

**UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO**

**JEISSON MACUNAÍ DA SILVA**

**DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO LÁTICO AO FINAL DO  
PROCESSO E ANÁLISE DOS FATORES QUE  
AFETAM A FERMENTAÇÃO ETANÓLICA**

BAURU  
2013

**JEISSON MACUNAÍ DA SILVA**

**DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO LÁTICO AO FINAL DO  
PROCESSO E ANÁLISE DOS FATORES QUE AFETAM A  
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<sup>o</sup> Me: Carlos Henrique Conti.

BAURU  
2013

S5864d	<p data-bbox="548 1192 850 1220">Silva, Jeisson Macunai da</p> <p data-bbox="548 1262 1281 1356">Determinação do ácido láctico ao final do processo e análise dos fatores que afetam a fermentação etanólica / Jeisson Macunai da Silva -- 2013.</p> <p data-bbox="597 1367 675 1394">42f.: il.</p> <p data-bbox="597 1436 1281 1497">Orientador: Prof. Me. Carlos Henrique Conte. Coorientadora: Profa. Maria Angélica Meneguim Trombini.</p> <p data-bbox="548 1528 1281 1589">Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.</p> <p data-bbox="548 1621 1281 1724">1. Acido láctico. 2. Fermentação. 3. Fatores que afetam a fermentação. 4. Viabilidade celular. I. Conte, Carlos Henrique. II. Trombini, Maria Angélica Meneguim. III. Título.</p>
--------	--

**JEISSON MACUNAÍ DA SILVA**

**DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO LÁTICO AO FINAL DO PROCESSO E  
ANALISE DOS FATORES QUE AFETAM A FERMENTAÇÃO ETANÓLICA**

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 Prof<sup>o</sup>. Me. Carlos Henrique Conti.

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>o</sup> Me. Carlos Henrique Conti  
Universidade do Sagrado Coração

---

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

---

Profa. Dra. Márcia Aparecida Zeferino Garcia  
Universidade do Sagrado Coração

Bauru, 11 de junho de 2013.

Dedico este trabalho a minha mãe

Alairtes e a toda a minha família.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus por ter me concedido tão belo árduo caminho para a formação, por estar sempre ao meu lado, e todas as vezes que minhas forças se esgotavam e pensei em desistir, o SENHOR me levantou e deu forças para continuar.

Todos meus familiares em especialmente minha mãe Alairtes e minha namorada Cristiane pelo incentivo e paciência.

Agradeço ao meu orientador Prof. Me. Carlos Henrique Conti a acolhida, orientação apoio atenção e amizade.

A Prof. Maria Angélica Meneguim Trombini pela amizade, pelo material bibliográfico, pelos conhecimentos transmitidos durante varias etapas do trabalho.

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

Aos meus colegas de trabalho da Usina da Barra (Raízen), a força incentivo e companheirismo.

Agradeço a todos os colegas de classe, especialmente ao Reyson ao Elton a Andria a amizade e companheirismo no decorrer do curso.

Agradeço também todos aqueles que participaram e torceram por mim diretamente e indiretamente durante essa etapa da minha vida.

“Não se deve ir atrás de objetivos fáceis. É preciso buscar o que só pode ser alcançado por meio dos maiores esforços”.

(Albert Einstein)

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo quantificar o ácido L-lático presente no final do processo de fermentação e identificar fatores que possa afetá-la e observar a viabilidade celular da levedura. O ácido láctico, que é uma substância formada por bactérias lácticas junto a carboidratos, 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 imobilizada, que são específicas para o isômero L (+) lactato. Os resultados foram relacionados com os valores obtidos das análises diárias de contagem de bactérias lácticas totais e viabilidade celular da levedura, que são realizadas por técnicas de coloração, onde as células viáveis absorvem a cor dos pigmentos do reagente e por serem viáveis as células metabolizam a coloração e as não viáveis absorvem a coloração sem força para fazer a metabolização pois estão mortas. O teor de ácido láctico quantificado no vinho variou entre 368 a 1485 mg/L, estabelecendo uma relação que teoricamente seria proporcional com o número de bactérias presente no vinho leveduras que variou  $3,30 \times 10^5$  a  $2,69 \times 10^6$  UFC/mL mais isso não ocorreu devido o controle da fermentação com antibióticos. Já a viabilidade celular da levedura variou entre 85,86 a 98,42 %. A análise de quantificação de ácido láctico pode ser considerada uma medida auxiliar no controle de processo fermentativo, pois não é a única medida realizada e também considera-se outros parâmetros no processo.

**Palavras-chave:** Ácido láctico, Fermentação, Fatores que afetam a Fermentação, Viabilidade Celular.

## ABSTRACT

This study had as objective quantify the L-lactic present at the end of the fermentation process and identify factors that can affect it and observe the cell viability of yeast. The lactic which is a substance formed by the lactic acid bacteria with carbohydrates, representing a loss of income and affects the metabolism of the yeast. The analysis to quantify this substance were carried out by means of apparatus provided with lactate oxidase immobilized enzymes wich are specific for the L isome (+). The results were related with the values obtained from the analysis daily of the counts total lactic acid bacteria and cell viability yeast, which are performed by staining techniques, where viable cell absorv the color pigments of the reagent and being viable cells metabolize the coloring and unviable staining absorv no force to metabolism, because there dead. The content of lactic acid in the wine quantitated varied between 368-1485 mg/L, estabilishing a relationship that would theoretically proportional to the number of bacteria present in the wine yeast varied to  $3,30 \times 10^5 - 2,69 \times 10^6$  UFC/mL but it did not occur because the control of antibiotic fermentation. Now the viability of yeast cell varied between 85,86 to 98,42 %. The analysis of quatification of lactic acid can be considered a measure to help control the fermentation process, it's not the only measure executed and also considered whether other parameyers in the process.

**Key words:** Lactic acid, Fermentation, Factors Affecting Fermentation, Cell Viability.

## SUMARIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRAFICA</b>	<b>12</b>
2.1	FERMENTAÇÃO	12
2.1.1	<b>Produção de etanol</b>	15
2.1.1.1	<b>Tipos de processo</b>	15
2.2	LEVEDURAS UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE ETANOL	18
2.3	BACTÉRIAS LÁTICAS	20
2.4	ACIDO LÁTICO E SUA INTERFERÊNCIA NA FERMENTAÇÃO ETANOLICA	21
<b>3</b>	<b>FATORES QUE AFETAM A FERMENTAÇÃO</b>	<b>25</b>
3.1	AGENTES DA FERMENTAÇÃO	25
3.2	PH	25
3.3	TEMPERATURA	25
3.4	CONCENTRAÇÃO DE AÇUCARES	26
3.5	CONCENTRAÇÃO DO ÍNOULO	26
3.6	OXIGÊNIO	26
3.7	ÁLCOOL	27
3.8	VIABILIDADE CELULAR	27
3.9	FLOCULAÇÃO	28
3.10	PRESENÇA DE CONTAMINAÇÃO BACTERIANA	28
<b>4</b>	<b>CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO BACTERIANA NA FERMENTAÇÃO ETANOLICA</b>	<b>29</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>31</b>
5.1	MATERIAIS	31
5.2	MÉTODOS	31
5.3.1	<b>Medidor de acido láctico portal Accutrend Lactate®</b>	31
5.3.3	<b>Contagem de bastonetes/mL em microscópio ótico</b>	31
5.3.4	<b>Determinação da viabilidade celular da levedura</b>	32
5.3.5	<b>Quantificação do acido L-láctico</b>	32
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>34</b>
6.1	ÁCIDO LÁTICO E BACTÉRIAS LÁTICAS	34
6.2	ÁCIDO LÁTICO E VIABILIDADE CELULAR DA LEVEDURA	35
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>37</b>
	<b>REFERENCIAS</b>	<b>38</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A busca de biocombustíveis que venham a substituir o petróleo é um dos maiores desafios mundiais, uma fonte de combustível fóssil, não renovável, extremamente poluente e com preços elevados. A preocupação com o aquecimento global é intensa, e requer uma substituição em larga escala dos combustíveis derivados do petróleo. (CIBIM, 2008).

Os biocombustíveis são a única fonte de energia sustentável, que irão diminuir o aumento do preço do petróleo, preocupações ambientais como poluição do ar e gases do efeito estufa, proporcionando oportunidades para comunidades rurais. (VENTURA, 2007).

Nos anos 70, a alta de preços do petróleo, estimulou a criação do Proálcool (Programa Nacional do Álcool) com o objetivo de se reduzir a dependência de energia por fontes não-renováveis, a diminuição da emissão de gases poluentes na atmosfera e também atender as necessidades do mercado interno e externo, além da política de combustíveis automotivos. Até então, não se esperava que o programa evoluísse tanto, mas o país já contava com a matéria-prima, cana-de-açúcar, em abundância. Além disso, houve mais investimentos na forma de financiamento pelo Governo Federal para o aumento da área de plantio da matéria-prima e para a instalação de usinas. (BERTELLI, 2010).

Na produção do etanol a etapa mais importante é a fermentação do caldo de cana-de-açúcar ou melaço por leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. As leveduras realizam a fermentação do açúcar com objetivo de conseguir energia química (ATP-adenosina trifosfato) necessária para 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 de produtos secundários da fermentação (glicerol, ácidos orgânicos, álcoois superiores, etc. (AMORIM, BASSO, ALVES, 1999).

Na etapa de fermentação, além das leveduras, também são encontrados micro-organismos que prejudicam o rendimento deste processo provocando a diminuição na produção do etanol, o aumento no consumo de diversos insumos, como anti-espumante e dispersantes, além de causarem problemas operacionais e perdas (ART- açúcares redutores totais) na cadeia produtiva. (AMORIM, BASSO, ALVES, 1999).

Para diminuir os problemas causados por micro organismos contaminantes é necessário monitorar a fermentação por análises microbiológica. Isto permite detectar e controlar os problemas provocados pela ação de micro organismos indesejáveis nas várias etapas da fermentação. (AMORIM, BASSO, ALVES, 1999).

Os micro-organismos contaminantes mais comuns na fermentação são as bactérias lácticas. Este grupo utiliza os carboidratos presente no meio fermentativo

para produzirem ácido láctico, que é a substância encontrada em maior quantidade no seu metabolismo. As bactérias podem ser encontradas diferentemente devido ao padrão de controle de cada processo. (REED; NAGODAWITHANA, 1991).

Para Ceballos-Schiavone (2009), a contaminação microbiológica pode ter origem na cana de açúcar, sujeiras vindas do campo ou mesmo provenientes de equipamentos e utensílios mal higienizados no processo. Estudos realizados indicam que os micro-organismos crescem e vivem sobre a superfície vegetal da bainha da cana, são na maioria *Lactobacillus* e *Bacillus*. Esta parece ser a principal origem da contaminação do caldo de cana além da cana deteriorada pela queima, tempo de estocagem e com pragas moléstias.

No monitoramento, ao final de 18 ciclos de uma fermentação mista com *Sacharomyces cerevisiae* (fermento de panificação) e *Lactobacillus fermentum*, a levedura fica seriamente comprometida e as bactérias tiveram um grande crescimento, havendo uma diminuição no rendimento etanólico, e na sua produtividade em relação às médias dos ciclos iniciais, lembrando que o rendimento na produção é um dos parâmetros mais importante a ser avaliado. As unidades produtoras de etanol buscam melhorias em seus processos uma vez que o produto final é padronizado (Oliva-Neto 1990).

Condições relativamente típicas prevalecem em vários estágios do processo, o que propicia o desenvolvimento de alguns micro-organismos. O pH do caldo favorece micro-organismos acidófilos como *Leuconostoc* e *Lactobacillus*, já em alta temperatura, associada aos valores de pH, há o predomínio do crescimento dos termofílicos como as espécies pertencentes ao gênero *Bacillus*. (CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA, 2005, p. 13).

Em decorrência destas considerações, este trabalho teve o objetivo de determinar o ácido L-láctico presente no final do processo de fermentação, analisar os fatores que possa afetá-la e a viabilidade celular durante o processo.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

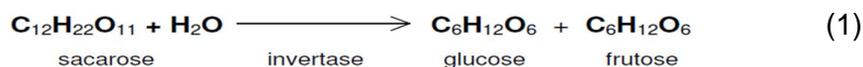
### **2.1 FERMENTAÇÃO**

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 Leeuwenhoek (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). As reações (1) e (2) mostra a hidrólise da sacarose pela enzima invertase e a conversão da glicose em etanol e CO<sub>2</sub> respectivamente.



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 micro-organismos viviam em uma atmosfera destituída de oxigênio. No curso da evolução, essa rota bioquímica foi conservada.

A Figura 1 mostra a sequência das reações de quebra da glicose em dois piruvato.

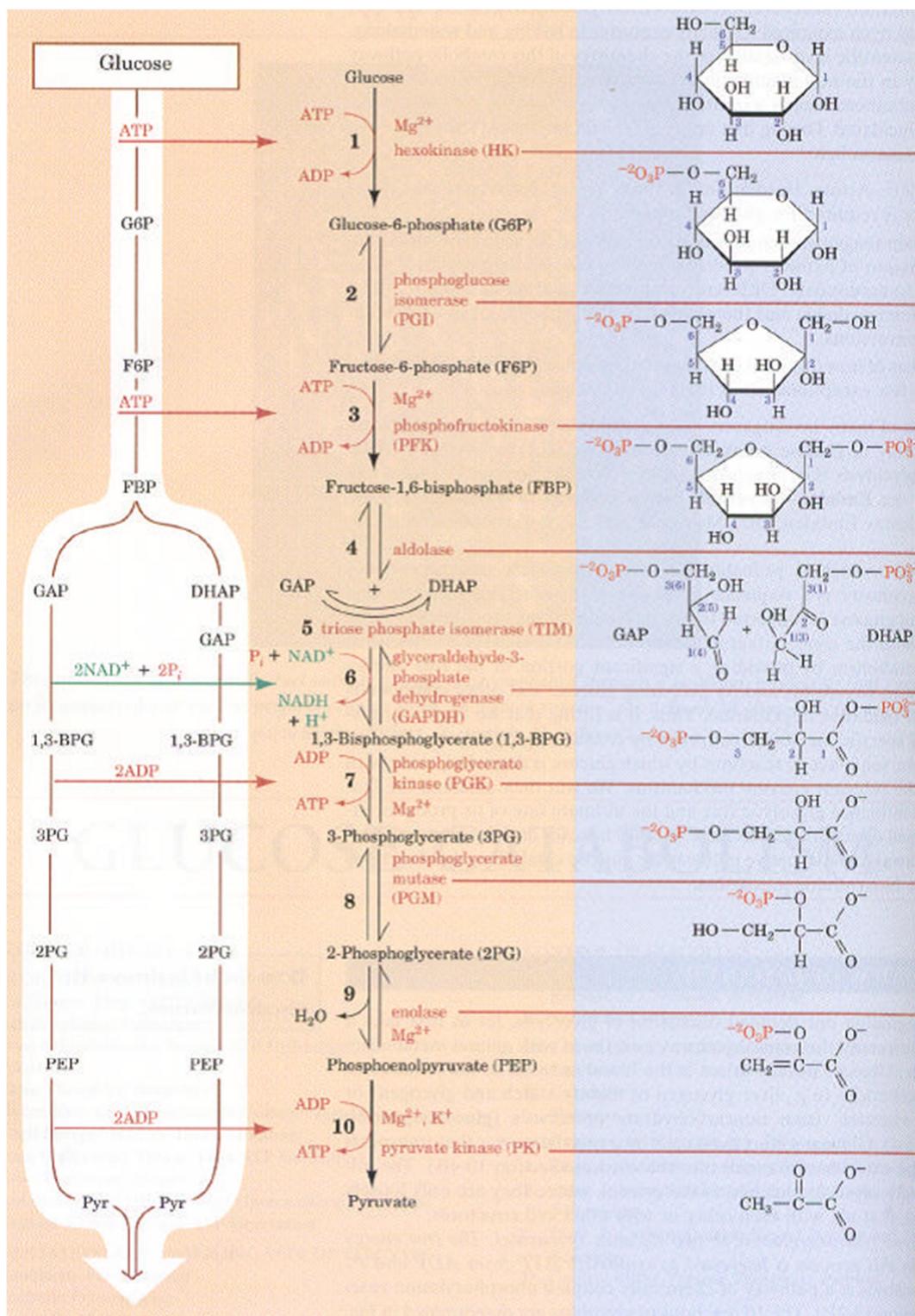
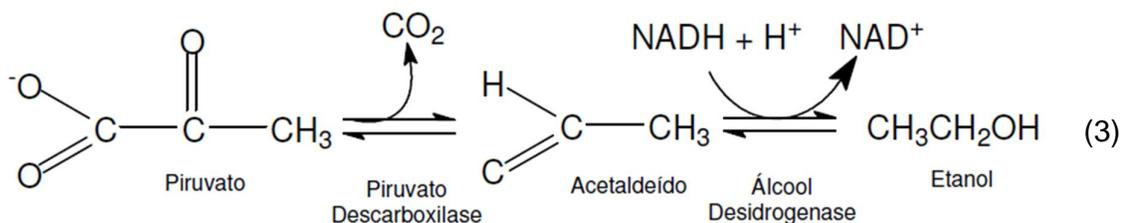


Figura 1 - Reações ocorrida na glicose.  
Fonte: Pelczar (1997).

Na fermentação onde o micro-organismo utilizado é a levedura, o piruvato é convertido em etanol e  $\text{CO}_2$  em duas etapas. Na primeira etapa o piruvato sofre uma descarboxilação catalisada pela enzima piruvato descarboxilase, na segunda etapa através da enzima desidrogenase, o acetaldeído gerado é reduzido a etanol. Portanto, a levedura transforma glicose em etanol e  $\text{CO}_2$ . (LEHNINGER, NELSON, COX, 2000), como mostra a reação 3.



### 2.1.1 Produção de etanol

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 micro-organismo pode ser selecionado ou não. (LIMA, BASSO, AMORIN, 2001).

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, BASSO, AMORIN, 2001).

#### 2.1.1.1 Tipos de processo

- Fermentação descontínua alimentada

O tipo de processo na fermentação etanólica varia de acordo com o tipo de tecnologia. No Brasil predomina o processo descontínuo alimentado com ciclo total da célula, o qual permite maior produtividade em relação ao processo descontínuo simples (batelada). (SÃO PAULO 2006).

Segundo Antonini (2010) os problemas nos processos de batelada simples e alimentados são causados pela contaminação, entretanto são facilmente contornados, quando comparados aos processos contínuos.

A condução do processo descontínuo alimentado ou batelada alimentada 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.

A Figura 2 mostra o fluxograma da fermentação descontínua.

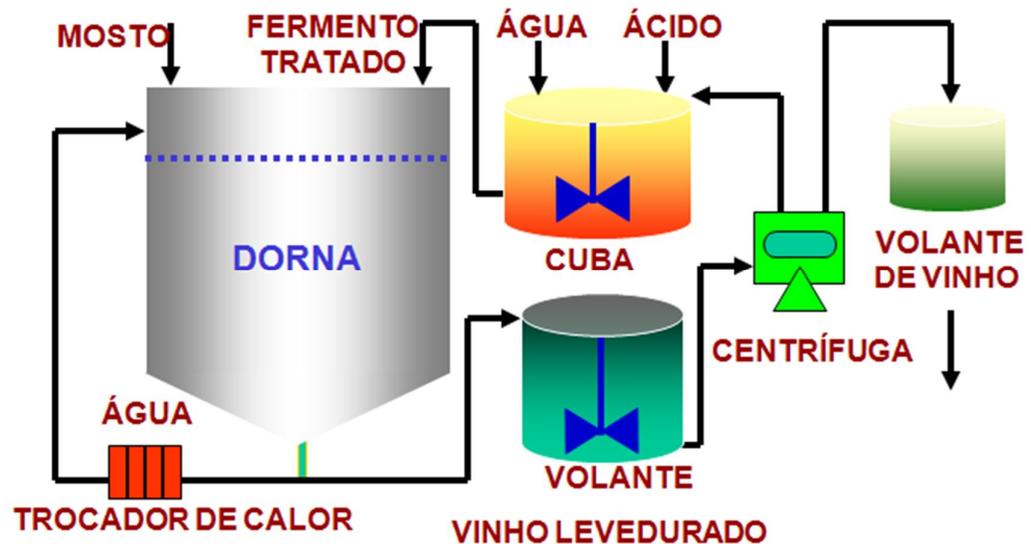


Figura 2: Fluxograma da fermentação descontínua e descontínua alimentada.  
Fonte: Amorin (1999).

- Fermentação contínua

Os processos contínuos são relativamente recentes, embora começou a ser utilizado em escala industrial começa por meados de 1940, a sua utilização tomou proporções após incentivo a produção de etanol no Brasil decorrente da crise econômica, devido o alto preço do petróleo na década de 1970. 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.

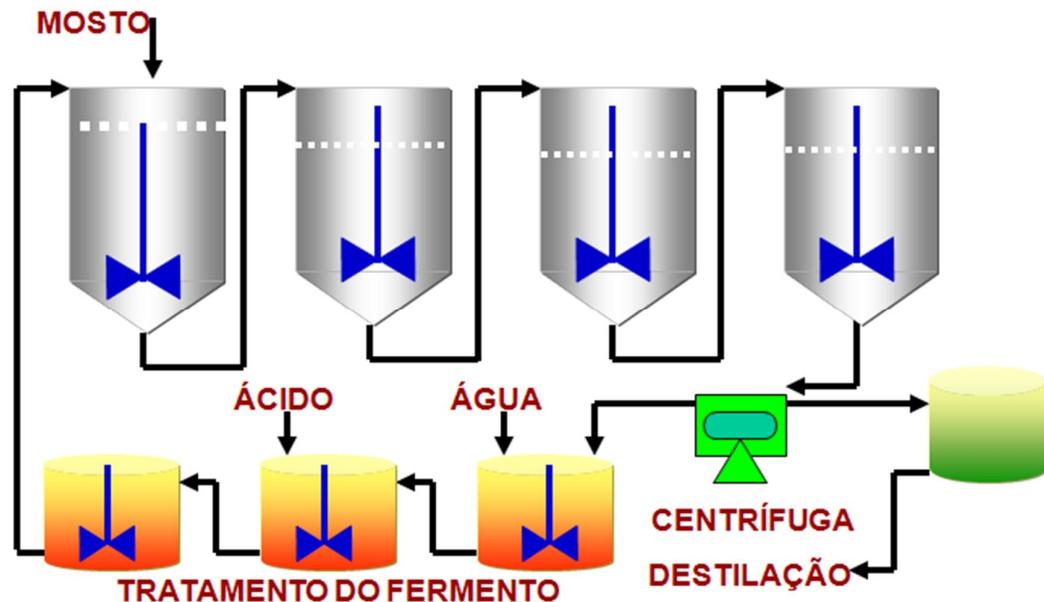


Figura 3: Fluxograma da fermentação contínua.

Fonte: Amorin et al., (1999)

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. O principal seja o uso de um micro-organismo com uma taxa de crescimento rápido, que mantenha uma uniformidade biológica durante o reciclo 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 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).

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.

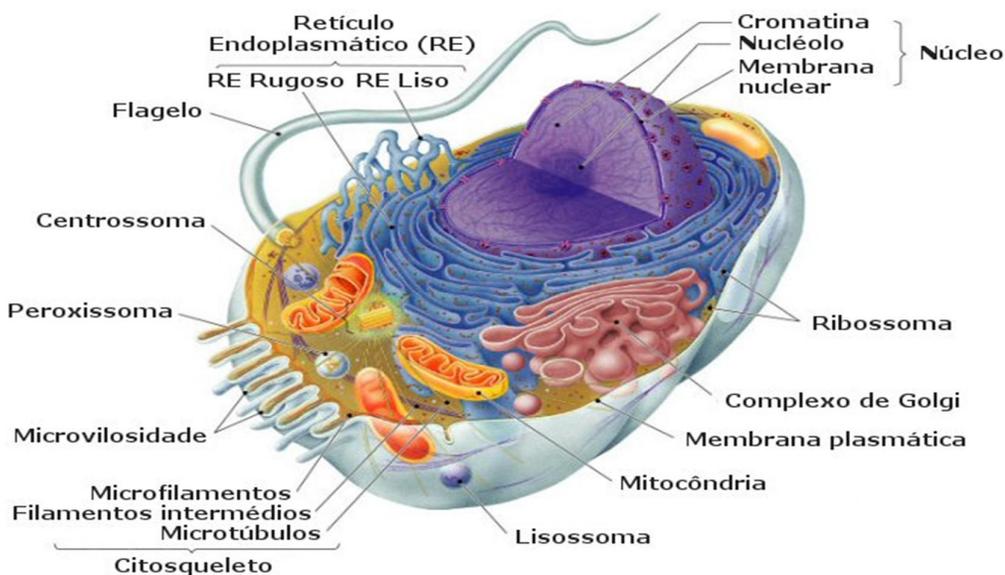


Figura 4 - Célula de levedura com suas respectivas estruturas.

Fonte: Pelczar (1997).

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 BASSO, ALVES, 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 consequentemente 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 BACTÉRIAS LÁTICAS.

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.

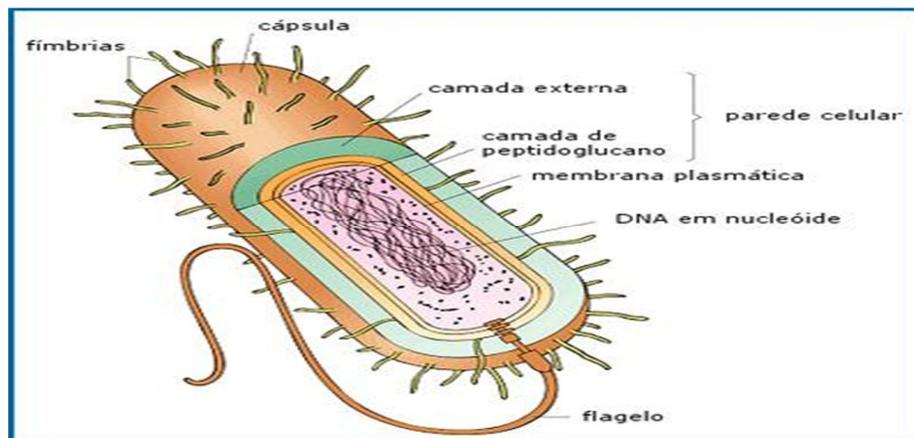


Figura 5: Célula de bactéria com suas respectivas estruturas.  
Fonte: (PELCZAR et al., 1997).

De acordo com Buchanan et al. (1974), Hofvedhal 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 esta entre 30 e 40°C.

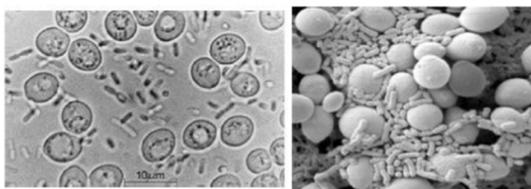
As bactérias produtoras de ácido láctico encontrada na produção de etanol são as mais nocivas, devido a sua habilidade de sobreviver em temperatura ótima entre 30 e 40°C e pH ótimo de 5,5 – 6,0. Nestas condições, as bactérias lácticas se reproduzem bem mais rápidos que as leveduras (NARENDRANATH, 2003).

Apesar das bactérias lácticas serem exigentes nutricionalmente, o caldo em processo contem 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).

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

Na ausência de oxigênio, ou seja, em anaerobiose metabolizam a glicose em ácido láctico 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 proteicos da parede celular dessas bactérias, potencializando pela presença de íons cálcio no meio, como mostra a Figura 6.



(a)

(b)

Figura 6: Leveduras e lactobacilos dispersos (a) e floculados (b) em fermentação etanólica.

Fonte: Russell (2003).

## 2.4 ÁCIDO LÁCTICO E SUA INTERFERÊNCIA NA FERMENTAÇÃO ETANÓLICA

O ácido láctico (ácido 2-hidroxiopropanóico) 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  $\beta$ -carbono assimétrico (centro quiral) que possui dois enantiômeros: L (+), D (-) e um DL racêmico que pode ser através de síntese química. O ácido láctico ou lático, é um composto orgânico de função mista ácido carboxílico - álcool que apresenta fórmula molecular  $C_3H_6O_3$  e estrutural  $CH_3 - CH - COOH$ , (DAINTITH, 1996). como mostra a Figura 7.

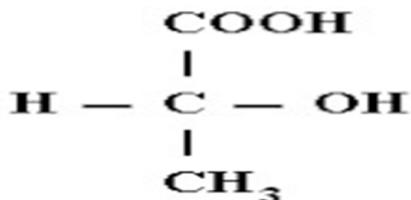


Figura 7: Formula Estrutural do ácido láctico

Fonte: (DAINTITH, 1996).

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, NELSON, COX, 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. (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  $\text{A}^-$  é a espécie dissociada e HA é a não dissociada. Em pH acima de seu valor de  $\text{pK}_a$  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, LEÃO, VAN-UDEN. (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 serevisiae*, 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.

Segundo 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 Dorta (2006), a inibição do metabolismo da levedura está relacionada com a falta de vitaminas e aminoácidos no meio fermentativo, especialmente o ácido glutâmico.

### 3. FATORES QUE AFETAM A FERMENTAÇÃO

#### 3.1 AGENTES DA FERMENTAÇÃO

Em escala industrial, incontestavelmente, as leveduras pertencentes ao gênero *Saccharomyces*, têm sido largamente utilizadas para a produção de álcool. Representantes desse gênero são os micro-organismos que mais apresentam características favoráveis para transformar açúcares em álcool (STECKELBERG, 2001). O desempenho do processo fermentativo é enormemente afetado pelo tipo de levedura que o executa (LIMA et al., 2001), dependendo de várias circunstâncias, entre as quais o substrato ou matéria prima utilizada, o teor alcoólico desejado no produto final, a duração da fermentação, as propriedades do produto, e outros. Assim a escolha do agente fermentador correto fornece alta eficiência na produção de álcool, baixa produção de glicerol e alta tolerância a diversos fatores estressantes.

Geralmente observa-se durante a fermentação, por técnicas de cariotipagem, que as linhagens que dão início ao processo são substituídas por leveduras comuns à região da destilaria, comumente denominadas de leveduras selvagens.

É importante ressaltar que as leveduras selvagens podem dominar o processo ao longo da safra melhorando a eficiência na produção de álcool ou acarretando problemas na fermentação, como baixo rendimento, formação excessiva de espumas e floculação do fermento (LIMA et al., 2001).

#### 3.2 pH

O pH é um fator significativo para as fermentações industriais devido à sua importância tanto no controle da contaminação bacteriana quanto ao seu efeito sobre o crescimento da levedura, taxa de fermentação e formação de subprodutos (SOUZA, 2009). As fermentações se desenvolvem numa ampla faixa de valores de pH, sendo a adequada entre 4 e 5 (LIMA et al., 2001).

Aumentando-se o pH até 7, observa-se, via de regra, uma diminuição do rendimento em álcool, com aumento da produção de ácido acético (SOUZA, 2009). Os valores de pH dos mostos industriais geralmente se encontram na faixa de 4,5 a 5,5. No processo de fermentação com reutilização da levedura faz-se seu tratamento com ácido sulfúrico com pH de 2,0 a 3,2, durante aproximadamente uma hora, visando a redução da carga microbiana (LIMA et al., 2001).

A fermentação alcoólica inicia com valores de pH baixos, finalizando com valores de 3,5 a 4,0. Fermentações conduzidas em meios mais ácidos resultam em maiores rendimentos de álcool, pelo fato de restringir o crescimento do fermento, ao mesmo tempo que reduz a contaminação bacteriana. Os caldos de cana fermentam sem correção da acidez, em pH natural que varia de 5,2 a 6,8. Pelo descrito, a tolerância à acidez é uma característica importante para as leveduras industriais (LIMA et al., 2001).

#### 3.3 TEMPERATURA

A temperatura é uma das condições ambientais que mais afetam a atividade de micro-organismos, influenciando no crescimento, metabolismo, capacidade fermentativa e viabilidade celular em leveduras (BATISTA, 2001). As leveduras, *S. cerevisiae*, são mesófilas. As temperaturas ótimas para a produção industrial de

álcool situam-se na faixa de 26 a 35°C, mas, não raramente, a temperatura nas destilarias alcança 38°C, dependendo das condições climáticas da região. À medida que a temperatura aumenta, eleva-se a velocidade da fermentação, mas favorece a contaminação bacteriana, ao mesmo tempo em que a levedura fica mais sensível a toxidez do álcool, levando a formação de metabólitos secundários como o glicerol. Por outro lado, temperaturas elevadas permitem maior perda de álcool por evaporação em dornas abertas. Tais aspectos justificam o controle da temperatura no processo industrial (LIMA et al., 2001).

Existem três temperaturas chaves de um processo de crescimento de leveduras: T<sub>maxi</sub> (temperatura máxima inicial de crescimento), T<sub>maxf</sub> (temperatura máxima final de crescimento) e T<sub>opt</sub> (temperatura ótima de crescimento). O aumento da concentração alcoólica ao longo da fermentação provoca uma diminuição das 3 temperaturas. Quando T<sub>maxf</sub> se iguala a temperatura do processo, o crescimento celular torna-se nulo (STECKELBERG, 2001).

### 3.4 CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES

A espécie *Saccharomyces cerevisiae* é capaz de fermentar os açúcares que compõem a cana-de-açúcar, que são basicamente a glicose, a frutose, e a sacarose (STECKELBERG, 2001). Essas linhagens de levedura normalmente utilizadas nos processos industriais apresentam uma tolerância limitada (SOUZA, 2009). O aumento da concentração de açúcares, conseqüentemente eleva a velocidade de fermentação, resultando em perdas da atividade de transporte de açúcar, produzindo menos álcool.

O estresse induzido pelo aumento da osmolaridade externa leva a redução em crescimento e perda da viabilidade das células das leveduras, devido às perturbações no gradiente osmótico através da membrana plasmática. Isto leva, por sua vez, a perdas em volume das células que se contraem por causa de diferenças em pressão osmótica entre o exterior e o interior das células (SOUZA, 2009).

### 3.5 CONCENTRAÇÃO DO INÓCULO

Elevadas concentrações de inóculo na dorna permitem fermentações mais rápidas, seguidas pelo aumento da temperatura, assim com maior produtividade e maior controle sobre as bactérias contaminantes, além de restringir o crescimento da própria levedura. Por outro lado, o elevado teor de levedura exige energia de manutenção maior, isto é, maior consumo de açúcar para manter as células vivas.

Como conseqüência, resulta em maior competição pelos nutrientes do meio, minerais e vitaminas, diminuindo a viabilidade do fermento. Portanto, é importante existir um teor ótimo de levedura na dorna, dependendo das condições especiais do processo industrial (LIMA et al., 2001).

Assim a recirculação das células da levedura permite a manutenção da alta concentração celular e maior eficiência decorrente de um menor consumo de açúcar utilizado para formação de células (STECKELBERG, 2001).

### 3.6 OXIGÊNIO

Os micro-organismos se comportam de diferentes maneiras na presença de oxigênio livre, ou seja, alguns micro-organismos exigem a presença de oxigênio para sua sobrevivência não tolerando nem sequer pressões normais de O<sub>2</sub> atmosférico

(aeróbios), outros não toleram a presença de oxigênio (anaeróbios) e há aqueles que podem se desenvolver tanto na presença como na ausência do oxigênio livre (facultativos) (BORZANI et al., 2001). *Saccharomyces cerevisiae* tem características facultativas respeito à utilização do oxigênio, podendo seguir rotas metabólicas tanto na ausência como na presença de oxigênio.

Porém quando há altas concentrações de açúcares ocorre à inibição da atividade de enzimas respiratórias e a formação de mitocôndrias, levando a produção de álcool na presença de oxigênio, processo denominado Efeito Crabtree (LIMA et al., 1986).

A fermentação alcoólica é inibida na presença de grandes concentrações de oxigênio, fenômeno este denominado “Efeito Pasteur”. Este efeito está intimamente associado ao estado fisiológico da célula, sendo que se manifesta principalmente nas leveduras que não estão na fase de crescimento (fase estacionária) nas quais ocorre nítida diminuição do consumo específico de glicose. Nas células em crescimento (fase exponencial), por outro lado, não se observa diferença significativa quanto a velocidade de consumo de glicose entre uma célula aeróbia e outra anaeróbia (STECKELBERG, 2001).

Embora pareça contraditório, sabe-se hoje que a completa falta de oxigênio não é benéfica ao processo de produção de álcool. Níveis mais altos de rendimentos alcoólicos e menos glicerol formado foram obtidos em culturas nas quais havia certa quantidade de oxigênio disponível (SOUZA, 2009).

### 3.7 ÁLCOOL

O efeito inibitório do álcool produzido por *Saccharomyces, cerevisiae* durante a fermentação é complexo e resulta no principal fator que desencadeia fermentação incompleta e conseqüentemente diminuição no rendimento do processo. Portanto, o melhor conhecimento do efeito de álcool sobre a levedura pode ser interessante para melhorar a fermentação. O álcool retarda o crescimento da levedura, reduz viabilidade e habilidade fermentativa (FERREIRA, 2002).

Os fatores que influenciam na sensibilidade do álcool (temperatura, aeração, composição do meio) agem direta ou indiretamente sobre as propriedades da membrana plasmática. Entretanto, o álcool parece não ter um efeito único, provocando modificações nas propriedades da membrana lipídica e nos sistemas de transporte de soluto e agindo sobre algumas enzimas (STECKELBERG, 2001).

Algumas análises evidenciaram que o crescimento celular não é inibido em concentrações de álcool inferiores a 26 g/L, mas é inibido totalmente quando a concentração de álcool atinge 68,5 g/L no meio da fermentação. Da mesma forma ao isolar leveduras de destilarias mostraram inibição de suas atividades fermentativa em batelada simples a 30°C quando a concentração de álcool no meio foi superior a 8%. Acima de 8% de álcool a fermentação ocorre de forma gradativamente reduzida (SOUZA, 2009).

### 3.8 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade é sem dúvida um aspecto importante no controle da fermentação alcoólica. Quanto maior esse número melhor será o desempenho do processo. Como o ambiente das dornas de fermentação não é propriamente ideal para manutenção da viabilidade celular um controle minucioso deve ser feito nas unidades produtoras (STECKELBERG, 2001).

Aumentos da temperatura de fermentação produzem uma forte diminuição da viabilidade celular, devido ao aumento das taxas de produção e acúmulo de álcool no meio e nas células (STECKELBERG, 2001).

### 3.9 FLOCULAÇÃO

Na floculação, fenômeno que ocorre na fermentação alcoólica por leveduras, as células agrupam-se formando conglomerados de peso muitas vezes superior ao da célula individualizada. Cessada a fase tumultuosa da fermentação, ou quando a agitação mecânica no fermentador é interrompida, esses flocos sedimentam-se rapidamente ou flutam impulsionados por bolhas de gases. A formação de flocos compromete a conversão de açúcar em álcool e CO<sub>2</sub>, pela redução da superfície de contato direto entre as células e o meio (MUTTON et al., 2004).

Este fenômeno pode causar perda de células na centrifuga e o conseqüente gasto de substrato para a reposição celular, determinando assim, queda no rendimento alcoólico. A floculação dificulta o contato entre o anti-bacteriano usado no processo e a bactéria causando o aumento desses contaminantes, que provocam um aumento de acidez, afetando a qualidade do álcool produzido, seja como combustível ou para a indústria de bebidas alcoólicas (LUDWING et al., 2001).

A floculação ocorre devido a vários fatores dos quais destacam-se o contato com gomas sintetizadas pelas bactérias, ou pelo contato entre bactérias indutoras da floculação e leveduras, ou ainda devido à contaminação por leveduras floculantes. No setor de fermentação e destilação as bactérias lácticas são as principais promotoras de fermentações indesejáveis, especialmente, o gênero *Lactobacillus* que é resistente ao álcool (LUDWING et al., 2001).

### 3.10 PRESENÇA DE CONTAMINAÇÃO BACTERIANA

Durante o processo industrial de produção de álcool podem estar presentes micro-organismos oriundos da cana-de-açúcar no campo que sobrevivem aos tratamentos do caldo e condições como pH, temperatura e produtos inibitórios no meio fermentativo e se estabelecem nas dornas de fermentação (ANGELIS, 2010).

As leveduras da fermentação alcoólica competem pelo substrato com bactérias que normalmente habitam as dornas. Um processo de fermentação considerado relativamente sadio apresenta níveis de bactéria próximos a 10<sup>5</sup> células/mL (ANDRIETTA et al, 2006).

A fermentação industrial, pela dimensão do processo não é conduzida em condições ideais de assepsia, a contaminação bacteriana, principalmente de *Lactobacillus* e *Bacillus*, está sempre presente e dependendo de sua intensidade, compromete o rendimento do processo fermentativo. As altas temperaturas de fermentação favorecem a contaminação bacteriana, o aumento do tempo de fermentação e o estresse da levedura. A contaminação bacteriana associa-se ao aumento da formação de ácido láctico e, embora não haja uma confirmação definitiva sobre a causa da floculação da levedura, considera-se, na indústria, que esta contaminação é a principal responsável pelos problemas encontrados na fermentação alcoólica (LIMA et al., 2001). Como as bactérias são distintas das leveduras, existem alguns antimicrobianos seletivos que são usados para o controle bacteriano, os quais podem minimizar os prejuízos causados por estes contaminantes sobre a fermentação (STECKELBERG, 2001).

#### 4 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.

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 foi de 0,25 ppm e inibiu cinco das oito espécies de bactérias em estudo, enquanto o Fermacol a 0,25 ppm inibiu duas e com 2 ppm inibiu 1 espécie. 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, Yokaya (2003) avaliaram os efeitos da radiação gama e a radiação de microondas sobre mostos de cana-de-açúcar, contaminados com bactérias lácticas.

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.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado na Usina da Barra (Raízen Energia S. A. – F Barra), no município de Barra Bonita, durante o período de 11/04 a 21/05/2013.

Na Usina da Barra (Raízen Energia S. A. – F Barra), o processo de etanol é por fermentação contínua, o volume útil de cada um dos reatores é de 2800 m<sup>3</sup> e capacidade de produção diária é de 1350 m<sup>3</sup> de etanol sendo 800 m<sup>3</sup> de etanol anidro e 550 m<sup>3</sup> de hidratado. A planta de fermentação é composta por duas linhas de seis fermentadores (total de 12) e uma única dorna pulmão (dorna final).

### 5.1 MATERIAIS

Vinho fermentado levedurado: as amostras utilizadas nas análises foram feitas em coletas diárias, depois do término processo de fermentação coletado na dorna. Foi utilizada, para efeito de resultados, a média aritmética com repetições duplas dos valores resultantes das análises.

### 5.2 METODOS

#### 5.3.1 Medidor de ácido láctico portal Accutrend Lactate®

Utilizou-se este equipamento e seus reagentes e acessórios (L-lactato, azul de metileno e a tira medidora), para determinar o ácido L-lático produzido no vinho da fermentação alcoólica.

#### 5.3.2 Contagem de bastonetes/mL em microscópio ótico

Na contagem de bastonetes/mL utilizando microscópio de campo claro, modelo OLYMPUS, com objetiva de 100 X com auxílio de óleo de imersão essa técnica é muito utilizada e difundida nas usinas destilarias para determinação de infecção em amostras retiradas em diversos pontos da produção de etanol. Foi realizado utilizando como corantes, a solução de sulfato azul de Nilo e azul de metileno, para distinguir bastonetes viáveis (não corados por metabolizarem nas células) e bastonetes não viáveis (corados azul por não conseguirem metabolizarem

as células), sendo contados somente os bastonetes viáveis em objetiva de imersão (Oliveira et al, 1996). E método utilizado em amostras com a população bacteriana acima de  $10^5$  bastonetes/mL (CTC, 2011).

### 5.3.3 Determinação da viabilidade celular da levedura

A viabilidade celular foi determinada por microscópio de campo claro modelo OLYMPUS com objetiva de 40 X, sendo as células contadas em câmara de Neubauer. 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 apresentam coloração. Posteriormente contadas em câmara de Neubauer, a viabilidade é estabelecida em porcentagem (%) mediante a relação entre as células viáveis e não viáveis. (CTC 2011).

### 5.3.4 Quantificação do ácido L-lático

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

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

A medição ocorre em duas etapas, na primeira, cerca de 25µL da amostra são colocadas sobre uma tira reagentes 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 impregnada com 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 ate 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 abaixo.

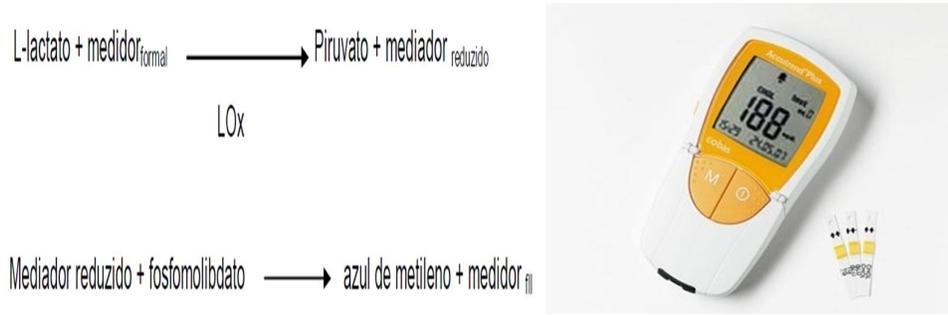


Figura 8: Esquema simplificado da reação e aparelho Accutrend Lactate®

Fonte: Cibim (2008)

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 láctico (90 g/mol).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 6.1 ÁCIDO LÁTICO E BACTÉRIAS LÁTICAS

As determinações de ácido L-lático e da concentração de bactérias lácticas totais no vinho, são visualizadas na 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 *
20/04/2013	412	8,28x10 <sup>5</sup>
21/04/2013	368	1,43x10 <sup>6</sup>
22/04/2013	428	2,60x10 <sup>6</sup>
23/04/2013	504	3,50x10 <sup>5</sup>
24/04/2013	470	1,18x10 <sup>6</sup>
25/04/2013	510	1,50x10 <sup>6</sup>
26/04/2013	994	3,30x10 <sup>5</sup>
27/04/2013	673	1,84x10 <sup>6</sup>
28/04/2013	572	2,12x10 <sup>6</sup>
29/04/2013	534	1,30x10 <sup>5</sup>
30/04/2013	435	3,94x10 <sup>5</sup>
01/05/2013	1286	5,70x10 <sup>5</sup>
02/05/2013	1485	5,76x10 <sup>5</sup>
03/05/2013	1294	10,94x10 <sup>5</sup>
04/05/2013	1390	4,51x10 <sup>5</sup>
05/05/2013	1271	1,38x10 <sup>6</sup>
06/05/2013	1277	2,69x10 <sup>6</sup>
07/05/2013	1203	6,68x10 <sup>5</sup>

\*Unidade Formadora de Colônias, dados obtidos a partir das análises dos processos fermentativos da RAIZEN ENERGIA S.A F BARRA.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

De acordo com a Tabela 1 observa-se que a quantidade de ácido lático no vinho delevedurado não é influenciado pelo aumento da concentração de bactérias, pois ocorreu a adição de antibióticos para que haja controle na fermentação.

Segundo Mac Master e Ravno (1977 apud VENTURA, 2007), o ácido lático 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.

## 6.2 ÁCIDO LÁCTICO E VIABILIDADE CELULAR DA LEVEDURA

O teor de ácido L-lático e a viabilidade celular da levedura pode ser visualizada na Tabela 2

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

Amostra	Ácido Láctico no vinho delevedurado (mg/L)	Viabilidade celular (%)
20/04/2013	412	85,86
21/04/2013	368	87,71
22/04/2013	428	95,61
23/04/2013	504	93,08
24/04/2013	470	98,42
25/04/2013	510	95,71
26/04/2013	994	96,15
27/04/2013	673	93,61
28/04/2013	572	94,46
29/04/2013	534	96,21
30/04/2013	435	93,42
01/05/2013	1286	95,18
02/05/2013	1485	97,02
03/05/2013	1294	95,64
04/05/2013	1390	95,94
05/05/2013	1271	94,08
06/05/2013	1277	95,57
07/05/2013	1203	94,74

\*Dados obtidos das análises do processo fermentativo da  
RAIZEN ENERGIA S.A F BARRA.  
Fonte: Elaborado pelo autor

Com os resultados obtidos, observa-se que a quantidade de ácido láctico não influencia diretamente à viabilidade celular da levedura devido a adição de antibiótico durante o processo.

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.

## 7 CONCLUSÃO

O ácido láctico presente no processo de fermentação alcoólica varia com a quantidade de bactérias lácticas totais, não podendo notar certa proporcionalidade entre o aumento do teor de ácido com o aumento da população de bactérias devido a adição de antibióticos para o controle na fermentação.

A determinação dos principais fatores que afetam a fermentação alcoólica onde geralmente pode ocorrer quedas na eficiência fermentativa decorrem de uma alteração na estequiometria do processo, levando a maior formação de produtos secundários e biomassa.

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

A 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, mas por ocorrer o controle durante o processo de fermentação não foi possível observar o que seria de acordo com a teoria.

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

## REFERÊNCIAS

AGENCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGOCIOS. **Workshop produção de etanol EEL/USP**. 2006. Disponível em: <[http://www.apta.sp.gov.br/cana/anexos//termo\\_referencia\\_etanol.pdf](http://www.apta.sp.gov.br/cana/anexos//termo_referencia_etanol.pdf)> Acesso em 09/março/2013.

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.

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 em Ciências Biológicas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.

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

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

ANGELIS, D. F. **Contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. Disponível em: <http://www.cca.ufscar.br/~vico/Contaminacao%20bacteriana%20na%20fermentacao%20etanolica.pdf>. Acesso em 23 de abril de 2013.

ANDRIETTA, M. G. S., STECKELBERG, C., ANDRIETTA, S. R., Bloetanol – Brasil 30 anos na vanguarda. Multi-Ciência: **Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da UNICAMP**, v. 7, p. 1-16, Out. 2006.

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

ASSOCIAÇÃO DOS PROFISSIONAIS DA QUIMICA NO ESTADO DE ALAGOAS. **Manual de operações das destilarias de álcool etílico**. Macéio, AL, 1988.

BATISTA, A.S. **Saccharomices cerevisiae em milho armazenado e o efeito na redução de aflatoxicoses**. Tese de Mestrado. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP, Brasil, 2001.

BERTELLI, L. G. A verdadeira História do Proálcool. **Biodiesel BR**, 2010 Disponível em:  
<<http://www.biodieselbr.com/proalcool/historia/proalcool-historia-verdadeira.html>>.  
Acesso em: 20 fev. 2013.

BORZANI, W., SCHIMIDELL, W., LIMA, U., AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial: Fundamentos**, v.1, São Paulo, SP, Editora Edgard Blucher, 2001.

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

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

CEBALLOS-SCHIAVONE, C.H.M Tratamento térmico do caldo de cana-de-açúcar visando a redução de contaminantes bacterianos: *Lactobacillus* na produção de etanol e eficiência do tratamento do fermento por etanol. 2009.177f.. Dissertação (mestrado em Ciências e tecnologia Tecnologia do Alimento) – Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba - SP.

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

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.

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.

CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA. **Manual de métodos analíticos e controle químico da fermentação**: Centro de tecnologia canavieira – laboratório de análises. Piracicaba, SP, 2005.

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.

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.

FERREIRA, Leonel Vasco. **Estudo da fermentação alcoólica em frascos agitados**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP, Brasil, 2002.

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

HOFVENDAHL, K.; HAGERDAL-HAHN, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. **Enzyme and Microbial Technology**, local Lisboa, Portugal, 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. de A., AQUARONE, E., BORZANI, W. **Tecnologia das Fermentações**, v.1, São Paulo, SP, Editora Edgard Blucher, 1986.

LIMA, U. A., BASSO, L. C., AMORIM, H. V. **Produção de Etanol**. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Coord.). **Biotechnology Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**, v.3, capítulo 1, São Paulo, SP, Editora Edgard Blucher, 2001.

LUDWING, K. M., OLIVA-NETO, P. de, ANGELIS, D. F. Quantificação da floculação de *S. cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, p. 63-68, Jan./Abr., 2001.

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

MUTTON, M. J. R., SOUZA, M. A. C. Floculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum* em processos industriais de fermentação alcoólica avaliada através de técnica fotométrica. **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, n.4, p. 893-898, Jul./Ago, 2004

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. p. 17 - 32.

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

- OLIVA-NETO, P. **Influência da contaminação por bactérias lácticas na fermentação alcoólica pelo processo de batelada alimentada.** 1990. 190 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, Campinas SP, 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.
- 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. **Biotechnologia 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 NostrandReihold, 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 SP, 1995.
- 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.
- SALVATO, F. **Fermentação de mosto industrial por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com transportador de sacarose e sobre expressão de invertase interna:** Estudo comparativo com linhagens com alta e baixa atividade de invertase extreme. 2010. 94 f. Dissertação (Mestre em ciências)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.
- SANTOS, A. M. **Estudo das influencias da complementação de nutrientes no mosto sobre o processo de fermentação alcoólica em batelada.** 2008.77f. Tese (Doutorado em química e biotecnologia). Universidade Federal de Alagoas. Maceió, 2008.
- SOUZA – FILHO E. et al. **Yest population dynamics of industrial fuel – etanol fermentation process assessed by PCR- fingerprinting,** p. 13-23, 2005.
- SOUZA, C. S. **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *S. cerevisiae*.** Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia (USP), Instituto Butantan (IPT), São Paulo, SP, Brasil, 2009.

STECKELBERG, C. **Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas.** Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP, Brasil, 2001.

STUPIELLO, J. P. HORII, J. Condução da fermentação alcoólica. *Saccharum STAB*, n. 17, 1981. V. 4.

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

TILBURY, R. R. H **Occurrence and effects od latic acid bactéria in the sugar industry.** In CARR, J. G.; CUTTING, C. V.; WHITHING, G. C Lactic acid bactéria in Beverages and Food. London: Academic Press, 1975. p177-191.

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.

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.

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