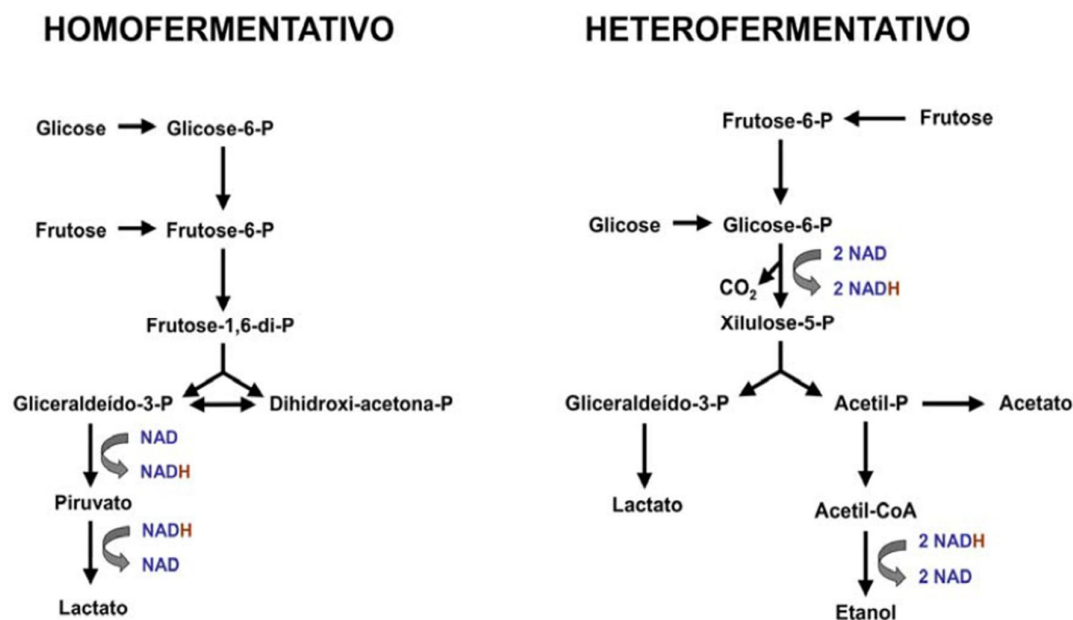


Figura 6 - Esquema simplificado das vias do metabolismo das bactérias homofermentativas e heterofermentativas.
Fonte: Costa (2006).

As bactérias lácticas podem produzir tanto o isômero L (+) como o D (-) ou mesmo uma mistura dos isômeros em proporções variáveis. Isto ocorre devido à existência de enzimas desidrogenases lácticas estereoespecíficas, produzindo os isômeros D e L separadamente, ao contrário dos animais e plantas superiores que produzem e metabolizam apenas o L (+) lactado, que por isso é considerado como não fisiológico na alimentação humana. (MANOME et al., 1998).

2.4 Ácido láctico e sua interferência na fermentação etanólica

O ácido láctico (ácido 2-hidroxi-propanóico) é um líquido viscoso, higroscópico, inodoro, de sabor azedo, tem ponto de fusão 53° C e ponto de ebulição 122° C. Além das bactérias, pode ser sintetizado nos tecidos musculares em atividades quando o oxigênio é limitado (DAINTITH, 1996). O ácido láctico é um ácido orgânico com um β -carbono assimétrico (centro quiral) que possui dois enantiômeros: L (+), D (-) e um DL racêmico que pode ser através de síntese química.

Isolado pela primeira vez por Scheele, no leite azedo, o ácido láctico foi o primeiro ácido orgânico produzido industrialmente por fermentação, nos EUA em 1980. Muito utilizado nas indústrias alimentícias, químicas e farmacêuticas, devido

às várias aplicações de seus derivados, tem um grande valor comercial. (PENNA et al., 2001).

O ácido láctico também é utilizado na produção de plásticos biodegradáveis a partir de fontes renováveis, em que a obtenção dos polímeros de ácido láctico necessita de isômeros puros do monômero, sendo que as formas D(-) e L (+) somente são obtidas separadamente por fermentação de substrato e bactérias específicas. (WEE et al., 2006).

Como já mencionado, o ácido láctico é o principal produto obtido na fermentação de bactérias lácticas, processo em que, pela degradação da glicose, se obtêm duas moléculas de piruvato que é reduzido a lactato, sendo a reação catalisada pela enzima piruvato desidrogenase. Mesmo existindo duas etapas de óxido-redução quando a glicose é transformada em lactato, ao final do processo o carbono não muda o estado de oxidação. (LEHNINGER et al., 2000).

Ventura (2007) relata a predominância do isômero L (+) sobre o isômero D (-) em fermentações conduzidas em laboratório.

A contaminação bacteriana está relacionada com o aumento da produção de ácido láctico e tal contaminação é a principal responsável pelos problemas na fermentação alcoólica na indústria. A formação desses inibidores afeta diretamente a taxa de crescimento da levedura e também a produção de etanol. (ALVES, 1994).

De acordo com Stupiello (1984), algumas substâncias que prejudicam a fermentação têm sua origem no próprio processo fermentativo. A levedura produz alguns ácidos orgânicos, mas em quantidades relativamente baixas se comparadas com as bactérias lácticas.

O efeito inibitório do ácido láctico sobre o crescimento da levedura depende do pH do meio, da concentração molar do ácido e sua constante de dissociação. Um ácido orgânico, quando em solução está em equilíbrio entre o estado dissociado e protonado, conforme a equação proposta por Henderson Hasselbach: $\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$, onde A^- é a espécie dissociada e HA é a não dissociada. Em pH acima de seu valor de pK_a mais de 50% do ácido está dissociado; a concentração do ácido não dissociado cresce com o declínio do pH. (SALMOND et al., 1984 apud VENTURA, 2007).

Cassio et al. (1987), em um estudo da cinética de absorção de ácido láctico não dissociado em diversos valores de pH, por células de *Saccharomyces cerevisiae* que perderam o seletividade próton-lactato em meio de glicose, mostraram que os

valores da constante de difusão aumentaram exponencialmente com o pH, linearmente com o aumento da concentração de próton extracelular. Desse modo, a difusão passiva de ácido láctico não dissociado através da membrana plasmática da levedura, aumenta com o pH decrescente devido o aumento do ácido não dissociado.

Segundo Booth e Kroll (1989, apud VENTURA, 2007), ácidos orgânicos fracos não dissociados difundem-se passivamente para o interior da célula da levedura até que o equilíbrio seja estabelecido através da membrana. A molécula do ácido entra no citoplasma, dissocia-se no devido pH intracelular. Os prótons liberados são bombeados para fora da célula ou são neutralizados pelo poder tampão do citoplasma.

Oliva-Neto (1990) ao estudar a influência da contaminação por *Lactobacillus* durante a fermentação etanólica por *Saccharomyces cerevisiae*, ao final de 18 ciclos, constataram que quando o número de células de *Lactobacillus fermentum* ultrapassou o número de células de *Sacharomyces cerevisiae*, o rendimento etanólico e a viabilidade da levedura diminuíram em até 46,7%. A diminuição da atividade catalítica foi atribuída à acidez que chegou a níveis superiores a 6g/L, expressos em ácido láctico.

Oliva-Neto (1990), a partir de amostras de “leite de levedura” em usinas do estado de São Paulo, isolando os micro-organismos, o principal contaminante da fermentação foi o do gênero *Lactobacillus*. A análise taxonômica demonstrou a predominância da bactéria *L. fermentum* com 62%, seguida por *L. murinus* com 9%, *L. vaccinostercus* com 9%, *L. plantarum* com 2% e *Leuconostoc* com 2%. Do total da referida microflora de bactérias, 64% resistiu a 10% (V:V) de etanol em cultivo isolado.

As bactérias como *Lactobacillus* e *Bacillus* possuem uma capa protéica de natureza gelatinosa, que possibilita a fixação mecânica das células de bactérias com as de levedura, ocorrendo à formação de flocos, processo chamado de floculação. Com isso, ocorre a deposição de leveduras no fundo das dornas, o tempo de fermentação tende a aumentar e a área de contato da célula de levedura com o substrato é reduzida, acarretando uma grande perda de rendimento na produção etanólica.(GALLO; CANHOS, 1991).

De acordo com Momose e Tonoike (1968, apud COSTA, 2006), a inibição do metabolismo da levedura está relacionada com a falta de vitaminas e aminoácidos no meio fermentativo, especialmente o ácido glutâmico.

2.5 Controle da contaminação bacteriana na fermentação etanólica

De acordo com Alcarde (1995), para controlar a contaminação bacteriana é preciso adequar o ambiente da fermentação etanólica. As dornas de fermentação devem ser esvaziadas e limpas regularmente, os trocadores de calor não devem ser compartilhados, evitar “pontos mortos” nas tubulações de mosto e de vinho, promover fermentações rápidas e com temperatura controlada. Os meios mais utilizados na indústria de etanol para o controle de bactérias incluem limpeza e sanitizações severas, lavagem ácida das leveduras, controle do pH do mosto e uso de antibióticos na fermentação.

A prática mais utilizada para controle de bactérias contaminantes nas destilarias brasileiras é a adição de ácido sulfúrico no tratamento da levedura pelo processo Melle-Boinot. Gallo e Canhos (1991), observaram uma diminuição de 44,38% na microbiota bacteriana presente no fermento tratado na cuba com ácido sulfúrico com pH 2,0 por duas horas.

Segundo Dorta (2006), o efeito combinado do ácido láctico, sulfito, pH e etanol no processo fermentativo inibem de modo sinérgico a levedura, sendo o ácido sulfúrico o que mais afeta o rendimento da fermentação quando usado em excesso.

O estudo realizado por Oliva-Neto e Yokoya (2001), aponta os antibióticos clindamicina e penicilina V ácida, como os produtos mais efetivos contra bactérias embora inócuos para a levedura, dentro de uma avaliação de diversos agentes químicos e alguns antibióticos utilizados no controle bacteriano na fermentação.

Andrietta et al. (1995) avaliaram cinco antimicrobianos aplicados em meio de cultivo inoculados com diversos *Bacillus* e *Lactobacillus*. A concentração inibitória mínima (C.I.M.) do antimicrobiano Virginiamicina de 0,25 ppm inibiu cinco das oito espécies de bactérias em estudo, enquanto o Fermacol inibiu duas com 0,25 ppm e uma com 2 ppm. O quaternário de amônia inibiu todas as oito bactérias com 10 ppm e o Cloranfenicol inibiu quatro com 4 ppm e uma com 8 ppm.

Muitas substâncias têm sido estudadas e utilizadas nas indústrias como métodos de desinfecção de mostos em fermentação como: álcalis, ácidos,

formaldeído, compostos fenólicos, peróxidos e antibióticos. Os dois últimos apresentam diversas vantagens, pois atuam imediatamente, sem afetar o microorganismo útil. (AQUARONE; SATO, 2001).

Tecnologias baseadas em métodos físicos para o controle de microorganismos também tem sido investigadas. Alcarde et al. (2003) avaliaram os efeitos da radiação gama e a radiação de microondas sobre mostos de cana-de-açúcar, contaminados com bactérias láticas.

Oliva-Neto e Yokoya (1997), avaliando o efeito da contaminação bacteriana na fermentação etanólica por leveduras, concluíram que algum tipo de controle bacteriano é necessário para que o sucesso e o rendimento desse processo sejam alcançados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O trabalho foi realizado na Usina São Manoel, município de São Manuel, estado de São Paulo, durante o período de 08/05 a 09/08/2012.

Na Usina São Manoel, o processo de produção de etanol é por fermentação contínua, o volume útil total dos reatores é de 2.800 m³ e a capacidade de produção diária é de 1.100 m³ de etanol, sendo 600 m³ de etanol anidro e 500 m³ de hidratado. A planta de fermentação é composta por três linhas de quatro fermentadores (total de 12) e uma única dorna pulmão (dorna final).

3.2 AMOSTRA E PONTO DE COLETA

Vinho fermentado levedurado: as amostras utilizadas nas análises foram feitas em coletas pontuais (2/dia), depois do término processo de fermentação coletado na dorna final. Foi utilizada, para efeito de resultados, a média aritmética dos valores resultantes das análises das coletas diárias.

3.3 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

3.3.1 Medidor de ácido láctico portátil Accutrend Lactate®

Utilizou-se este equipamento e seus reagentes e acessórios para determinar o ácido L-lático produzido no vinho da fermentação alcoólica.

3.3.2 Microscópio

Utilizou-se microscópio de campo claro, modelo OLYMPUS, com objetiva de 100 X com auxílio de óleo de imersão, para as análises de bastonetes/mL, também chamada na indústria sucroalcooleira de infecção/mL. Nas análises de viabilidade celular da levedura também foi utilizado microscópio de campo claro, modelo OLYMPUS com objetiva de 40 X, sendo as células contadas em câmara de Neubauer.

3.4 MÉTODOS

3.4.1 Contagem de bastonetes/mL em microscópio ótico

A contagem de bastonetes/mL utilizando microscópio é a técnica mais utilizada e difundida nas usinas e destilarias para determinação de infecção em amostras retiradas em diversos pontos da produção de etanol. É realizado utilizando como corantes, a solução de sulfato azul do Nilo e azul de metileno, para distinguir bastonetes viáveis (não corados) e bastonetes não viáveis (corados em azul), sendo contados somente os bastonetes viáveis em objetiva de imersão (Oliveira et al., 1996). É um método rápido, de precisão relativa e é utilizado em amostras com a população bacteriana acima de 10^5 bastonetes/mL (CTC, 2011).

3.4.2 Determinação da viabilidade celular da levedura

A viabilidade celular foi determinada por microscopia óptica mediante a coloração diferencial de células pela solução de azul de metileno, em que as células não viáveis adquirem a cor azul da solução, e as células viáveis não. Posteriormente

contadas em câmara de Neubauer, a viabilidade é estabelecida em porcentagem (%) mediante a relação entre as células viáveis e não viáveis (CTC, 2011).

3.4.3 Quantificação do ácido L-lático

A determinação da quantidade de ácido lático nas amostras foi realizada no analisador de L (+) lactato enzimático colorimétrico Accutrend Lactate® (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim-Alemanha).

A medição ocorre em duas etapas, na primeira, cerca de 25 µL da amostra são colocadas sobre uma tira reagente descartável. Na segunda, a tira reagente é introduzida no aparelho e após um minuto o resultado é lido no visor digital em milimol de ácido lático por litro (mmol/L).

A tira é impregnada com a enzima lactato oxidase, extraída de *Aerococcus viridans*. A amostra é aplicada na área amarela da tira que apresenta uma malha em sua superfície cuja função é reter células, a seguir, permeia a amostra até a zona de reação e detecção, uma camada de fibra de vidro contendo as enzimas imobilizadas. O lactato, em presença da enzima lactato oxidase é degradado a piruvato em um minuto, conforme o esquema simplificado abaixo.

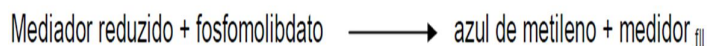
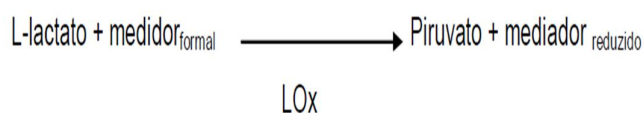


Figura 7- Esquema simplificado da reação e aparelho Accutrend Lactate®.
Fonte: Cibim (2008).

O aparelho Accutrend Lactate® é dotado de fotômetro de reflexão. O fotômetro avalia o resultado dos produtos da reação por colorimetria em 657 nm, o coeficiente de variação fica na média de 5% e a exatidão de 0.957.

Os resultados exibidos pelo aparelho em milimol por litro (mmol/L) foram convertidos em miligramas por litro (mg/L) ou partes por milhão (ppm) baseado na massa molar do ácido lático (90 g/mol). Esse aparelho foi escolhido pela disponibilidade no mercado e pela facilidade na compra das tiras medidas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ÁCIDO LÁTICO E BACTÉRIAS LÁTICAS

As determinações de ácido L-lático e da concentração de bactérias lácticas totais no vinho foram realizadas com objetivo de estabelecer uma relação entre estes resultados, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1 – Determinação do ácido L-lático relacionado com a quantidade de bactérias lácticas totais.

Amostra	Ácido Lático no vinho delevedurado (mg/L)	Conc. de bastonetes UFC/mL *
08/05/2012	450	5,28x10 ⁶
09/05/2012	405	1,43x10 ⁷
10/05/2012	432	6,60x10 ⁶
11/05/2012	495	5,50x10 ⁶
12/05/2012	450	4,18x10 ⁶
13/05/2012	495	5,50x10 ⁶
25/07/2012	918	1,30x10 ⁷
26/07/2012	657	4,84x10 ⁶
27/07/2012	558	1,12x10 ⁷
28/07/2012	522	3,30x10 ⁶
29/07/2012	432	5,94x10 ⁶
30/07/2012	1206	7,70x10 ⁶
03/08/2012	1287	1,76x10 ⁷
04/08/2012	1422	1,94x10 ⁷
05/08/2012	1278	2,51x10 ⁷
06/08/2012	1170	2,38x10 ⁷
07/08/2012	1188	1,69x10 ⁷
08/08/2012	1098	9,68x10 ⁶

*Unidade Formadora de Colônias
Fonte: Elaborado pelo autor

De acordo com a Tabela 1 observa-se que a quantidade de ácido lático no vinho delevedurado está diretamente ligada a população de bactérias lácticas, pois, em linhas gerais, o acréscimo do número de bactérias lácticas totais relaciona-se com o aumento da produção de ácido lático.

Cibim (2008), em seu estudo desenvolvido em várias usinas do estado de São Paulo encontrou uma forte correlação entre formação de ácido láctico e bactérias lácticas totais em vinhos de fermentação contínua e batelada.

Os resultados em que a quantidade de ácido láctico é alta em relação à quantidade de bactérias totais podem ser atribuídos à presença de ácido láctico no mosto.

Segundo Mac Master e Ravno (1977 apud VENTURA, 2007), o ácido láctico não é um constituinte natural da cana-de-açúcar, portanto, a ocorrência dessa substância indica a presença de bactérias ativas na matéria-prima. O teor de ácido láctico pode variar conforme o estágio de deterioração microbiológica da cana, que está relacionado ao tempo entre a queima, o corte e o processamento.

Segundo Ventura (2007), o ácido láctico também é formado por bactérias contaminantes na etapa de extração do caldo da cana, concluindo que a assepsia na moenda é de vital importância para controle microbiológico do caldo.

Para melhor visualização da relação entre o ácido láctico e concentração de bactérias lácticas totais, os resultados foram acomodados no gráfico mostrado na Figura 8.

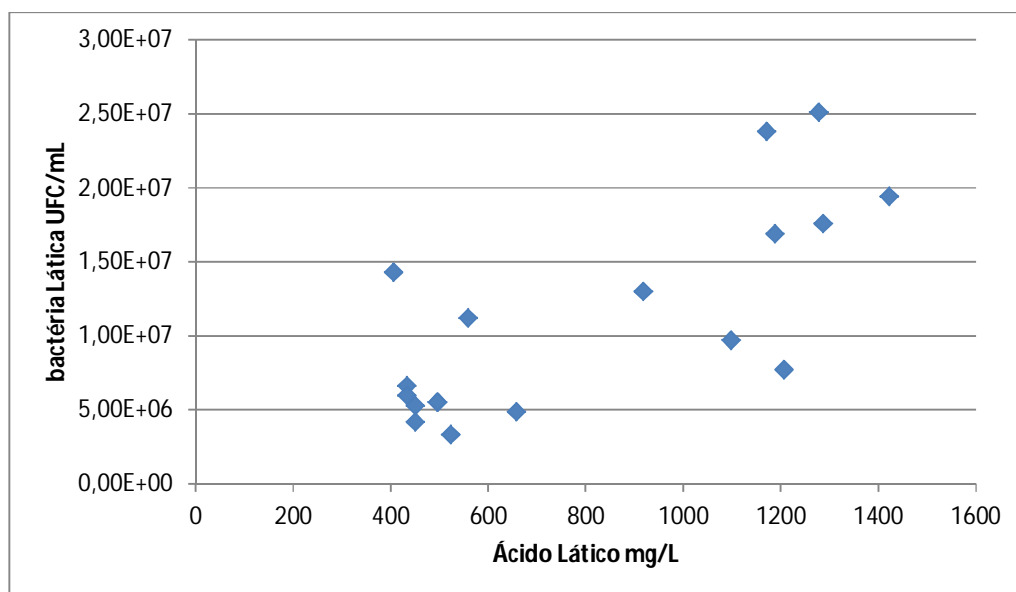


Figura 8—Relação entre ácido láctico e bactérias lácticas totais quantificadas no vinho após o término da fermentação alcoólica.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Ácido láctico e viabilidade celular da levedura

A determinação do teor de ácido L-láctico e as medidas de viabilidade celular da levedura foi realizada com objetivo de estabelecer uma relação entre os resultados, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2 – Quantificação do ácido láctico e viabilidade celular da levedura.

Amostra	Ácido Láctico no vinho delevedurado (mg/L)	Viabilidade celular (%)
08/05/2012	450	93,7
09/05/2012	405	96,3
10/05/2012	432	96,3
11/05/2012	495	91,3
12/05/2012	450	94,1
13/05/2012	495	92,8
25/07/2012	918	88,8
26/07/2012	657	91,3
27/07/2012	558	92
28/07/2012	522	94
29/07/2012	432	92,6
30/07/2012	1206	89,6
03/08/2012	1287	84,1
04/08/2012	1422	81,4
05/08/2012	1278	88,2
06/08/2012	1170	87,5
07/08/2012	1188	87,8
08/08/2012	1098	86,5

Fonte: Elaborado pelo autor

Com os resultados obtidos, observa-se que a quantidade de ácido láctico está diretamente ligada à viabilidade celular da levedura. O aumento desse metabólito excretado por bactérias lácticas inibe o metabolismo da levedura devido à mudança no meio fermentativo.

Ventura (2007) relata que o teor de ácido láctico está ligado diretamente com o metabolismo da levedura, refletido na viabilidade celular, no teor de álcool e também no aumento da floculação.

Segundo Dorta (2006), o efeito sinérgico do ácido láctico é agravado quando age em conjunto com outros fatores que também exercem efeitos inibitórios ao metabolismo da levedura como: pH e concentração de etanol no vinho.

Para melhor visualização da relação entre quantidade de ácido láctico e viabilidade celular da levedura, os resultados estão expressos na Figura 9.

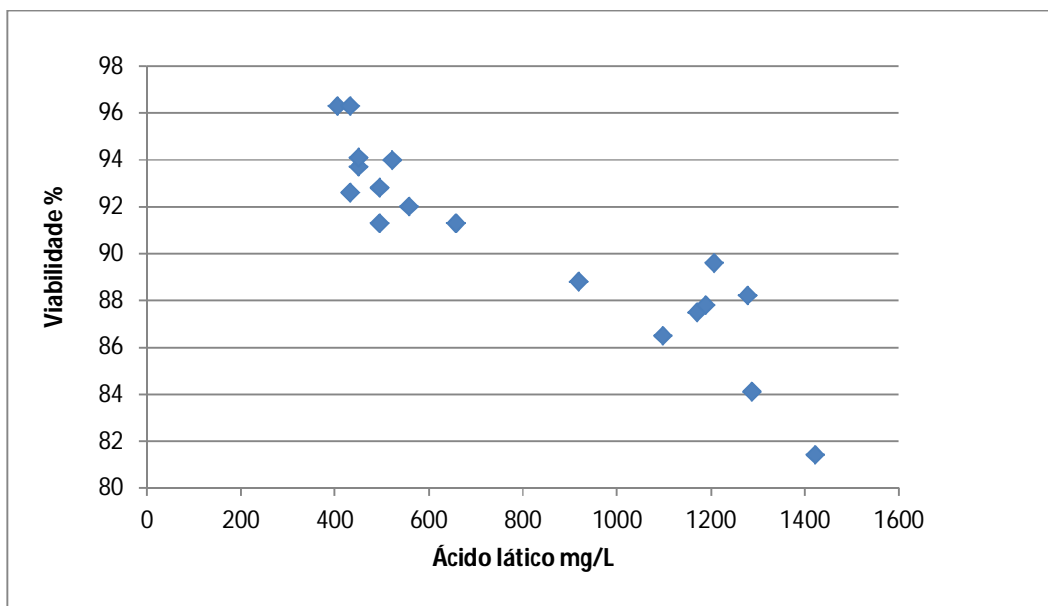


Figura 9 – Relação entre ácido láctico e viabilidade celular da levedura quantificados no vinho após o término da fermentação etanólica.
Fonte: Elaborado pelo autor.

5 CONCLUSÃO

O ácido láctico presente no processo de fermentação etanólica varia com a quantidade de bactérias lácticas totais, podendo notar certa proporcionalidade entre o aumento do teor de ácido com o aumento da população das bactérias.

Os resultados em que a quantidade de ácido láctico é alta em relação à quantidade de bactérias totais podem ser atribuídos à presença de ácido láctico no mosto.

À medida que aumenta o teor de ácido láctico na fermentação etanólica a viabilidade celular da levedura é cada vez mais afetada, ou seja, diminuindo relativamente a quantidade de células viáveis na fermentação.

A determinação do teor de ácido láctico presente na fermentação pode ser adotada como um método auxiliar rápido e de confiabilidade razoável no monitoramento da eficiência da fermentação etanólica.

REFERÊNCIAS

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

ALCARDE, V. E. **Avaliação de antimicrobianos na germinação de esporos e na multiplicação de bactérias isoladas de processos de fermentação**. 1995. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1995.

ALVES, D. M. G. **Fatores que afetam a produção de ácidos orgânicos, bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica**. 1994. 274 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.

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

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

AMORIM, H. V. et al. **Controle microbiológico no processo de fermentação alcoólica: plaqueamento**. Piracicaba: Fermentec, 1999.

AMORIM, H. V. et al. **Processos de fermentação alcoólica, seu controle e monitoramento**, Piracicaba: FERMENTEC; ESALQ, Departamento de ciência e Tecnologia de alimentos, 1989. 145p.

ANDRIETTA, M. G. S.; OLIVEIRA, A. J.; STUPIELLO, J. P. Determinação de concentração inibitória mínima para cinco antimicrobianos sobre bactérias G (+) isoladas na indústria brasileira de fermentação alcoólica. **STAB – Açúcar, álcool e subprodutos**, Piracicaba, v. 13, n. 6, p. 42-43. 1995.

AQUARONE, E.; SATO, S. Controle de contaminações em processos fermentativos. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDL, W. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v. 3, cap. 25, p. 583-593.

BORZANI, W. et al. **Biotecnologia Industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001.

CASSIO, F.; LEÃO, C.; VAN-UDEN, N. Transport of lactate and other shortchainmonocarboxylates in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, n. 3, p. 509-513, 1987.

CIBIM, I. L. **O uso do ácido láctico como medida auxiliar de avaliação da contaminação na fermentação alcoólica**. 2008. 85 f. Trabalho de conclusão de curso (Gestão e Produção de Açúcar e Álcool) - Centro Universitário Central Paulista e Instituto de Aperfeiçoamento Tecnológico, Piracicaba, 2008.

COSTA, V. M. **Perfil de metabólitos excretados por *Lactobacillus* isolados de processos industriais de produção de etanol, com ênfase nos isômeros óticos D(-) e L(+) do ácido láctico**. 2006. 66 f. Dissertação (Mestre em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

CTC – CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA. **Manual de métodos analíticos de controle químico da fermentação**. Piracicaba, 2011.

DAINTITH, J. **Adictionary of chemistry**. 3th ed. New York: Oxford University Press, 1996.

DORTA, C. **Sinergismo entre sulfito, ácido láctico, pH e etanol na fermentação alcoólica de *Saccharomyces cerevisiae***. 2006. 144 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

GALLO, C. R.; CANHOS, V. P. Contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica, **STAB:Açúcar, álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 9, p. 45-55, 1991.

KETCHUM, P. A. **Microbiology: concepts and applications**. New York: John Willey & Sons, 1988.

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

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: LIMA, U. A. et al. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v. 3. cap. 1, p. 1-43.

MANOME, A. et al. The ratio of L-form to D-form of lactic acid as a criteria for the identification of lactic acid bacteria. **Journal of General and Applied Microbiology**, Curitiba, v.44, p. 371-374, 1998.

OLIVA-NETO, P. **Influência da contaminação por bactérias lácticas na fermentação alcoólica pelo processo de batelada alimentada**. 1990. 190 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, Campinas, 1990.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Effects of nutritional factors on growth of *Lactobacillus fermentum* mixed with *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation. **Revista de microbiologia**, São Paulo, v. 28, p. 28-31, 1997.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria from the alcohol industry to several compounds. **Brazilian journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 10-14, 2001.

OLIVEIRA, A. J. et al. E. **Curso de treinamento em microbiologia**. Piracicaba: Fermentec, ESALQ, 1996.37p.

PELCZAR JR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996.v. 1.

PELCZAR JR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1997.

PENNA, T. C. V.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: produção de ácidos**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v. 3, cap. 2, p. 45-49.

POWER, R. F. Enzymatic conversion of starch to fermentable sugars. In: JACQUES, K. A. et al. (Ed.). **The alcohol textbook**. 4th ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2003. Chapter 3, p. 23-32.

REED, G., NAGODAWITHANA, T. W. **Yeast technology**. 2nd ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991.

RODRIGUES, M. I.; ANDRIETTA, M. G. S. **Controle da fermentação alcoólica através de testes microbiológicos e bioquímicos**. 1995. 54 f. (Curso de extensão) - Faculdade de engenharia de alimentos, Unicamp, Campinas, 1995.

SALVATO, F. **Fermentação de mosto industrial por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com transportador de sacarose e sobreexpressão de invertase interna: estudo comparativo com linhagens com alta e baixa atividade de invertase externa.** 2010. 94 f. Dissertação (Mestre em ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

STUPIELLO, J. P. Considerações sobre a recirculação de substância na fermentação e na destilação alcoólicas. **STAB – Açúcar, álcool e subprodutos**, Piracicaba, v. 2, p. 35-37, 1984.

STUPIELLO, J. P. Um crédito a simplicidade. **STAB – Açúcar, álcool e subprodutos**, Piracicaba, v. 23, n. 3, p. 14, 2005.

VENTURA, R. **Quantificação do ácido láctico na fermentação etanólica como parâmetro de monitoramento do processo.** 2007. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.

YOKOYA, F.; MANFIO G. P.; VARIANE, S.F. **Curso de treinamento: bactérias Lácticas na Fermentação Alcoólica**, Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 1997. 167p.

WEE, Y. J.; KIN, J. N.; Ryu, H. W. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications – review. **Food technology and biotechnology**, Zagreb, v. 44, n. 2, p. 16-172, 2006.